



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



ImmLISA™ Enhanced RF ELISAs

Detection of IgA, IgG or IgM Rheumatoid Factor (RF)

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUCT INSERT

REF	5138A	RF IgA ELISA	96 Determinations
REF	5138G	RF IgG ELISA	96 Determinations
REF	5138M	RF IgM ELISA	96 Determinations

INTENDED USE

ImmLISA Enhanced™ RF IgA Antibody ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of Rheumatoid Factor IgA antibodies in human serum to aid in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) in conjunction with other laboratory tests and clinical findings.

ImmLISA Enhanced™ RF IgG Antibody ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of Rheumatoid Factor IgG antibodies in human serum to aid in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) in conjunction with other laboratory tests and clinical findings.

ImmLISA Enhanced™ RF IgM Antibody ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of Rheumatoid Factor IgM antibodies in human serum to aid in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) in conjunction with other laboratory tests and clinical findings.

SUMMARY AND EXPLANATION

The measurement of RF is important in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis, as high titers of RF occur in sera of patients who tend to develop extra-articular complications.^{1,2} The majority of routine laboratory tests measure IgM RF by its ability to agglutinate sheep red blood cells, latex or similar particles coated with IgG.¹⁻⁴ However, studies suggest that RF of other immunoglobulin isotypes are also present in rheumatoid arthritis.⁵⁻⁹

RF is present in 70-90% of patients with rheumatoid arthritis and is included in the classification criteria.¹⁰ According to the revised ARA criteria, a low positive RF result contributes 2 out of 6 points and a high positive RF contributes 3 out of 6 points for classification of definite RA.

RF as detected by agglutination is of the IgM isotype. Other methods such as ELISA have improved specificity, sensitivity and reliability over existing and routinely used agglutination methods.³⁻⁵ ELISA methods can detect RF of various immunoglobulin isotypes. Such a distinction is not possible with traditional agglutination tests. Significant levels of an isotype of RF commonly found in rheumatic diseases and elevations of various isotypes together is almost diagnostic for rheumatoid arthritis.⁸ A combination of IgM, IgG and IgA RF results increases sensitivity for RA as compared to IgM RF results alone.⁹

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with purified rabbit IgG followed by a blocking step to reduce non-specific binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgA, IgG or IgM conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 450 nm. Results are expressed in ELISA Units per milliliter (EU/ml) for RF IgA and RF IgG and International Units per milliliter (IU/ml) for RF IgM and reported as positive or negative.

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

Open kit studies have been performed with materials/reagents and demonstrate stability through a minimum of 30 days.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.¹¹

Stop Solution is a dilute sulfuric acid solution. Sulfuric acid (H₂SO₄) is poisonous and corrosive. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes. Avoid exposure to bases, metals or other compounds that may react with acids.

TMB Enzyme Substrate contains an irritant that may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Caution: United States federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner.

Materials provided

ImmLisa™ RF IgA ELISA
 ImmLisa™ RF IgG ELISA
 ImmLisa™ RF IgM ELISA


REF	5138A
REF	5138G
REF	5138M

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	MICROPLATE RF	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with purified rabbit IgG antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + RFA	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for RF IgA. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL + RFG	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for RF IgG. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL + RFM	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for RF IgM. The expected concentration range in IU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFA CALIBRATOR B RFA CALIBRATOR C RFA CALIBRATOR D RFA CALIBRATOR E RFA	Ready to use set of 5 Calibrators . Calibrator A (green cap) 160 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing RF IgA antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFG CALIBRATOR B RFG CALIBRATOR C RFG CALIBRATOR D RFG CALIBRATOR E RFG	Ready to use set of 5 Calibrators . Calibrator A (green cap) 160 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing RF IgG antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFM CALIBRATOR B RFM CALIBRATOR C RFM CALIBRATOR D RFM CALIBRATOR E RFM	Ready to use set of 5 Calibrators . Calibrator A (green cap) 80 IU/ml, Calibrator B (violet cap) 40 IU/ml, Calibrator C (blue cap) 20 IU/ml, Calibrator D (yellow cap) 10 IU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 IU/ml. Derived from human serum containing RF IgM antibodies. Concentrations in IU/ml are printed on the labels.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgA Conjugate . Ready for use. Color coded pink.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP rabbit anti-human IgG Conjugate . Ready for use. Color coded pink.
1 x 15 ml	IgM-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgM Conjugate . Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB enzyme substrate. Ready for use. Protect from light .


EN

1 x 15 ml  Stop Solution. Ready for use.









2 x vials  Powder Wash Buffer. **Reconstitute to one liter each.**

1 x Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60ml  Liquid concentrated Wash Buffer. **Reconstitute to one liter.**

Symbols used on labels

-  Lot number
-  Catalog number
-  In vitro diagnostic use
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions before use
-  Number of tests
-  Manufacturer

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.

- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.
- or**
- For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative				Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500ul** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
- Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.

- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within **30 minutes** of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <10 EU/ml for IgA and IgG and less than 5 IU/ml for IgM. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{Unit of Calibrator D} = \text{Unit Test Sample}^*$$

It is recommended that qualitative results be reported as "positive" or "negative." Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

Note: Units for RF IgA and IgG are EU/ml. Units for IgM are IU/ml

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in U/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as “positive,” “negative,” or “indeterminate” with EU/ml or IU/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing normal blood donors and non-rheumatoid arthritis disease control specimens. The mean of the normal subjects plus 2SD was established as the assay cutoff for IgA and IgG and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. The mean of the normal subjects plus 2.5SD was established as the assay cutoff for IgM and assigned a value of 10 IU/ml. Negative, Indeterminate and Positive assay ranges are provided below.

RF IgA or IgG value	RF IgM value	Interpretation
<20 EU/ml	<10 IU/ml	Negative
20-25 EU/ml	10-12.5 IU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	>12.5 IU/ml	Positive

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

The assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated, icteric or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis. Taken alone, these results should not be interpreted as diagnostic.

EXPECTED VALUES

ELISA testing for RF has been found to be considerably more sensitive than conventional agglutination tests. Approximately 90% of patients with rheumatoid arthritis have elevated RF by the ELISA system compared to approximately 70% by agglutination.⁷ Most patients with rheumatoid arthritis have elevation of 2 or more isotypes of RF as compared to other rheumatic diseases such as systemic lupus erythematosus. In addition, rheumatoid patients have higher levels of RF as compared to other rheumatic conditions.^{9,12} The following tables summarize prevalence of RF reported in literature.

Prevalence of RF Isotypes in Rheumatoid Arthritis^{8,9}

RF Isotype	~Prevalence (%)
IgM	66
IgG	44
IgA	51
IgM, IgG and/or IgA	70-90

Prevalence of RF in Patients with Other Rheumatic Diseases^{6,10,12-22}

Condition	~ Prevalence (%)
Sjögren's syndrome	60%
Systemic lupus erythematosus	35%
Systemic sclerosis	25%
Mixed connective tissue disease	15%
Juvenile rheumatoid arthritis	15%
Polymyositis/dermatomyositis	10%

Sets of clinical samples were tested on the Immulisa™ RF ELISAs. Results demonstrating incidence in the populations for this study are provided below.

Clinical Populations	RF IgA ELISA			RF IgG ELISA			RF IgM ELISA		
	#	#	% Pos	#	#	% Pos	#	#	% Pos
	Tested	Pos	% Pos	Tested	Pos	% Pos	Tested	Pos	% Pos
Rheumatoid Arth.	249	131	52.6%	249	126	50.6%	249	176	70.7%
Juvenile Arth	10	0	0.0%	10	1	10.0%	10	1	10.0%
Osteoarthritis	30	0	0.0%	30	0	0.0%	30	1	3.3%
Psoriatic Arth	33	2	6.1%	33	3	9.1%	33	2	6.1%
Spondyloarthritis	33	1	3.0%	33	0	0.0%	33	1	0.0%
Churg-Strauss	10	1	10.0%	10	1	10.0%	10	1	10.0%
Mixed CT Disease	10	1	10.0%	10	2	20.0%	10	4	40.0%
Sjögren's	20	9	45.0%	20	2	10.0%	20	11	55.0%
Systemic Lupus Eryth	30	11	36.7%	30	6	20.0%	30	5	16.7%
Systemic Sclerosis	20	3	15.0%	20	4	20.0%	20	5	25.0%
Wegener's	8	1	12.5%	8	1	12.5%	8	1	12.5%
Misc AI*	36	0	0.0%	36	2	5.6%	36	1	2.8%
Misc ID**	70	4	5.7%	70	1	1.4%	70	6	8.6%
Healthy normals	122	5	4.1%	120	7	5.8%	144	5	3.5%

* includes celiac (8), Graves (10), Hashimoto (8), ulcerative colitis (10)

** includes syphilis (10), rubella (10), mononucleosis (5), Lyme (5), HCV (10), CMV (10), HSV (10), toxoplasmosis (10)

The clinical sensitivity and specificity for RA using these assays is summarized below*:

RF IgA		RF IgG		RF IgM	
Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

* Excludes NHS.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ RF ELISAs were evaluated by testing well-characterized rheumatoid arthritis serum specimens alongside disease controls and “normal” human sera. These specimens were also tested on commercially available ELISA kits. These results are summarized below.

A. Method Comparison: Immulisa™ RF ELISAs vs. other RF antibody ELISAs.

		Other RF IgA ELISA		
		Pos	Neg	Total
IMMCO RF	Pos	113	9	122
IgA ELISA	Neg	5	250	255
	Total	118	259	377
	Pos % Agreement		95.8%	(95% CI 89.9 - 98.4)
	Neg % Agreement		96.5%	(95% CI 93.3 - 98.3)
	Overall % Agreement		96.3%	(95% CI 93.7 - 97.9)

Disease Associated (RA) Specimens: 230
 Disease Control (non-RA) Specimens:

		Other RF IgG ELISA		
		Pos	Neg	Total
IMMCO RF IgG ELISA	Pos	88	24	112
	Neg	7	271	278
Total		95	295	390

Pos % Agreement 92.6% (95% CI 84.9 - 96.7)
 Neg % Agreement 91.9% (95% CI 88.0 - 94.6)
 Overall % Agreement 92.1% (95% CI 88.8 - 94.5)

Disease Associated (RA) Specimens: 154
 Disease Control (non-RA) Specimens: 236

		Other RF IgM ELISA		
		Pos	Neg	Total
IMMCO RF IgM ELISA	Pos	124	16	140
	Neg	4	235	239
Total		128	251	379

Pos % Agreement 96.9% (95% CI 91.7 - 99.0)
 Neg % Agreement 93.6% (95% CI 89.7 - 96.2)
 Overall % Agreement 94.7% (95% CI 91.8 - 96.7)

Disease Associated (RA) Specimens: 139
 Disease Control (non-RA) Specimens: 239

B. Cross Reactivity: A total of 106 potentially cross-reactive specimens from individuals with autoimmune disorders and infectious diseases not reported to demonstrate high incidence of autoantibodies for RF were tested using the ImmuLisa™ RF ELISAs.

Clinical Populations	RF IgA ELISA			RF IgG ELISA			RF IgM ELISA		
	# Tested	# Pos	% Pos	# Tested	# Pos	% Pos	# Tested	# Pos	% Pos
Celiac Disease	8	0	0.0%	8	0	0.0%	8	0	0.0%
Graves	10	0	0.0%	10	1	10.0%	10	1	10.0%
Hashimoto	8	0	0.0%	8	0	0.0%	8	0	0.0%
Ulcerative Colitis	10	0	0.0%	10	1	10.0%	10	0	0.0%
Syphilis	10	0	0.0%	10	0	0.0%	10	0	0.0%
Rubella	10	0	0.0%	10	0	0.0%	10	1	10.0%
Mononucleosis	5	1	20.0%	5	0	0.0%	5	0	0.0%
Lyme	5	0	0.0%	5	0	0.0%	5	0	0.0%
HCV	10	1	10.0%	10	1	10.0%	10	2	20.0%
CMV	10	0	0.0%	10	0	0.0%	10	0	0.0%
HSV	10	1	10.0%	10	0	0.0%	10	2	20.0%
Toxoplasmosis	10	1	10.0%	10	0	0.0%	10	1	10.0%

Total	106	4	3.8%	106	3	2.8%	106	7	6.6%
-------	-----	---	------	-----	---	------	-----	---	------

Precision

Precision was tested with 7 positive specimens selected throughout the range of the assay for each isotype. Assay runs of 6 replicates of each specimen were conducted over approximately 21 days. Repeatability was determined with 12 replicates of each specimen.

Sample	Mean (units/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
		SD (units/ml)	CV%	SD (units/ml)	CV%	SD (units/ml)	CV%
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%
IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%
IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%
IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Qualitative Reproducibility

Ninety replicates of samples in the negative range, ~20% below cutoff, ~20% above cutoff and in the moderate positive range of the assay were performed to determine qualitative reproducibility for each isotype. These samples were tested in multiple runs. Assay results for each specimen produced 100% qualitative agreement.

Limit of Detection

The limits of detection (LoD) for RF antibody using these assays were determined to be 3.7 EU/ml for IgA, 2.2 EU/ml for IgG and 1.3 IU/ml for IgM based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples.

Linearity

Studies were performed using equidistant dilution series of positive samples with values throughout the calibrator range to determine linear range of the assay. The linear range of RF IgA was determined to be 3.3 – 160 EU/ml. The linear range of RF IgG was determined to be 2.6 – 160 EU/ml. The linear range of RF IgM was determined to be 1.2 – 80 IU/ml. Results are summarized below.

Sample	Test Range (units/ml)	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
IgA 1	4.8 - 13.7	0.96 (0.86 to 1.06)	0.83 (-0.12 to 1.77)	1.00	91.2 to 100.0
IgA 2	10.5 - 64.9	0.96 (0.84 to 1.09)	3.66 (-1.16 to 8.48)	0.98	83.4 to 101.3
IgA 3	17.3 - 155.0	1.00 (0.88 to 1.14)	2.55 (-9.4 to 14.5)	0.99	88.0 to 104.1
IgG 1	3.6 - 13.8	1.00 (0.92 to 1.08)	0.33 (-0.40 to 1.07)	1.00	92.2 - 100.9
IgG 2	7.0 - 68.7	1.01 (0.89 to 1.12)	1.81 (-2.85 to 6.47)	0.99	87.5 - 100.1
IgG 3	16.1 - 154.7	1.07 (0.95 to 1.20)	-1.59 (-13.3 to 10.2)	1.00	88.2 - 105.6
IgM 1	2.0 - 8.1	0.97 (0.82 to 1.26)	-0.50 (-2.60 to 1.25)	0.99	83.0 - 102.3
IgM 2	8.1 - 61.4	0.96 (0.91 to 1.01)	1.43 (-0.56 to 3.43)	1.00	87.6 - 103.1
IgM 3	13.0 - 73.3	1.00 (0.84 to 1.15)	2.24 (-4.88 to 9.36)	1.00	89.4 - 100.0

Interference

Interference was studied by mixing sera with known RF isotype levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. The following substances were tested at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), Cholesterol (13 mmol/L) and Triglycerides (37 mmol/L). It was noted that bilirubin, cholesterol and triglyceride spiked specimens demonstrated up to +10% greater difference than expected coefficient of variance percent for these assays. Please note sample requirements listed in Limitations of Procedure.



ImmLiSa™ Enhanced RF ELISAs

Ανίχνευση IgA, IgG ή IgM Ρευματοειδούς Παράγοντα (RF)

IVD Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF	5138A	RF IgA ELISA	96 Προσδιορισμοί
REF	5138G	RF IgG ELISA	96 Προσδιορισμοί
REF	5138M	RF IgM ELISA	96 Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ImmLiSa Enhanced™ Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά του ΡΡ: Μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) για την ποιοτική ή ημιποσοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgA κατά του ρευματοειδή παράγοντα (ΡΡ) στον ανθρώπινο ορό ως επικουρικό μέσο για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (ΡΑ) σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακές εξετάσεις και κλινικά ευρήματα.

ImmLiSa Enhanced™ Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά του ΡΡ: Μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) για την ποιοτική ή ημιποσοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG κατά του ρευματοειδή παράγοντα (ΡΡ) στον ανθρώπινο ορό ως επικουρικό μέσο για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (ΡΑ) σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακές εξετάσεις και κλινικά ευρήματα.

ImmLiSa Enhanced™ Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgM κατά του ΡΡ: Μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) για την ποιοτική ή ημιποσοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgM κατά του ρευματοειδή παράγοντα (ΡΡ) στον ανθρώπινο ορό ως επικουρικό μέσο για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (ΡΑ) σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακές εξετάσεις και κλινικά ευρήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η μέτρηση του RF είναι σημαντική στη διάγνωση και πρόγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, καθώς υψηλό τίτλο RF εμφανίζονται σε ορούς ασθενών που τείνουν να αναπτύξουν εξω-αρθρικές επιπλοκές.^{1,2} Η πλειοψηφία των κλασικών εργαστηριακών δοκιμών μετρούν τον IgM RF από την ικανότητά του να συγκολλά κύτταρα ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου, λατέξ ή παρόμοια σωματίδια επενδεδυμένα με IgG.¹⁻⁴ Ωστόσο, οι μελέτες υπαινίσσονται ότι ο RF άλλων ισότυπων ανοσοσφαιρίνης είναι επίσης παρών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁵⁻⁹

Ο ρευματοειδής παράγοντας (ΡΡ) είναι παρών σε ποσοστό 70-90% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και συμπεριλαμβάνεται στα κριτήρια ταξινόμησης της νόσου.¹⁰ Σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια της Αμερικανικής Ρευματολογικής Εταιρείας (ARA), ένα χαμηλό θετικό αποτέλεσμα για τον ΡΡ συνεισφέρει 2 από τους 6 βαθμούς που απαιτούνται για να ταξινομηθεί η ΡΑ ως βέβαιη, ενώ ένα υψηλό θετικό αποτέλεσμα για τον ΡΡ συνεισφέρει 3 από τους 6 βαθμούς.

Ο RF όπως ανιχνεύεται με συγκόλληση είναι ισότυπο από IgM. Άλλες μέθοδοι, όπως η ELISA, έχουν βελτιωμένη ιδιαιτερότητα, ευαισθησία και αξιοπιστία επί των υφισταμένων και κλασικά χρησιμοποιούμενων μεθόδων συγκόλλησης.³⁻⁵ Οι μέθοδοι ELISA μπορούν να ανιχνεύσουν τον RF διάφορων ισότυπων ανοσοσφαιρίνης. Αυτή η διάκριση δεν είναι δυνατή με τις παραδοσιακές

δοκιμές συγκόλλησης. Σημαντικά επίπεδα ισότυπου RF που συνήθως βρίσκεται σε ρευματικές νόσους και ανηψώσεις διάφορων ισότυπων μαζί είναι σχεδόν διαγνωστικό για ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁸ Ο συνδυασμός αποτελεσμάτων για τα αντισώματα IgM, IgG και IgA κατά του ΡF αυξάνει την ευαισθησία για τη ΡΑ συγκριτικά με τα αποτελέσματα που αφορούν μόνο τα αντισώματα IgM κατά του ΡF.⁹

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα βυθίσματα (microwells) επενδύονται με καθαρό IgG κουνελιού και ακολουθεί το βήμα μπλοκαρίσματος για τη μείωση μη ειδικής δέσμησης κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της δοκιμασίας. Έλεγχοι, βαθμονομητές και οροί ασθενών επωάζονται στα επενδεδυμένα βυθίσματα αντιγόνου για να επιτραπεί σε συγκεκριμένα αντισώματα παρόντα στον ορό να δεσμεύουν το αντιγόνο. Αδέσμευτα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού αφαιρούνται με την πλύση των βυθισμάτων. Δεσμευμένα αντισώματα ανιχνεύονται προσθέτοντας σύζευξη ανθρωπίνης αντι-ανοσοσφαιρίνης IgA, IgG ή IgM στα βυθίσματα. Η αδέσμευτη σύζευξη απομακρύνεται με την πλύση. Συγκεκριμένο υπόστρωμα ενζύμου (TMB) προστίθεται στη συνέχεια στις κοιλότητες και η παρουσία αντισωμάτων ανιχνεύεται με χρωματική αλλαγή που παράγεται από την μετατροπή του υποστρώματος TMB σε προϊόν χρωματικής αντίδρασης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ακεραιότητα της χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη με την πυκνότητα του αντισώματος, διαβάζεται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) για RF IgA και RF IgG και Διεθνείς Μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (IU/ml) για RF IgM και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθήκευση και Προετοιμασία

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης, όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ίζημα παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φοράς. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες ανοιχτών kit με υλικά/αντιδραστήρια και καταδεικνύουν σταθερότητα επί διάστημα τουλάχιστον 30 ημερών.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, τα προερχόμενα από τον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από δοκιμασίες που απαιτούνται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρωπίνου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.¹⁰

Το Διάλυμα Παύσης είναι διάλυμα αραιωμένου θειικού οξέως. Το θειικό οξύ (H₂SO₄) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το φάτε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Αποφύγετε την έκθεση σε βάσεις, μέταλλα ή άλλες ενώσεις που μπορεί να αντιδρούν με οξέα.

Το Υπόστρωμα Ενζύμου TMB περιέχει μια ερεθιστική ουσία που μπορεί να είναι επιβλαβής αν την εισπνεύσετε, την φάτε ή απορροφηθεί μέσω του δέρματος. Μην το φάτε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος κιτ για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην εναλλάσσετε στοιχεία του κιτ με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλο-μόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείτε στοιχεία του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Προσοχή: Η ομοσπονδιακή νομοθεσία των ΗΠΑ επιτρέπει την πώληση του προϊόντος αυτού αποκλειστικά από ιατρό ή κατόπιν εντολής ιατρού.

Υλικά που παρασχέθηκαν

ImmLiSa™ RF IgA ELISA

REF	5138A
-----	-------

ImmLiSa™ RF IgG ELISA

REF	5138G
-----	-------

ImmLiSa™ RF IgM ELISA

REF	5138M
-----	-------

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένο με καθαρό αντιγόνο IgG κουνελιού. Έτοιμο προς χρήση.

1 x 1.75 ml

Έτοιμος προς χρήση **Θετικός Έλεγχος (Positive Control)** (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για RF IgA. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml

Έτοιμος προς χρήση **Θετικός Έλεγχος (Positive Control)** (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για RF IgG. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml

Έτοιμος προς χρήση **Θετικός Έλεγχος (Positive Control)** (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για RF IgM. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε IU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml

Έτοιμος προς χρήση **Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control)** (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.

5 x 1.75 ml

Έτοιμο προς χρήση σε 5 **Βαθμονομητών**. Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής B (μωβ πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml και Βαθμονομητής E (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα RF IgA. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.

5 x 1.75 ml

Έτοιμο προς χρήση σε 5 **Βαθμονομητών**. Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής B (μωβ πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml και

EL

	CALIBRATOR D RFG CALIBRATOR E RFG	Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα RF IgG. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFM CALIBRATOR B RFM CALIBRATOR C RFM CALIBRATOR D RFM CALIBRATOR E RFM	Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών . Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 80 IU/ml, Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 40 IU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 20 IU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 10 IU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 IU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα RF IgM. Συγκεντρώσεις σε IU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα (HRP goat anti-human IgA Conjugate). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένη με ροζ χρώμα.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από κουνέλι (HRP goat anti-human IgG Conjugate). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένη με ροζ χρώμα.
1 x 15 ml	IgM-CONJ HRP	Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα (HRP goat anti-human IgM Conjugate). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένη με ροζ χρώμα.
1 x 60 ml	DIL	Αραιωτικό διάλυμα ορού (Serum Diluent). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με μωβ χρώμα.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB enzyme substrate). Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψτε από το φως.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμο προς χρήση.
2 x vials	BUF WASH	Διάλυμα Πλύσης σε μορφή Σκόνης (Powder Wash Buffer). Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο έκαστο.
1 x		Φύλλα Πρωτοκόλλου
Προαιρετικά Συστατικά		
1 x 60ml	BUF WASH	Υγρό συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	Για in vitro διαγνωστική χρήση



Ημερομηνία λήξης



Θερμοκρασία αποθήκευσης



Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση



Αριθμός δοκιμών



Κατασκευαστής

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπετών (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την ανάγνωση τιμών απορροφητικότητας στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος αναγνώστης μικροπλάκας διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να οριστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλάκας ικανό να διανέμει 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια δοκιμασίας να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Προτείνεται τα αντιδραστήρια να παραμείνουν στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν τη χρήση. Βάζετε πίσω όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρείτε τις απαιτούμενες λωρίδες βυθισμάτων από τη σακούλα και προσεκτικά σφραγίζετε ξανά τη σακούλα για να αποφύγετε υγραποίηση στα μη χρησιμοποιηθέντα βυθίσματα. Βάζετε τη σακούλα πίσω στο ψυγείο αμέσως.
- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Αν η πλύση εκτελείται με το χέρι, η σωστή πλύση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας δυνατή ροή διαλύματος πλύσης με φιάλη πλύσης με ανοιχτό στόμιο σε ολόκληρη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.**

- Χρησιμοποιείτε πολυκάναλη πιπέτα ικανή να απελευθερώνει 8 ή 12 κοιλότητες ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει χρόνους πιο ομοιόμορφης επώασης.
- Σε όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος χρονισμού είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης γίνεται με την ολοκλήρωση της προσθήκης αντιδραστήριου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και την ίδια ακολουθία.

Μέθοδος Δοκιμής

Βήμα 1 Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 2 Τοποθετείτε ετικέτα στο φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση δείγματος στις κοιλότητες. Αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική να εκτελείτε τα δείγματα εις διπλούν.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τον Βαθμονομητή Δ (*φιαλίδιο με κίτρινο πώμα*) μόνο.

ή

Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους Βαθμονομητές Α έως Ε, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διάταξη δείγματος.

	Ποιοτικός				Ημι-Ποσοτικός		
A	Κενός	S5	Κ.λπ.	A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-Έλεγχος	S6		B	-Έλεγχος	S2	
C	+	S7		C	+ Έλεγχος	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Βήμα 4 Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500ul** Ορού Αραίωσης.

Βήμα 5 Αφαιρείτε τα απαιτούμενα βυθίσματα από το σάκο και βάζετε πίσω τις λωρίδες που δεν έχετε χρησιμοποιήσει στη σφραγισμένη σακούλα στο ψυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.

Βήμα 6 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** τους Έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές, τους Θετικούς και Αρνητικούς ελέγχους και τα αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στα κατάλληλα βυθίσματα σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλλου.

Σημείωση: Συμπεριλαμβάνετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίζετε την συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστήριου.

Βήμα 7 Επιδράζετε για **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 8 Ξεπλύνετε **4x** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίζετε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάξτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή αναροφώντας το υγρό από κάθε κοιλότητα. Για να κάνετε αποτύπωση στο τέλος της τελευταίας πλύσης, αναστρέψτε τις λωρίδες και κτυπήστε τις κοιλότητες έντονα πάνω σε απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες. Για

αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βήμα 9 Διανέμετε με πιπέτα **100 μl** Σύζευξης σε βυθίσματα.

Βήμα 10 Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 11 Ξεπλύνετε όλα τα βυθίσματα όπως περιγράφεται στο Βήμα 8.

Βήμα 12 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για τη Σύζευξη.

Βήμα 13 Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 14 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Διαλύματος Παύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του Ενζυμικού Υποστρώματος. Διαβάζετε τις τιμές απορροφητικότητας εντός **30 λεπτών** από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.

Βήμα 15 Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βυθίσματος σε **450 nm** χρησιμοποιώντας μονού ή στα 450/630nm χρησιμοποιώντας διπλού μήκους κύματος συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας έναντι του σερ κενού αντιδραστήριου σε μηδενική απορροφητικότητα.

Ποιοτικός Έλεγχος

Η εκτέλεση των μέσων βαθμονόμησης, των δειγμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και ενός τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να γίνεται με κάθε ανάλυση για την εξακρίβωση της ακεραιότητας και ακρίβειας της δοκιμασίας. Η ένδειξη απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι $<0,3$. Το μέσο βαθμονόμησης A θα πρέπει να έχει ένδειξη απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Το δείγμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να έχει τιμή <10 EU/ml για τα αντισώματα IgA και IgG και κάτω από 5 IU/ml για τα IgM. Κατά την εκτέλεση ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του μέσου βαθμονόμησης D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του δείγματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορρόφηση του δείγματος θετικού ελέγχου. Για ημιποσοτικούς προσδιορισμούς, το δείγμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός της περιοχής τιμών που δηλώνεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

----- X Μονάδα Βαθμονομητή Δ = Δείγμα Μονάδας Δοκιμής*

Απορ. Βαθμονομητή Δ

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

Σημείωση: Οι μονάδες για RF IgA και IgG είναι EU/ml. Οι μονάδες για IgM είναι IU/ml

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε U/ml στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας EU/ml ή IU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή απλών δοτών αίματος και δειγμάτων ελέγχου νόσου μη ρευματοειδούς αρθρίτιδας (n=147 IgA, 144 IgG και 142 IgM). Ο μέσος όρος των συνήθων αντικειμένων συν 2SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας για IgA και καθόρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Ο μέσος όρος των συνήθων αντικειμένων συν 2SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας για IgG και καθόρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Ο μέσος όρος των συνήθων αντικειμένων συν 2.5SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας για IgM και καθόρισε την τιμή των 10 IU/ml. Η IMMCO προτείνει τη χρήση του παρακάτω εύρους αναφοράς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώνει τις τιμές δοκιμασίας για τις δικές τους συνθήκες.

Τιμή RF IgA ή IgG	Τιμή RF IgM	Ερμηνεία
<20 EU/ml	<10 IU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	10-12,5 IU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>25 EU/ml	>12,5 IU/ml	Θετικό

Βαθμονομητής

Τα έτοιμα προς χρήση μέσα βαθμονόμησης συμπεριλαμβάνονται για να παρέχουν ημιποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε εκτέλεση. Τα δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες από εκείνη του μέσου βαθμονόμησης Α.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία δεν θα πρέπει να εκτελείται σε αιμολυμένα, βακτηριδιακά επιμολυσμένα ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δειγμάτων ανθρώπινου ορού μόνον. Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν εξυπηρετούν μόνο ως βοήθημα στη διάγνωση. Μόνα τους, αυτά τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως διαγνωστικά.

ANAMENOMENES TIMES

Η δοκιμή ELISA για RF έχει διαπιστωθεί ότι είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη από τις συμβατικές δοκιμασίες συγκόλλησης. Περίπου το 90% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν ανυψωμένο RF από το σύστημα ELISA σε σύγκριση με περίπου 70% από συγκόλληση.⁷ Οι περισσότεροι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν ανύψωση 2 ή περισσότερων ισότυπων RF σε σύγκριση με άλλες ρευματικές νόσους όπως σθητηματικός ερυθηματώδης λύκος. Επιπρόσθετως, ασθενείς με ρευματοειδή έχουν υψηλότερα επίπεδα RF σε σύγκριση με άλλες ρευματικές ασθένειες. Οι ακόλουθοι πίνακες συνοψίζουν τη

σπουδαιότητα διάφορων ισότυπων RF^{9,12}. Στους παρακάτω πίνακες συνοψίζονται τα ποσοστά επιπολασμού του ΡΓ που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Διαγνωστική Αξία Διάφορων Ισότυπων RF^{8,9}

Ισότυπο RF	επικράτηση
IgM	66%
IgG	44%
IgA	51%
IgM/IgG/IgA	70-90%

Συχνότητα εμφάνισης RF σε Ασθενείς με Ρευματικές Νόσους^{6,10,12-22}

Σύνδρομο Sjogren	60%
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	35%
Συστηματική σκλήρυνση	25%
Μεικτή νόσος του συνδετικού ιστού	15%
Νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα	15%
Πολυμοσσίτιδα/δερματομυοσίτιδα	10%

Σετ κλινικών δειγμάτων δοκιμάστηκαν στις μεθόδους Immulisa™ RF ELISAs. Τα αποτελέσματα που καταδεικνύουν επίπτωση στους πληθυσμούς για την μελέτη αυτή παρέχονται κατωτέρω.

Ομάδα Ασθενών	n	IgA	n	IgG	n	IgM
		n Θετ. (%)		% Θετ. (%)		% Θετ. (%)
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	249	131 (52.6%)	249	126 (50.6%)	249	176 (70.7%)
Νεανική αρθρίτιδα	10	0	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Οστεοαρθρίτιδα	30	0	30	0	30	1 (3.3%)
Ψωριασική αρθρίτιδα	33	2 (6.1%)	33	3 (9.1%)	33	2 (6.1%)
Σπονδυλαρθρίτιδα	33	1 (3%)	33	0	33	1 (3.3%)
Σύνδρομο Churg-Strauss	10	1 (10%)	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Μεικτή νόσος συνδετικού ιστού	10	1 (10%)	10	2 (20%)	10	4 (40%)
Σύνδρομο Sjogren	20	9 45%	20	2 (10%)	20	11 (55%)
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	30	11 (36.7%)	30	6 (20%)	30	5 (16.7%)
Συστηματική σκλήρυνση	20	3 (15%)	20	4 (20%)	20	5 (25%)
Νόσος του Wegener	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)
Διάφορες αυτοάνοσες διαταραχές*	36	0	36	2 (5.6%)	36	1 (2.8%)
Διάφορα λοιμώδη νοσήματα**	70	4 (5.7%)	70	1 (1.4%)	70	6 (8.6%)
Υγιή φυσιολογικά άτομα	122	5 (4.1%)	120	7 (5.8%)	144	5 (3.5%)

* συμπεριλαμβάνονται: κοιλιοκάκη (8), νόσος του Graves (10), θυρεοειδίτιδα του Hashimoto (8), ελκώδης κολίτιδα (10)

** συμπεριλαμβάνονται: σύφιλη (10), ερυθρά (10), μονοπυρήνωση (5), νόσος του Lyme (5), λοίμωξη από τον HCV (10), λοίμωξη από τον CMV (10), λοίμωξη από τον HSV (10), τοξοπλάσμωση (10)

Η κλινική ευαισθησία και ειδικότητα για τη PA με τη χρήση αυτών των αναλύσεων συνοψίζεται παρακάτω*:

IgA κατά του ΡΠ		IgG κατά του ΡΠ		IgM κατά του ΡΠ	
Ευαισθησία	Ειδικότητα	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Ευαισθησία	Ειδικότητα
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα των ImmuLisa™ RF ELISAs αξιολογήθηκε με δοκιμή καλώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων ρευματοειδούς αρθρίτιδας μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινου ορού. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. Σύγκριση Μεθόδου: ImmuLisa™ RF ELISAs έναντι άλλων RF antibody ELISAs.

Άλλο RF IgA ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	113	9	122
RF IgA	Αρνητικό	5	250	255
ELISA	Σύνολο	118	259	377

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 95.8% (95% CI 89.9% - 98.4%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 96.5% (95% CI 93.3% - 98.3%)

Συμφωνία Γενικού Ποσοστού: 96.3% (95% CI 93.7% - 97.9%)

Νόσος Συσχετιζόμενη: 147

Έλεγχος Νόσων: 230

Άλλο RF IgG ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	88	24	112
RF IgG	Αρνητικό	7	271	278
ELISA	Σύνολο	95	295	390

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 92.6% (95% CI 84.9% - 96.7%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 91.9% (95% CI 88.0% - 94.6%)

Συμφωνία Γενικού Ποσοστού: 92.9% (95% CI 88.8% - 94.5%)

Νόσος Συσχετιζόμενη: 154

Έλεγχος Νόσων: 236

Άλλο RF IgM ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	124	16	140
RF IgM	Αρνητικό	4	235	239
ELISA	Σύνολο	128	251	379

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 96.9% (95% CI 91.7% - 99.0%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 93.6% (95% CI 89.7% - 96.2%)

Συμφωνία Γενικού Ποσοστού: 94.7% (95% CI 91.8% - 96.7%)

Νόσος Συσχετιζόμενη: 139

Έλεγχος Νόσων: 239

B. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα: Εξετάστηκαν συνολικά 106 δείγματα με πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, προερχόμενα από άτομα με αυτοάνοσες διαταραχές και λοιμώδη νοσήματα για τα οποία δεν έχει αναφερθεί υψηλή επίπτωση αυτοαντισωμάτων κατά του ρευματοειδή παράγοντα (ΡΓ), με χρήση των μεθόδων ELISA ImmuLisa™ ΡΠ.

Πάθηση	IgA		IgG		IgM	
	n	n Θετ. (%)	n	n Θετ. (%)	n	n Θετ. (%)
Κοιλιοκάκη	8	0	8	0	8	0
Νόσος του Graves	10	0	10	1 (10.0%)	10	1 (10.0%)
Θυρεοειδίτιδα του Hashimoto	8	0	8	0	8	0
Ελκώδης κολίτιδα	10	0	10	1 (10.0%)	10	0
Σύφιλη	10	0	10	0	10	0
Ερυθρά	10	0	10	0	10	1 (10.0%)
Μονοπυρήνωση	5	1 (20.0%)	5	0	5	0
Νόσος του Lyme	5	0	5	0	5	0
Λοίμωξη από τον HCV	10	1 (10%)	10	1 (10.0%)	10	2 (20.0%)
Λοίμωξη από τον CMV	10	0	10	0	10	0
Λοίμωξη από τον HSV	10	1 (10%)	10	0	10	2 (20.0%)
Τοξοπλάσμωση	10	1 (10%)	10	0	10	1 (10.0%)
Σύνολο	106	4 (3.8%)	106	3 (2.8%)	106	7 (6.6%)

Ακρίβεια

Η ακρίβεια εξετάστηκε με 7 θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από ολόκληρο το εύρος της μεθόδου για τον κάθε ισότυπο. Οι εκτελέσεις ανάλυσης των 6 επαναλήψεων από το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 21 ημερών περίπου. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 12 επαναλήψεις από κάθε δείγμα.

Δείγμα	Μέσος όρος (μονάδες /ml)	Ολική Ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
		SD (μονάδες /ml)	CV%	SD (μονάδες /ml)	CV%	SD (μονάδες /ml)	CV%
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%
IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%

IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%
IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Ποσοτική αναπαραγωγιμότητα

Ενενήντα επαναλήψεις δειγμάτων στο αρνητικό εύρος, ~20% κάτω από την οριακή τιμή αποκοπής, ~20% πάνω από την οριακή τιμή αποκοπής και στο μέτρια θετικό εύρος της ανάλυσης εκτελέστηκαν για να διαπιστωθεί η ποιοτική αναπαραγωγιμότητα για τον κάθε ισότυπο. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν σε πολλαπλές εκτελέσεις. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για κάθε δείγμα παρήγαγαν 100% ποιοτική συμφωνία.

Όριο Ανίχνευσης

Τα όρια ανίχνευσης (LoD) για αντίσωμα RF με τη χρήση αυτών των δοκιμασιών καθορίστηκαν να είναι 3,7 EU/ml για IgA, 2,2 EU/ml για IgG και 1,3 IU/ml για IgM επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από of 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS).

Γραμμικότητα

Εκτελέστηκαν μελέτες με τη χρήση ισαπέχουσας αραιώσης σειράς θετικών δειγμάτων με τιμές σε όλο το εύρος του βαθμονομητή για να προσδιορίσει το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας. Το γραμμικό εύρος του RF IgA καθορίστηκε να είναι 3,3 – 160 EU/ml. Το γραμμικό εύρος του RF IgG καθορίστηκε να είναι 2,6 – 160 EU/ml. Το γραμμικό εύρος του RF IgM καθορίστηκε να είναι 1,2 – 80 IU/ml. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω. Συνιστάται τα δείγματα που παράγουν αποτελέσματα μεγαλύτερα από τον κορυφαίο βαθμονομητή να αραιώνονται και επανεξετάζονται.

Δείγμα	Εύρος Δοκιμής (μονάδες/ml)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R ²	% Ανάκαμψη
IgA 1	4,8 έως 13,7	0,96 (0,86 έως 1,06)	0,83 (-0,12 έως 1,77)	1,00	91,2 έως 100,0
IgA 2	10,5 έως 64,9	0,96 (0,84 έως 1,109)	3,66 (-1,16 έως 8,48)	0,98	83,4 έως 101,3
IgA 3	17,3 έως 155,0	1,00 (0,88 έως 1,14)	2,55 (-9,4 έως 14,5)	0,99	88,0 έως 104,1
IgG 1	3,6 έως 13,8	1,00 (0,92 έως 1,08)	0,33 (-0,40 έως 1,107)	1,00	99,2 έως 100,9
IgG 2	7,0 έως 68,7	1,01 (0,89 έως 1,12)	1,81 (-2,85 έως 6,47)	0,99	87,5 έως 100,0
IgG 3	16,1 έως 154,7	1,07 (0,95 έως 1,20)	-1,59 (-13,3 έως 10,2)	1,00	88,2 έως 105,6
IgM 1	2,0 έως 8,1	0,97 (0,82 έως 1,26)	0,50 (-2,60 έως 1,25)	0,99	83,0 έως 102,3
IgM 2	8,1 έως 61,4	0,96	1,43	1,00	87,0 έως

EL

		(0,91 έως 1,01)	(-0,56 έως 3,43)		103,1
		1,00	2,24		89,4 έως
IgM 3	13,0 έως 73,3	(0,84 έως 1,15)	(-4,88 έως 9,36)	1,00	100,0

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα RF ισότυπων με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), Χοληστερόλη (13 mmol/L) και Τριγλυκερίδια (37 mmol/L). Παρατηρήθηκε ότι δείγματα με προσθήκη χολερυθρίνης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων επέδειξαν έως +10% μεγαλύτερη διαφορά από τον αναμενόμενο εκατοστιαίο συντελεστή διακύμανσης για αυτές τις αναλύσεις. Σημειώστε ότι οι απαιτήσεις δειγμάτων παρατίθενται στην παράγραφο



ImmuliTM Enhanced RF ELISAs

Detección del factor reumatoide (FR) IgA, IgG o IgM

IVD Para utilización de diagnóstico *in vitro*

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF	5138A	RF IgA ELISA	96 Determinaciones
REF	5138G	RF IgG ELISA	96 Determinaciones
REF	5138M	RF IgM ELISA	96 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

ImmuliTM Enhanced Anticuerpo IgA RF ELISA: Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para la detección cualitativa o semicuantitativa de anticuerpos del Factor Reumatoide IgA en suero humano para ayudar en el diagnóstico de la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés) en conjunción con otras pruebas de laboratorio y hallazgos clínicos.

ImmuliTM Enhanced Anticuerpo IgG RF ELISA: Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para la detección cualitativa o semicuantitativa de anticuerpos del Factor Reumatoide IgG en suero humano para ayudar en el diagnóstico de la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés) en conjunción con otras pruebas de laboratorio y hallazgos clínicos.

ImmuliTM Enhanced Anticuerpo IgM RF ELISA: Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para la detección cualitativa o semicuantitativa de anticuerpos del Factor Reumatoide IgM en suero humano para ayudar en el diagnóstico de la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés) en conjunción con otras pruebas de laboratorio y hallazgos clínicos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La medición del FR es importante en el diagnóstico y el pronóstico de la artritis reumatoide, ya que tienen lugar unos títulos elevados de FR en el suero de pacientes que tienden a desarrollar complicaciones extraarticulares.^{1,2} La mayoría de análisis rutinarios de laboratorio miden el FR IgM por su habilidad de aglutinar glóbulos rojos de oveja, látex o partículas similares revestidas con IgG.¹⁻⁴ Sin embargo, los estudios sugieren que el FR y otros isotipos de inmunoglobulina también están presentes en la artritis reumatoide.⁵⁻⁹

El Factor Reumatoide (RF, por sus siglas en inglés) está presente en el 70-90% de los pacientes con artritis reumatoide y está incluido en los criterios de clasificación.¹⁰ De acuerdo con los criterios revisados de la Asociación Estadounidense de Reumatismo (ARA, por sus siglas en inglés), un resultado bajo de RF positivo contribuye en 2 de 6 puntos y un alto RF positivo contribuye en 3 de 6 puntos para la clasificación de la RA definida.

El FR se detecta por la aglutinación del isotipo IgM. Otros métodos como los ensayos ELISA presentan una mayor especificidad, sensibilidad y fiabilidad en comparación con otros métodos de aglutinación existentes y utilizados habitualmente.³⁻⁵ Los métodos ELISA pueden detectar el FR de varios isotipos de inmunoglobulina. Esa distinción no es posible con los análisis de aglutinación tradicionales. Unos niveles significativos de un isotipo de FR encontrado habitualmente en las enfermedades reumatoides y niveles elevados de varios isotipos juntos equivale casi al diagnóstico de la artritis reumatoide.⁸ Una

combinación de los resultados IgM, IgG e IgA RF aumenta la sensibilidad para la RA en comparación con sólo los resultados de IgM RF.⁹

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los micropocillos son recubiertos con IgG de conejo purificado y a continuación se realiza una fase de bloqueo para reducir los vínculos no específicos durante el ensayo. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y el suero del paciente para que los anticuerpos específicos puedan presentarse en el suero para unirse al antígeno. Los anticuerpos separados y otras proteínas del suero son eliminados lavando los micropocillos. Se detectan los anticuerpos unidos añadiendo a los micropocillos una enzima etiquetada conjugado anti-humano IgA, IgG o IgM. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados se expresan en Unidades ELISA por milímetro (EU/ml) para FR IgA y FR IgG y Unidades Internacionales por milímetro (IU/ml) para FR IgM y se consignan como positivos o negativos.

REACTIVOS

Almacenamiento y preparación

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

Estudios de kit abiertos se han realizado con materiales/reactivos y demuestran estabilidad en el transcurso de un mínimo de 30 días.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.¹⁰

La solución de parada es una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico (H₂SO₄) es venenoso y corrosivo. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos. Evite exponerlo a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con ácidos.

El sustrato de enzima TMB contiene un irritante que puede resultar nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos.

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de

fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

Precaución: La ley federal de los Estados Unidos restringe la venta de este dispositivo por medio de o con una orden de un médico con licencia.

Materiales proporcionados

ImmLisa™ RF IgA ELISA

REF 5138A

ImmLisa™ RF IgG ELISA

REF 5138G

ImmLisa™ RF IgM ELISA

REF 5138M

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8 **MICROPLATE****RF**

Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Revestida con un antígeno de conejo IgG purificado. Lista para su utilización.

1 x 1.75 ml **CONTROL****+****RFA**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*). Contiene suero humano positivo en FR IgA. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml **CONTROL****+****RFG**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*). Contiene suero humano positivo en FR IgG. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml **CONTROL****+****RFM**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*). Contiene suero humano positivo en FR IgM. El registro de concentración esperado en IU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml **CONTROL****-**

Control Negativo listo para su utilización (*tapón blanco*). Contiene suero humano.

5 x 1.75 ml **CALIBRATOR****A****RFA**

CALIBRATOR**B****RFA**

CALIBRATOR**C****RFA**

CALIBRATOR**D****RFA**

CALIBRATOR**E****RFA**

Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (tapón verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tapón violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tapón azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tapón amarillo) 20 EU/ml, y Calibrador E (tapón naranja) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos FR IgA. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.

5 x 1.75 ml **CALIBRATOR****A****RFG**

CALIBRATOR**B****RFG**

CALIBRATOR**C****RFG**

CALIBRATOR**D****RFG**

CALIBRATOR**E****RFG**

Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (tapón verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tapón violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tapón azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tapón amarillo) 20 EU/ml, y Calibrador E (tapón naranja) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos FR IgG. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.

5 x 1.75 ml **CALIBRATOR****A****RFM**

CALIBRATOR**B****RFM**

CALIBRATOR**C****RFM**

Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (tapón verde) 80 IU/ml, Calibrador B (tapón violeta) 40 IU/ml, Calibrador C (tapón azul) 20 IU/ml, Calibrador D (tapón amarillo) 10 IU/ml, y Calibrador E (tapón naranja)






ES

	CALIBRATOR D RFM	1 IU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos FR IgM. Las concentraciones en IU/ml están impresas en las etiquetas.
	CALIBRATOR E RFM	
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Conjugado IgA antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado IgG antihumano de conejo HRP. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 15 ml	IgM-CONJ HRP	Conjugado IgM antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color morado.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. Proteger de la luz.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solución de parada. Lista para su utilización.
2 x vials	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir a un litro cada uno.
1 x		Hojas de protocolo

Componentes opcionales

1 x 60ml	BUF WASH	Tampón de lavado líquido concentrado. Reconstituir a un litro.
----------	-----------------	---

Símbolos utilizados en las etiquetas

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
IVD	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Leer las instrucciones antes de utilizar
	Número de análisis
	Fabricante

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Lavador de microplaca automático capaz de suministrar 200 µl

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Le sugerimos que deje los reactivos sobre la mesa de trabajo y fuera de la caja unos 30 minutos antes de su utilización. Vuelva a meter todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.
- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- **Una buena técnica de lavado es fundamental.** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. **Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.**
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

Método de análisis

- Paso 1** Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.
- Paso 2** Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

o

Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

Cualitativa			
A	Base	S5	Etc.
B	-Control	S6	
C	+ Control	S7	

Semi-cuantitativa			
A	Base	S1	Etc.
B	-Control	S2	
C	+ Control	S3	

D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
P	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	

1 2 3

D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
P	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	

1 2 3

- Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500ul** de Diluyente de Suero.
- Paso 5** Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.
- Paso 6** Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.
- Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.
- Paso 7** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.
- Paso 10** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.
- Paso 12** Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.
- Paso 13** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.
- Paso 15** Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y un blanco de reactivo deben ejecutarse con cada ensayo con el fin de verificar la integridad y exactitud de la prueba. La lectura de la absorbancia del blanco de reactivo debe ser $<0,3$. El Calibrador A debe tener una lectura de absorbancia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <10 UE/ml para IgA e IgG y menos de 5 UI/ml para IgM. Durante la realización de determinaciones Cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbancia del control positivo. Para las determinaciones semi-cuantitativas el control positivo debe dar valores en la gama indicada en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

$$\frac{\text{Abs. muestra de análisis}}{\text{Abs. de Calibrador D}} \times \text{Unidad de Calibrador D} = \text{Muestra de análisis de unidades*}$$

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son “positivos” o “negativos”. Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

Nota: Las unidades para FR IgA e IgG son EU/ml. Las unidades para IgM son IU/ml.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbencia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en U/ml en el eje X y la absorbencia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son “positivos”, “negativos” o “indeterminados” con valores en unidades EU/ml o IU/ml. Los resultados indeterminados/al límite deberían ser analizados de nuevo y evaluados con otros métodos de laboratorio.

Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron analizando muestras de donantes de sangre normales y sin artritis reumatoide (n=147 IgA, 144 IgG y 142 IgM). La media de los sujetos normales más 2 SD fue establecida como límite del ensayo para el isotipo IgA y se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. La media de los sujetos normales más 2 SD fue establecida como límite del ensayo para el isotipo IgG y se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. La media de los sujetos normales más 2,5 SD fue establecida como límite del ensayo para el isotipo IgM y se le asignó un valor de 10 IU/ml. IMMCO recomienda la utilización del registro de referencia siguiente. Cada laboratorio debería validar los valores del ensayo para sus propias condiciones.

Valor FR IgA o IgG	Valor FR IgM	Interpretación
<20 EU/ml	<10 IU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	10-12,5 IU/ml	Indeterminado (Límite)
>25 EU/ml	>12,5 IU/ml	Positivo

Calibrador

Los Calibradores Listos para Usar están incluidos para proporcionar la semi-cuantificación y deben ser utilizados con cada ejecución. Las muestras de pacientes que contienen altos niveles de anticuerpos pueden dar valores de absorbancia mayor que la del calibrador A.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo no debería ser realizado en muestras muy hemolizadas, con contaminación microbiana o lipémicas. Este método debería ser utilizado únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos solo sirven como ayuda en el diagnóstico. Independientemente, estos resultados no deberían ser interpretados como diagnóstico.

VALORES ESPERADOS

Los análisis ELISA para FR han demostrado ser bastante más sensibles que los análisis de aglutinación convencionales. Aproximadamente el 90% de los pacientes con artritis reumatoide tiene un FR elevado por el sistema ELISA en comparación con el 70% aproximadamente por aglutinación.⁷ La mayoría de pacientes con artritis reumatoide tienen un aumento de 2 o más isotipos de FR en comparación con otras enfermedades reumáticas como el lupus eritematoso sistémico. Además, los pacientes de artritis reumatoide tienen niveles mayores de FR en comparación con los de otras enfermedades reumáticas. Las tablas siguientes resumen el significado de varios isotipos de FR.^{9,12} Las siguientes tablas resumen la prevalencia de RF reportada en la literatura.

Prevalencia isotipos de FR^{8,9}

Isotipo FR	~Prevalencia (%)
IgM	66
IgG	44
IgA	51
IgM, IgG, and/or IgA	70-90

Incidencia del FR en pacientes con enfermedades reumáticas^{6,10, 12-22}

Síndrome de Sjögren	60%
Lupus eritematoso sistémico	35%
Esclerosis sistémica	25%
Enfermedad mixta del tejido conectivo	15%
Artritis reumatoide juvenil	15%
Polimiositis/dermatomiositis	10%

Se analizaron series de muestras clínicas con los ensayos ELISA Immulisa™ para detección de FR. A continuación incluimos unos resultados que demuestran la incidencia en la población para este estudio:

Grupo de pacientes	IgA		IgG		IgM	
	n	Inc (%)	n	% Inc	n	% Inc
Artritis Reumatoide	249	131 (52.6%)	249	126 (50.6%)	249	176 (70.7%)
Artritis Juvenil	10	0	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Osteoartritis	30	0	30	0	30	1 (3.3%)
Artritis Psoriásica	33	2 (6.1%)	33	3 (9.1%)	33	2 (6.1%)
Espondiloartritis	33	1 (3%)	33	0	33	1 (3.3%)
Churg-Strauss	10	1 (10%)	10	1 (10%)	10	1 (10%)

ES

Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo	10	1 (10%)	10	2 (20%)	10	4 (40%)
Sjögren's	20	9 (45%)	20	2 (10%)	20	11 (55%)
Lupus Eritematoso Sistémico	30	11 (36.7%)	30	6 (20%)	30	5 (16.7%)
Esclerosis Sistémica	20	3 (15%)	20	4 (20%)	20	5 (25%)
Wegener's	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)
Misc AI*	36	0	36	2 (5.6%)	36	1 (2.8%)
Misc ID**	70	4 (5.7%)	70	1 (1.4%)	70	6 (8.6%)
Sano normal	122	5 (4.1%)	120	7 (5.8%)	144	5 (3.5%)

* incluye celíaca (8), Graves (10), Hashimoto (8), colitis ulcerosa (10)

** incluye sífilis (10), rubéola (10), mononucleosis (5), Lyme (5), VHC (10), CMV (10), HSV (10), toxoplasmosis (10)

La sensibilidad y especificidad clínica para la RA usando estos ensayos se resumen a continuación *:

RF IgA		RF IgG		RF IgM	
Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

* Excluye NHS.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA ImmuLisa™ para detección de FR fue evaluada analizando especímenes de suero positivos en artritis reumatoide característicos junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con equipos ELISA disponibles comercialmente. Los resultados se resumen a continuación.

A. Comparación de métodos: ELISA ImmuLisa™ FR en comparación con otras ELISA para anticuerpos FR.

		Otras ELISA FR IgA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	113	9	122
FR IgA	Negativo	5	250	255
ELISA	Total	118	259	377

Concordancia de porcentaje positivo: 95,8% (95% CI 98,9% - 98,4%)

Concordancia de porcentaje negativo: 96,5% (95% CI 93,3% - 98,3%)

Concordancia de porcentaje total: 96,3% (95% CI 93,7% - 97,9%)

Asociado a enfermedades: 147

Control de enfermedades: 230

		Otras ELISA FR IgG		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	88	24	112
FR IgG	Negativo	7	271	278
ELISA	Total	95	295	390

Concordancia de porcentaje positivo: 92,6% (95% CI 84,9% - 96,7%)

Concordancia de porcentaje negativo: 91,9% (95% CI 88,0% - 94,6%)

Concordancia de porcentaje total: 92,1% (95% CI 88,8% - 94,5%)

Asociado a enfermedades: 154

Control de enfermedades: 236

Otras ELISA FR IgM

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	124	16	140
FR IgM	Negativo	4	235	239
ELISA	Total	128	251	379

Concordancia de porcentaje positivo: 96,9% (95% CI 91,7% - 99,0%)

Concordancia de porcentaje negativo: 96,6% (95% CI 89,7% - 96,2%)

Concordancia de porcentaje total: 94,7% (95% CI 91,8% - 96,7%)

Asociado a enfermedades: 135

Control de enfermedades: 239

B. Reactividad Cruzada: Un total de 106 muestras potenciales de reacción cruzada de personas con trastornos autoinmunes y enfermedades infecciosas no reportadas para demostrar la alta incidencia de autoanticuerpos para RF se probaron utilizando la RF ELISA ImmuLisa™.

Enfermedad	IgA		IgG		IgM	
	n	Inc (%)	n	Inc (%)	n	Inc (%)
Enfermedad Celíaca	8	0	8	0	8	0
Graves	10	0	10	1 (10.0%)	10	1 (10.0%)
Hashimoto	8	0	8	0	8	0
Colitis Ulcerosa	10	0	10	1 (10.0%)	10	0
Sífilis	10	0	10	0	10	0
Rubéola	10	0	10	0	10	1 (10.0%)
Mononucleosis	5	1 (20.0%)	5	0	5	0
Lyme	5	0	5	0	5	0
VHC	10	1 (10%)	10	1 (10.0%)	10	2 (20.0%)
CMV	10	0	10	0	10	0
HSV	10	1 (10%)	10	0	10	2 (20.0%)
Toxoplasmosis	10	1 (10%)	10	0	10	1 (10.0%)
Total	106	4 (3.8%)	106	3 (2.8%)	106	7 (6.6%)

Precisión

La precisión fue probada con 7 muestras positivas seleccionadas en todo el rango del ensayo para cada isotipo. Ejecuciones de ensayo de 6 repeticiones de cada muestra se llevaron a cabo durante aproximadamente 21 días. La repetibilidad se determinó con 12 réplicas de cada muestra.

Muestra	Media (unidades/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
		SD (unidades/ml)	CV%	SD (unidades/ml)	CV%	SD (unidades/ml)	CV%
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%

IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%
IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%
IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Reproducibilidad Cualitativa

Noventa réplicas de las muestras en el rango negativo, ~20% por debajo de corte, ~20% por encima de corte y en el rango positivo moderado del ensayo fueron realizadas para determinar la reproducibilidad cualitativa para cada isotipo. Estas muestras fueron probadas en múltiples ejecuciones. Los resultados del ensayo para cada muestra produjeron 100% de concordancia cualitativa.

Límite de detección

Se calculó que los límites de detección (LD) para anticuerpos FR utilizando estos ensayos estaban en 3,7 EU/ml para IgA, 2,2 EU/ml para IgG y 1,3 IU/ml para IgM en base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS).

Linealidad

Se realizaron estudios utilizando series de dilución equidistantes de muestras positivas con valores de todo el ámbito del calibrador para determinar el ámbito lineal del ensayo. El registro lineal del ensayo de FR IgA se fijó en 3,3 – 160 EU/ml. El registro lineal del ensayo de FR IgG se fijó en 2,6 – 160 EU/ml. El registro lineal del ensayo de FR IgM se fijó en 1,2 – 80 IU/ml. Los resultados se resumen a continuación. Sugerimos que las muestras que produzcan resultados superiores al calibrador mayor sean diluidas y analizadas de nuevo.

Muestra	Ámbito del análisis (unidades/ml)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R ²	% Recuperación
IgA 1	4.8 - 13.7	0.96 (0.86 - 1.06)	0.83 (-0.12 - 1.77)	1.00	91.2 - 100.0
IgA 2	10.5 - 64.9	0.96 (0.84 - 1.09)	3.66 (-1.16 - 8.48)	0.98	83.4 - 101.3
IgA 3	17.3 - 155.0	1.00 (0.88 - 1.14)	2.55 (-9.4 - 14.5)	0.99	88.0 - 104.1
IgG 1	3.6 - 13.8	1.00 (0.92 - 1.08)	0.33 (-0.40 - 1.07)	1.00	92.2 - 100.9

ES

IgG 2	7.0 - 68.7	1.01 (0.89 - 1.12)	1.81 (-2.85 - 6.47)	0.99	87.5 – 100.1
IgG 3	16.1 – 154.7	1.07 (0.95 - 1.20)	-1.59 (-13.3 - 10.2)	1.00	88.2 – 105.6
IgM 1	2.0 - 8.1	0.97 (0.82 - 1.26)	-0.50 (-2.60 - 1.25)	0.99	83.0 – 102.3
IgM 2	8.1 - 61.4	0.96 (0.91 - 1.01)	1.43 (-0.56 - 3.43)	1.00	87.6 – 103.1
IgM 3	13.0 – 73.3	1.00 (0.84 - 1.15)	2.24 (-4.88 - 9.36)	1.00	89.4 – 100.0

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de isotipo FR conocidos con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 $\mu\text{mol/L}$), Colesterol (13 mmol/L) y Triglicéridos (37 mmol/L). Se observó que la bilirrubina, el colesterol y los triglicéridos repuntaron en los especímenes demostrando hasta un +10% mayor de diferencia que el coeficiente esperado de varianza porcentual para estos ensayos. Por favor tener en cuenta los requisitos de la muestra que figuran en Limitaciones del Procedimiento.



ImmuLisa™ Enhanced RF ELISAs

Erfassung von IgA, IgG oder IgM Rheumafaktor (HF)

IVD Für in vitro *diagnostischen Gebrauch*

PRODUKTBEILAGE

REF	5138A	RF IgA ELISA	96 Bestimmungen
REF	5138G	RF IgG ELISA	96 Bestimmungen
REF	5138M	RF IgM ELISA	96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

ImmuLisa Enhanced™ RF IgA Antikörper ELISA: Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA) für den qualitativen oder semiquantitativen Nachweis von Rheumafaktor IgA Antikörpern im Humanserum zur Unterstützung bei der Diagnose von Rheumatoidarthritis (RA) in Verbindung mit anderen Labortests und klinischen Befunden.

ImmuLisa Enhanced™ RF IgG Antikörper ELISA: Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA) für den qualitativen oder semiquantitativen Nachweis von Rheumafaktor IgG Antikörpern im Humanserum zur Unterstützung bei der Diagnose von Rheumatoidarthritis (RA) in Verbindung mit anderen Labortests und klinischen Befunden.

ImmuLisa Enhanced™ RF IgM Antikörper ELISA: Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA) für den qualitativen oder semiquantitativen Nachweis von Rheumafaktor IgM Antikörpern im Humanserum zur Unterstützung bei der Diagnose von Rheumatoidarthritis (RA) in Verbindung mit anderen Labortests und klinischen Befunden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Messung von RF ist in der Diagnose und Prognose von Rheumatoidarthritis wichtig, da hohe Titer von RF in Seren von Patienten auftreten, die dazu tendieren, extraartikuläre Komplikationen zu entwickeln.^{1,2} Die Mehrzahl von routinemäßigen Labortests messen IgM RF anhand seiner Fähigkeit, rote Blutkörperchen von Schafen, Milchsaft oder ähnliche mit IgG beschichtete Partikel zu agglutinieren.¹⁻⁴ Jedoch weisen Studien darauf hin, dass RF von anderen Immunglobulin-Isotypen ebenfalls in Rheumatoidarthritis vorhanden ist.⁵⁻⁹

RF ist bei 70-90 % von Patienten mit Rheumatoidarthritis vorhanden und ist in den Klassifizierungskriterien eingeschlossen.¹⁰ Gemäß den überarbeiteten ARA-Kriterien trägt ein niedriges positives RF-Resultat 2 aus 6 Punkten bei und ein hoher positiver RF trägt 3 aus 6 Punkten für die Klassifizierung von definitiver RA bei.

RF, wie erfasst durch die Agglutination, ist vom IgM Isotyp. Andere Verfahren, wie z. B. ELISA, haben die Spezifität, Sensitivität und Zuverlässigkeit gegenüber bestehenden und routinemäßig verwendeten Agglutinationsverfahren verbessert.³⁻⁵ ELISA-Verfahren können RF von verschiedenen Immunglobulin-Isotypen erfassen. Solch eine Unterscheidung ist mit traditionellen Agglutinationstests nicht möglich. Bedeutende Spiegel eines Isotyps von RF, die allgemein bei rheumatischen Krankheiten angetroffen werden, und Erhöhungen von verschiedenen Isotypen sind zusammen für Rheumatoidarthritis beinahe diagnostisch.⁷ Eine Kombination von positivem IgM, IgG und IgA RF weist eine Vorhersagekraft von 96 % verglichen mit 62 % für IgM RF allein auf.⁸ Eine Kombination von Resultaten von IgM, IgG und IgA RF erhöht die Sensitivität für RA im Vergleich mit IgM RF-Resultaten allein.⁹

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Mikrovertiefungen werden mit gereinigtem Kaninchen-IgG beschichtet. Dem folgt ein Blockierungsschritt, um eine nichtspezifische Proteinbindung während des Prüfungsablaufs zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenserum werden in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen inkubiert, um im Serum vorhandenen spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, sich an das Antigen zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serum-Proteine werden durch Waschen der Mikrovertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Hinzufügen von einem enzymmarkierten anti-menschlichen IgA, IgG oder IgM Konjugat zu den Mikrovertiefungen erkannt. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Spezifisches Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch einen Farbwechsel erzeugt durch die Umwandlung des TMB-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt erkannt. Die Reaktion wird gestoppt und die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, wird durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Resultate werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) für RF IgA und RF IgG und Internationale Einheiten pro Millimeter (IU/ml) für RF IgM ausgedrückt und als positiv oder negativ berichtet.

REAGENZIEN

Lagerung und Vorbereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie es nicht, wenn das Reagenz nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch (20-25 °C) auf Raumtemperatur gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Beutel, der Trocknungsmittel enthält, sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8 °C gelagert werden.

Es wurden Studien an offenen Kits mit Materialien/Reagenzien ausgeführt und diese demonstrierten Stabilität über ein Minimum von 30 Tagen.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Komponenten sind auf HBsAg, HCV, HIV 1 und 2 und HTLV-I geprüft und durch erforderliche Tests anhand FDA als negativ festgestellt worden. Menschliche Blutderivate und Patientenproben sollten jedoch als potenziell ansteckend betrachtet werden. Gute Laborpraktiken bei der Lagerung, beim Abgeben und dem Entsorgen dieser Materialien befolgen.¹⁰

Die Stopplösung ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H₂SO₄) ist giftig und ätzend. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Die Exponierung gegenüber Basen, Metallen oder anderen Verbindungen vermeiden, die mit Säuren reagieren können.

TMB-Enzymsubstrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann, wenn er eingeatmet, aufgenommen oder durch die Haut absorbiert wird. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden.

Die Anweisungen wie sie in dieser Kit-Beilage angegeben sind sollten genau befolgt werden, um gültige Resultate sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Gute Laborpraktiken befolgen, um mikrobiische und

DE

Querkontamination von Reagenzien beim Handling zu minimieren. Verwenden Sie die Kit-Komponenten nicht über das auf den Etiketten angegebene Ablaufdatum hinaus.

Vorsicht: Bundesgesetze der Vereinigten Staaten schränken dieses Gerät auf den Verkauf durch einen oder im Auftrag von einem lizenzierten Fachmann ein.

Bereitgestellte Materialien

ImmuLisa™ RF IgA ELISA

REF 5138A

ImmuLisa™ RF IgG ELISA

REF 5138G

ImmuLisa™ RF IgM ELISA

REF 5138M

Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

12 x 8

MICROPLATE|RF

Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit gereinigtem Kaninchen IgG Antigen. Gebrauchsfertig.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|RFA

Einsatzbereite **Positivkontrolle** (roter Verschlussdeckel) Enthält Humanserum positiv für RF IgA. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|RFG

Einsatzbereite **Positivkontrolle** (roter Verschlussdeckel) Enthält Humanserum positiv für RF IgG. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|RFM

Einsatzbereite **Positivkontrolle** (roter Verschlussdeckel) Enthält Humanserum positiv für RF IgM. Der erwartete Konzentrationsbereich in IU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.

1 x 1.75 ml

CONTROL|-

Einsatzbereite **Negativkontrolle** (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|RFA

CALIBRATOR|B|RFA

CALIBRATOR|C|RFA

CALIBRATOR|D|RFA

CALIBRATOR|E|RFA

Einsatzbereiter Satz von 5 **Kalibratoren**. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 160 EU/ml, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 80 EU/ml, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 20 EU/ml und Kalibrator E (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das RF IgA Antikörper enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|RFG

CALIBRATOR|B|RFG

CALIBRATOR|C|RFG

CALIBRATOR|D|RFG

CALIBRATOR|E|RFG

Einsatzbereiter Satz von 5 **Kalibratoren**. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 160 EU/ml, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 80 EU/ml, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 20 EU/ml und Kalibrator E (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das RF IgG Antikörper enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|RFM

CALIBRATOR|B|RFM

CALIBRATOR|C|RFM

Einsatzbereiter Satz von 5 **Kalibratoren**. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 80 IU/ml, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 40 IU/ml, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 20 IU/ml, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 10 IU/ml









DE

	CALIBRATOR D RFM	und Kalibrator E (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 IU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das RF IgM Antikörper enthält. Konzentrationen in IU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.
	CALIBRATOR E RFM	
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP Ziege anti-menschliches IgA Konjugat . Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP-Kaninchen anti-menschliches IgG-Konjugat . Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.
1 x 15 ml	IgM-CONJ HRP	HRP Ziege anti-menschliches IgM Konjugat . Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.
1 x 60 ml	DIL	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbcode violett.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. Vor Licht schützen.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stopp-Lösung. Gebrauchsfertig.
2 x vials	BUF WASH	Pulver Waschpuffer. Zu je einem Liter wiederherstellen.
1 x		Protokollblätter

Optionale Komponenten

1 x 60 ml	BUF WASH	Flüssiger konzentrierter Waschpuffer. Zu einem Liter wiederherstellen.
-----------	-----------------	---

Symbole auf den Etiketten

	Patientennummer
	Katalognummer
	In-vitro-Diagnostik
	Gebrauch durch
	Lagertemperatur
	Anweisungen vor dem Gebrauch lesen
	Anzahl Tests
	Hersteller

Erforderliche Aber Nicht Bereitgestellte Materialien

- Entsalztes oder destilliertes Wasser
- Quetschflasche, um verdünnten Waschpuffer aufzunehmen
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Einwegpipettenspitzen
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Reagenzglasgestell
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher

DE

- Mikroplattenleser, fähig Absorptionswerte bei 450 nm abzulesen. Wenn ein Zweiwellenlängen-Mikroplattenleser verfügbar ist, sollte der Referenzfilter bei 600-650 nm eingestellt werden
- Automatischer Mikroplattenwascher, fähig 200 µl zu dispensieren

PROBENENTNAHME UND HANDLING

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Äußerst hämolysierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8 °C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Es wird empfohlen, dass eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres geprüft werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden.

VERFAHREN

Verfahrens-Hinweise

- Die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durchlesen.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor dem Beginn der Untersuchung vorbereitet werden.
- Die Patientenproben und Testreagenzien auf Raumtemperatur bringen, bevor mit dem Prüfverfahren begonnen wird. Es wird empfohlen, dass Reagenzien vor dem Gebrauch auf dem Labortisch außerhalb des Kastens für 30 Minuten verbleiben. Alle ungebrauchten Proben und Reagenzien sofort nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank stellen.
- Erforderliche Mikrovertiefungsstreifen aus dem Beutel entnehmen und den Beutel sorgfältig wieder versiegeln, um Kondensation in den ungebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank stellen.
- **Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.** Bei manuellem Waschen wird adäquates Waschen dadurch erreicht, dass ein kräftiger Waschpufferstrom mit einer breitspitzigen Spritzflasche über die komplette Mikroplatte gerichtet wird. **Ein automatisierter Mikroplattenwascher wird empfohlen.**
- Eine Mehrkanalpipette verwenden, die 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig versorgen kann. Das beschleunigt den Prozess und ermöglicht einheitlichere Inkubationszeiten.
- Bei allen Schritten ist die sorgfältige Kontrolle der Zeitmessung wichtig. Der Start aller Inkubationszeiten beginnt mit der Beendigung der Reagenzzugabe.
- Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte bei der gleichen Geschwindigkeit und in der gleichen Reihenfolge ausgeführt werden.

Prüfmethode

Schritt 1 Alle Reagenzien und Proben bei Raumtemperatur ins Gleichgewicht bringen.

Schritt 2 Protokollblatt kennzeichnen, um die Probenanordnung in den Vertiefungen anzuzeigen. Es ist gute Laborpraktik, mit einer zweifachen Ausführung der Proben zu arbeiten.

Schritt 3 Für eine **qualitative Bestimmung** nur den Kalibrator D (*Phiole mit gelbem Verschlussdeckel*) verwenden.

oder

Für eine **semiquantitative Bestimmung** die Kalibratoren A bis E, wie im nachfolgenden Proben-Layout verwenden.

Qualitativ				Semiquantitativ			
A	Leerprobe	S5	Usw.	A	Leerprobe	S1	Usw.
B	-Kontrolle	S6		B	-Kontrolle	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Schritt 4** **1:101** Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenserum mit **500 µl** des Serumverdünnungsmittels vorbereiten.
- Schritt 5** Die erforderlichen Mikrovertiefungen aus dem Beutel entnehmen und ungebrauchte Streifen im versiegelten Beutel wieder zurück in den Kühlschrank stellen. Die Mikrovertiefungen sicher im extra bereitgestellten Halter platzieren.
- Schritt 6** Mit der Pipette **100 µl** von einsatzbereiten Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und verdünnte Patientenproben (**1:101**) gemäß dem Protokollblatt in die zugehörigen Mikrovertiefungen geben.
- Hinweis:** Eine Vertiefung, die **100 µl** an Serumverdünnungsmittel enthält, als eine Reagenz-Leerprobe einschließen. Den ELISA-Leser gegen die Reagenz-Leerprobe nullen.
- Schritt 7** **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 8** **4x** mit dem Waschpuffer waschen. Um manuell zu waschen, füllt man jede Mikrovertiefung mit dem wiederhergestellten Waschpuffer. Die Flüssigkeit durch Umkehren und Ausklopfen des Inhalts jeder Vertiefung oder durch Ansaugen der Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entsorgen. Die Streifen umkehren und die Vertiefungen kräftig auf saugfähigen Papierhandtüchern ausklopfen, um am Ende des letzten Waschens zu blotten. Bei einer automatischen Wascheinrichtung programmieren Sie diese gemäß den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Mit der Pipette **100 µl** des Konjugats in die Mikrovertiefungen geben.
- Schritt 10** **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 11** Alle Mikrovertiefungen wie in Schritt 8 waschen.
- Schritt 12** Mit der Pipette **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Mikrovertiefung in der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für das Konjugat zugeben.
- Schritt 13** **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 14** Mit der Pipette **100 µl** der Stopp-Lösung in jede Mikrovertiefung unter Verwendung der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für die Zugabe des Enzymsubstrats zugeben. Die Absorptionswerte innerhalb von **30 Minuten** nach Hinzufügen der Stopp-Lösung ablesen.
- Schritt 15** Die Absorption jeder Mikrovertiefung bei **450 nm** unter Verwendung eines Ein- oder bei **450/630nm** unter Verwendung eines Zweiwellenlängen-Mikroplattenlesers gegen die auf Null-Absorption gesetzte Reagenz-Leerprobe ablesen.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollserum und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu

überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte $<0,3$ sein. Der Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <10 EU/ml für IgA und IgG und kleiner als 5 IU/ML für IgM sein. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semiquantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

RESULTATE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch zwei Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. des Prüfmusters

----- X Einheit von Kalibrator D = Einheit-Prüfmuster*

Abs. von Kalibrator D

Es wird empfohlen, dass qualitative Ergebnisse, als „positiv“ oder „negativ“ berichtet werden. Probenergebnisse größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv betrachtet.

Hinweis: Einheiten für HF-IgA und IgG sind EU/ml. Einheiten für IgM sind IU/ml

2. SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG

Die Absorption von Kalibrator A bis E gegen ihre jeweiligen Konzentrationen auf dem linear-logarithmischen Millimeterpapier aufnehmen. Die Konzentrationen in U/ml auf der X-Achse gegenüber der Absorption auf der Y-Achse aufnehmen und eine Punkt-Zu-Punkt-Kurvenanpassung zeichnen. Die Konzentrationen der Patientenproben von der Kurve gemäß den entsprechenden Absorptionswerten bestimmen. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als „positiv“, „negativ“, oder „unbestimmt“ mit EU/ml oder IU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenz-Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden bewertet werden.

Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen normaler Blutspender und Krankheitsbekämpfungspen von Nicht-Rheumatoidarthritis (n=147 IgA, 144 IgG und 142 IgM) bestimmt. Der Mittelwert des normalen Probanden plus 2SD wurden als der Prüfungs-Cutoff für IgA ermittelt und einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. Der Mittelwert des normalen Probanden plus 2SD wurden als der Prüfungs-Cutoff für IgG ermittelt und einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. Der Mittelwert des normalen Probanden plus 2,5SD wurden als der Prüfungs-Cutoff für IgM ermittelt und einem Wert von 10 IU/ml zugeordnet. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des nachstehenden Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Prüfungswerte für seine eigenen Bedingungen validieren.

RF IgA oder IgG Wert	RF IgM Wert	Ausdeutung
<20 EU/ml	<10 IU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	10-12,5 IU/ml	Unbestimmt (Grenzlinie)
>25 EU/ml	$>12,5$ IU/ml	Positiv

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semiquantitative Bestimmung zu ermöglichen. Sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Extinktionswerte ergeben als die von Kalibrator A.

BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

Die Prüfung sollte nicht bei äußerst hämolysierten, mikrobisch verunreinigten oder lipämischen Proben ausgeführt werden. Diese Methode sollte nur zur Prüfung von Humanserum-Proben verwendet werden. Die erhaltenen Resultate dienen nur als eine Hilfe bei der Diagnose. Für sich alleine genommen, sollten diese Resultate nicht als diagnostisch interpretiert werden.

ERWARTETE WERTE

Von der ELISA-Prüfung für RF wurde festgestellt, dass sie beträchtlich sensitiver ist als konventionelle Agglutinationstests. Etwa 90 % der Patienten mit Rheumatoidarthritis haben erhöhtes RF anhand des ELISA-Systems im Vergleich zu etwa 70 % anhand Agglutination.^{7,8} Die meisten Patienten mit Rheumatoidarthritis weisen eine Erhöhung von 2 oder mehr Isotypen von RF verglichen mit anderen rheumatischen Krankheiten wie z. B. systemischer Lupus erythematodes auf. Außerdem haben Rheumapatienten höhere Spiegel von RF verglichen mit anderen rheumatischen Zuständen. Die folgenden Tabellen fassen die Bedeutung von verschiedenen Isotypen von RF zusammen.^{9,12} Die folgenden Tabellen fassen die Prävalenz von RF zusammen, die in der Literatur berichtet wird.

Prävalenz von RF bei Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen

RF Isotyp	Prävalenz
IgM	66
IgG	44
IgA	51
IgM, IgG, and/or IgA	70-90

Inzidenz von RF bei Patienten mit rheumatischen Krankheiten^{6,9,11-14}

Sjögren-Syndrom	60%
Systemischer Lupus erythematodes	35%
Systemische Sklerose	25%
Mischkollagenose	15%
Juvenile Rheumatoidarthritis	15%
Polymyositis/Dermatomyositis	10%

Sätze klinischer Proben wurden auf ImmuLisa™ RF ELISAs geprüft. Resultate, welche die Inzidenz in den Populationen für diese Studie demonstrieren, sind nachstehend aufgeführt.

Patientengruppe	IgA		IgG		IgM	
	n	n Pos (%)	n	% Pos (%)	n	% Pos (%)

DE

Rheumatoidarthr	249	131 (52.6%)	249	126 (50.6%)	249	176 (70.7%)
Juvenile Arthr.	10	0	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Osteoarthritis	30	0	30	0	30	1 (3.3%)
Psoriatische Arthr.	33	2 (6.1%)	33	3 (9.1%)	33	2 (6.1%)
Spondyloarthritis	33	1 (3%)	33	0	33	1 (3.3%)
Churg-Strauss	10	1 (10%)	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Misch-CT-Erkrankung	10	1 (10%)	10	2 (20%)	10	4 (40%)
Sjögren	20	9 (45%)	20	2 (10%)	20	11 (55%)
Systemischer Lupus Eryth	30	11 (36.7%)	30	6 (20%)	30	5 (16.7%)
Systemische Sklerose	20	3 (15%)	20	4 (20%)	20	5 (25%)
Wegener	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)
Versch. AI*	36	0	36	2 (5.6%)	36	1 (2.8%)
Versch. ID**	70	4 (5.7%)	70	1 (1.4%)	70	6 (8.6%)
Gesunde Normale	122	5 (4.1%)	120	7 (5.8%)	144	5 (3.5%)

* schließt Zöliakie (8), Basedow (10), Hashimoto (8), Colitis ulcerosa (10) ein

** schließt Syphilis (10), Röteln (10), Mononukleose (5), Lyme (5), HCV (10), CMV (10), HSV (10), Toxoplasmose (10) ein

Die klinische Sensitivität und Spezifität für RA unter Verwendung dieser Tests ist nachstehend zusammengefasst*:

RF IgA		RF IgG		RF IgM	
Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

* Schließt NHS aus.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit der ImmuLisa™ RF ELISAs wurde durch Prüfen gut charakterisierter Rheumatoidarthritis-Serumproben neben Krankheitsbekämpfungen und „normalen“ Humanseren bewertet. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen ELISA-Kits geprüft. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

- A. Methodenvergleich: ImmuLisa™ RF ELISAs geg. anderen RF-Antikörper-ELISAs.

		Andere RF IgA ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	113	9	122
RF IgA	Negativ	5	250	255
ELISA	Gesamt	118	259	377

Positive Prozent-Übereinstimmung: 95,8% (95% CI 89,9% - 98,4%)

Negative Prozent-Übereinstimmung: 96,5% (95% CI 93,3% - 98,3%)

Gesamte Prozent-Übereinstimmung: 96,3% (95% CI 93,7% - 97,9%)

Zugehörige Erkrankung: 147

Krankheitsbekämpfung: 230

Andere RF IgG ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	88	24	112
RF IgG	Negativ	7	271	278
ELISA	Gesamt	95	295	390

Positive Prozent-Übereinstimmung: 92,6% (95% CI 84,9% - 96,7%)

Negative Prozent-Übereinstimmung: 91,9% (95% CI 88,0% - 84,6%)

Gesamte Prozent-Übereinstimmung: 92,1% (95% CI 88,8% - 94,5%)

Zugehörige Erkrankung: 154

Krankheitsbekämpfung: 236

Andere RF IgM ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	124	16	140
RF IgM	Negativ	4	235	239
ELISA	Gesamt	128	251	379

Positive Prozent-Übereinstimmung: 96,9% (95% CI 91,7% - 99,0%)

Negative Prozent-Übereinstimmung: 93,6% (95% CI 89,7% - 96,2%)

Gesamte Prozent-Übereinstimmung: 94,7% (95% CI 91,8% - 96,7%)

Zugehörige Erkrankung: 139

Krankheitsbekämpfung: 239

B. Kreuzreaktivität: Insgesamt wurden 106 potenziell kreuzreaktive Proben von Personen mit Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten, von denen nicht berichtet wurde, dass sie eine hohe Häufigkeit von Autoantikörpern für RF demonstrieren, unter Verwendung von Immulisa™ RF ELISAs getestet.

Zustand	IgA		IgG		IgM	
	n	n Pos (%)	n	n Pos (%)	n	n Pos (%)
Zöliakie	8	0	8	0	8	0
Basedow	10	0	10	1 (10.0%)	10	1 (10.0%)
Hashimoto	8	0	8	0	8	0
Colitis ulcerosa	10	0	10	1 (10.0%)	10	0
Syphilis	10	0	10	0	10	0
Röteln	10	0	10	0	10	1 (10.0%)
Mononukleose	5	1 (20.0%)	5	0	5	0
Lyme	5	0	5	0	5	0
HCV	10	1 (10%)	10	1 (10.0%)	10	2 (20.0%)
CMV	10	0	10	0	10	0
HSV	10	1 (10%)	10	0	10	2 (20.0%)
Toxoplasmose	10	1 (10%)	10	0	10	1 (10.0%)
Gesamt	106	4 (3.8%)	106	3 (2.8%)	106	7 (6.6%)

Präzision

Die Präzision wurde mit 7 positiven Proben im gesamten Bereich des Tests ausgewählt. Testläufe von 6 Replikaten jeder Probe wurden im Zeitraum von etwa 21 Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 12 Replikaten jeder Probe bestimmt.

Probe	Mittel-wert (Einheiten/ ml)	Gesamt- ungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
		SD (Einheiten/ ml)	CV %	SD (Einheiten /ml)	CV %	SD (Einheit en/ml)	CV %
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%
IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%
IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%
IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Qualitative Reproduzierbarkeit

Neunzig Replikate von Proben im negativen Bereich, ~20 % unter dem Cutoff, ~20 % über dem Cutoff und im mittelmäßigen positiven Bereich des Tests wurden ausgeführt, um die qualitative Reproduzierbarkeit für jeden Isotyp zu bestimmen. Diese Proben wurden in mehreren Durchgängen getestet. Die Resultate des Tests für jede Probe erzeugten eine qualitative Übereinstimmung von 100 %.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenzen (LoD) für RF-Antikörper unter Verwendung dieser Prüfungen wurden bestimmt mit 3,7 EU/ml für IgA, 2,2 EU/ml für IgG und 1,3 IU/ml für IgM basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten von je 6 Proben auf niedriger Stufe (NHS).

Linearität

Studien wurden unter Verwendung von abstandsgleichen Verdünnungsreihen von positiven Proben mit Werten überall im Bereich des Kalibrators ausgeführt, um den linearen Bereich der Prüfung zu bestimmen. Der lineare Bereich von RF IgA wurde bestimmt mit 3,3 - 160 EU/ml. Der lineare Bereich von RF IgG wurde bestimmt mit 2,6 - 160 EU/ml. Der lineare

DE

Bereich von RF IgM wurde bestimmt mit 1,2 - 80 IU/ml. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst. Es wird empfohlen, dass Proben, die Resultate größer als der obere Kalibrator hervorbringen, verdünnt und erneut getestet werden.

Probe	Test Bereich (Einheiten/ml)	Anstieg (95 % CI)	Y-Achsenabschnitt (95 % CI)	R ²	% Rückgewinnung
IgA 1	4.8 - 13.7	0.96 (0.86 - 1.06)	0.83 (-0.12 - 1.77)	1.00	91.2 - 100.0
IgA 2	10.5 - 64.9	0.96 (0.84 - 1.09)	3.66 (-1.16 - 8.48)	0.98	83.4 - 101.3
IgA 3	17.3 - 155.0	1.00 (0.88 - 1.14)	2.55 (-9.4 - 14.5)	0.99	88.0 - 104.1
IgG 1	3.6 - 13.8	1.00 (0.92 - 1.08)	0.33 (-0.40 - 1.07)	1.00	92.2 - 100.9
IgG 2	7.0 - 68.7	1.01 (0.89 - 1.12)	1.81 (-2.85 - 6.47)	0.99	87.5 - 100.1
IgG 3	16.1 - 154.7	1.07 (0.95 - 1.20)	-1.59 (-13.3 - 10.2)	1.00	88.2 - 105.6
IgM 1	2.0 - 8.1	0.97 (0.82 - 1.26)	-0.50 (-2.60 - 1.25)	0.99	83.0 - 102.3
IgM 2	8.1 - 61.4	0.96 (0.91 - 1.01)	1.43 (-0.56 - 3.43)	1.00	87.6 - 103.1
IgM 3	13.0 - 73.3	1.00 (0.84 - 1.15)	2.24 (-4.88 - 9.36)	1.00	89.4 - 100.0

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten RF Isotypspiegeln mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Keine bedeutende Interferenz wurde für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), Cholesterin (13 mmol/L) und Triglyceride (37 mmol/L).

Es wurde festgestellt, dass mit Bilirubin, Cholesterin und Triglycerid dotierte Proben eine bis zu +10 % größere Differenz als der erwartete Variationskoeffizientenprozentsatz für diese Tests demonstrierten. Bitte beachten Sie die unter Begrenzungen der Prozedur aufgeführten Probenanforderungen.



ImmLisa™ Enhanced RF ELISAs

Détection du Facteur Rhumatoïde (FR) IgA, IgG ou IgM

IVD Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

DESCRIPTION DU PRODUIT

REF	5138A	RF IgA ELISA	96 Déterminations
REF	5138G	RF IgG ELISA	96 Déterminations
REF	5138M	RF IgM ELISA	96 Déterminations

UTILISATION VISÉE

ImmLisa Enhanced™ ELISA pour anticorps IgA de facteur rhumatoïde : Immunoessais associés aux enzymes (ELISA) pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps IgA de facteur rhumatoïde dans le sang humain pour aider au diagnostic de l'arthrite rhumatoïdale en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoire.

ImmLisa Enhanced™ ELISA pour anticorps IgG de facteur rhumatoïde : Immunoessais associés aux enzymes (ELISA) pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps IgG de facteur rhumatoïde dans le sang humain pour aider au diagnostic de l'arthrite rhumatoïdale en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoire.

ImmLisa Enhanced™ ELISA pour anticorps IgM de facteur rhumatoïde : Immunoessais associés aux enzymes (ELISA) pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps IgM de facteur rhumatoïde dans le sang humain pour aider au diagnostic de l'arthrite rhumatoïdale en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoire.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La mesure du FR est importante dans le diagnostic et le pronostic de l'arthrite rhumatoïde, alors que des titres élevés de FR sont constatés chez les patients qui ont tendance à développer des complications extra-articulaires.^{1,2} La majorité des tests laboratoires habituels mesurent le FR IgM par sa capacité à agglutiner les globules rouges de mouton, le latex ou des particules enduites de IgG.¹⁻⁴ Cependant, les études suggèrent que le FR d'autres isotypes d'immunoglobuline est également présent dans l'arthrite rhumatoïde.⁵⁻⁸

Le facteur rhumatoïde est présent chez 70 à 90 % des patients souffrant d'arthrite rhumatoïdale et il est inclus dans les critères de classification.¹⁰ Selon les critères révisés de l'ARA, un faible facteur rhumatoïde positif contribue à 2 points, alors qu'un facteur rhumatoïde positif élevé contribue à 3 points sur les 6 nécessaires à la classification de définitive de l'arthrite rhumatoïdale.

Le FR est détecté par l'agglutination de l'isotype IgM. D'autres méthodes ELISA ont amélioré la spécificité, la sensibilité et la fiabilité quant aux méthodes d'agglutination existantes et utilisées habituellement.³⁻⁵ Les méthodes ELISA peuvent détecter le FR de divers isotypes d'immunoglobuline. Une telle distinction n'est pas possible à l'aide des tests d'agglutination traditionnels. Des niveaux importants d'un isotype de FR communément constaté dans les maladies rhumatismales et des augmentations de divers isotypes confondus consistent quasiment un diagnostic pour l'arthrite rhumatoïde.⁷ Une combinaison de FR positif IgM, IgG et IgA a une valeur prédictive de 96% en comparaison avec 62% pour le FR IgM seul.⁸ Une combinaison de résultats d'IgM, d'IgG et d'IgA de

facteur rhumatoïde augmente la sensibilité à l'arthrite rhumatoïdale par rapport aux résultats d'IgM de facteur rhumatoïde seuls.⁹

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Les micropuits sont enduits d'IgG purifiée de lapin suivi par un blocage pour réduire les unions non spécifiques pendant l'exécution du dosage. Les contrôles, les calibreurs et les sera de patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène pour permettre aux anticorps spécifiques présents de se fixer à l'antigène. Les anticorps qui ne sont pas fixés et les autres protéines sériques sont éliminés en lavant les micropuits. Les anticorps qui sont fixés sont détectés en ajoutant un conjugué à marquage enzymatique anti IgA, IgG ou IgM humaines aux micropuits. Le conjugué qui n'est pas fixé est éliminé par nettoyage. Le substrat d'enzyme spécifique (tétra-méthyl-benzidine TMB) est ensuite ajouté aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur produit par la conversion du substrat TMB en un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en Unités ELISA par millilitre (UE/ml) pour le FR IgA et le FR IgG et en Unités Internationales par millilitre (UI/ml) pour le FR IgM et rapportés comme étant positif ou négatif.

RÉACTIFS

Stockage et Préparation

Stocker tous les réactifs à une température allant de 2 à 8°C. **Ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

Ne pas utiliser un réactif s'il n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Réhydratez le tampon de lavage jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque le tampon de lavage est conservé entre 2 et 8°C, il est stable jusqu'à la date d'expiration.

Les barrettes enduites des micropuits sont réservées à un usage unique. Les barrettes de micropuits non utilisées doivent être replacées avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

Des études ouvertes de kit ont été effectuées avec des matériaux / réactifs et ont démontré une stabilité allant jusqu'à un minimum de 30 jours.

Précautions

Tous les éléments dérivés du corps humain utilisés ont été testés pour les virus HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-1 et le résultat des tests était négatif, conformément aux exigences de la FDA. Cependant, les dérivés de sang humain et les spécimens des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Veuillez suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors du stockage, de la délivrance et de l'élimination de ces matériaux.¹⁰

La solution d'arrêt est une solution d'acide sulfurique diluée. L'acide sulfurique (H₂SO₄) est toxique et corrosive. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux. Éviter le contact avec les bases, métaux et autres composants qui pourraient réagir avec les acides.

Le Substrat d'Enzyme TMB contient une substance irritante qui peut être dangereuse si elle est inhalée, ingérée ou absorbée par voie cutanée. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux.

Les instructions doivent être suivies précisément, telles qu'elles apparaissent dans cette notice d'utilisation afin de garantir la validité des résultats. Ne pas interchanger les éléments du kit avec des éléments provenant d'autres sources. Suivez les bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser les éléments au delà de la date d'expiration qui figure sur les étiquettes.

Précaution : la loi fédérale des États-Unis limite la vente de cet équipement à des médecins licenciés.

Matériel fourni

ImmuLisa™ RF IgA ELISA
 ImmuLisa™ RF IgG ELISA
 ImmuLisa™ RF IgM ELISA

REF	5138A
REF	5138G
REF	5138M

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 96 déterminations.

12 x 8

MICROPLATE|**RF**

Microplaque constituée de micropuits individuels sécables. Enduits d'antigène IgG de lapin purifié. Prête à l'emploi.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**+**|**RFA**

Contrôle Positif **Prêt à être utilisé** (capsule rouge). Contient du sérum humain testé positif pour le FR IgA. La concentration qui est attendue est inscrite sur l'étiquette en UE/ml.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**+**|**RFG**

Contrôle Positif **Prêt à être Utilisé** (capsule rouge). Contient du sérum humain testé positif pour le FR IgG. La concentration qui est attendue est inscrite sur l'étiquette en UE/ml.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**+**|**RFM**

Contrôle Positif **Prêt à être Utilisé** (capsule rouge). Contient du sérum humain testé positif pour le FR IgM. La concentration qui est attendue est inscrite sur l'étiquette en UI/ml.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**-**

Contrôle Négatif **Prêt à l'Emploi** (capsule blanche). Contient du sérum humain.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|**A**|**RFA**

CALIBRATOR|**B**|**RFA**

CALIBRATOR|**C**|**RFA**

CALIBRATOR|**D**|**RFA**

CALIBRATOR|**E**|**RFA**

Lot de 5 Calibreurs **Prêt à être utilisé**. Calibreur A (bouchon vert) 160 UE/ml, Calibreur B (bouchon violet) 80 UE/ml, Calibreur C (bouchon bleu) 40 UE/ml, Calibreur D (bouchon jaune) 20 UE/ml et Calibreur E (bouchon orange) 1 UE/ml. Dérivés de sérum humain contenant des anticorps contre le FR IgA. Les concentrations en UE/ml sont inscrites sur les étiquettes.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|**A**|**RFG**

CALIBRATOR|**B**|**RFG**

CALIBRATOR|**C**|**RFG**

CALIBRATOR|**D**|**RFG**

CALIBRATOR|**E**|**RFG**

Lot de 5 Calibreurs **Prêt à être utilisé**. Calibreur A (bouchon vert) 160 UE/ml, Calibreur B (bouchon violet) 80 UE/ml, Calibreur C (bouchon bleu) 40 UE/ml, Calibreur D (bouchon jaune) 20 UE/ml et Calibreur E (bouchon orange) 1 UE/ml. Dérivés de sérum humain contenant des anticorps FR IgG. Les concentrations en UE/ml sont inscrites sur les étiquettes.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|**A**|**RFM**









Lot de 5 Calibreurs **Prêt à être utilisé**. Calibreur A (bouchon vert) 80 UI/ml, Calibreur B (bouchon

	CALIBRATOR B RFM	violet) 40 UI/ml, Calibreur C (bouchon bleu) 20 UI/ml, Calibreur D (bouchon jaune) 10 UI/ml et Calibreur E (bouchon orange) 1 UI/ml. Dérivés de sérum humain contenant des anticorps FR IgM. Les concentrations en UI/ml sont inscrites sur les étiquettes.
	CALIBRATOR C RFM	
	CALIBRATOR D RFM	
	CALIBRATOR E RFM	
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Globuline de chèvre anti-IgA humaine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) . Prête à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Globuline de lapin anti-IgG humaine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) . Prête à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 15 ml	IgM-CONJ HRP	Globuline de chèvre anti-IgM humaine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) . Prête à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL	Diluant sérum. Prêt à l'emploi. Code couleur violet.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. Protéger de la lumière.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solution d'arrêt. Prête à l'emploi.
2 x vials	BUF WASH	Tampon de Lavage en Poudre. Reconstituer jusqu'à un volume d'un litre chacun.
1 x		Feuille de Protocole

Éléments Additionnels

1 x 60ml	BUF WASH	Tampon de Lavage concentré Liquide. Reconstituer jusqu'à un volume d'un litre.
----------	-----------------	---

Symboles utilisés sur les étiquettes

	Numéro de lot
	Numéro Catalogue
	Utilisation pour un diagnostic in vitro
	Utiliser avant
	Température de stockage
	Lire les instructions avant utilisation
	Nombre de tests
	Fabricant

Matériel Requis Mais Non Fourni

- Eau déminéralisée ou distillée
- Pissette en plastique pour distribuer la solution de tampon de lavage
- Pipeteurs volumétriques de précision permettant de prélever 5 µl à 1000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Tubes à essai propres 12 x 75 mm et support de tubes à essai
- Chronomètre de laboratoire
- Serviettes de papier absorbant

- Lecteur de microplaque capable de lire les valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être réglé sur 600-650 nm
- Système de lavage automatique de microplaques capable de délivrer 200 µl

COLLECTE ET MANIPLICATION DES SPECIMENS

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés pour cette procédure. L'emploi d'échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes peut interférer avec la réalisation du test et ceux-ci ne doivent pas être utilisés. Veuillez conserver les spécimens à 2°-8°C pendant une période inférieure à une semaine. Pour un stockage pendant une période plus longue, les spécimens de sérum doivent être congelés. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an. Évitez de congeler et décongeler plusieurs fois les échantillons.

PROCÉDURE

Notes concernant la Procédure

- Veuillez lire attentivement la notice du produit avant de commencer l'analyse.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant le début de l'analyse.
- Laissez les spécimens des patients et les réactifs du test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer la procédure de test. Il est souhaitable de laisser les réactifs sur la table en dehors de la boîte pendant 30 minutes avant utilisation. Remplacez tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur immédiatement après utilisation.
- Otez les barrettes de puits nécessaires du sachet et refermez soigneusement le sachet pour éviter la condensation des barrettes de puits inutilisées. Rangez immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.
- **Une bonne technique de lavage est essentielle.** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage approprié peut être réalisé en appliquant un jet puissant de tampon de lavage avec une pissette équipée d'un embout large, sur l'intégralité de la microplaque. **Un système de lavage de microplaques automatisé est recommandé.**
- Utiliser un pipeteur multicanaux capable de remplir 8 à 12 puits simultanément. Cela permet d'accélérer le processus et permet également des temps d'incubation plus uniformes.
- Durant toutes les étapes, un contrôle attentif du temps est important. Le début de toute période d'incubation commence avec la réalisation de l'addition de réactif.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit être réalisée au même rythme et dans le même ordre.

Méthode de Test

Étape 1 Laisser tous les réactifs et les spécimens s'équilibrer à la température ambiante.

Étape 2 Etiqueter la feuille de protocole pour indiquer la disposition des échantillons dans les puits. Selon les bonnes pratiques de laboratoire, il est souhaitable d'analyser des échantillons en double.

Étape 3 Pour une **détermination qualitative** utiliser le Calibreur D (*fiOLE avec la capsule jaune*) seulement.

ou

Pour une **détermination semi quantitative** utiliser les Calibreurs A jusqu'à E, comme décrit dans l'exemple de disposition ci-dessous.

Qualitative				Semi Quantitative			
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge	S1	Etc.
B	-Contrôle	S6		B	-Contrôle	S2	
C	+ Contrôle	S7		C	+ Contrôle	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Étape 4** Préparer une dilution **1:101** des échantillons du patient en mélangeant **5 µl** des sera du patient avec **500ul** de diluant sérum.
- Étape 5** Retirer les micropuits nécessaires du sachet et ranger les barrettes inutilisées dans le sachet fermé, dans le réfrigérateur. Placer fermement les micropuits dans le support supplémentaire fourni.
- Étape 6** Verser à l'aide d'une pipette **100 µl** de Calibreurs prêts à l'emploi, contrôles positifs et négatifs et d'échantillons du patient dilués (**1:101**) dans les micropuits appropriés, selon la feuille de protocole.
- Note** : Inclure un puits qui ne contient que **100 µl** de diluant sérum comme blanc de réactif. Mettez sur zéro le lecteur ELISA avec le blanc de réactif.
- Étape 7** Incuber **pendant 30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 8** Laver **4x** avec le tampon de lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micropuits avec le tampon de lavage reconstitué. Disposez du fluide en renversant et en tapant afin de vider le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide contenu dans chaque puits. Pour absorber le liquide résiduel après le dernier lavage, inverser les barrettes et taper les puits vigoureusement sur des serviettes de papier absorbantes. Pour les systèmes de lavage automatisés, programmer le système de lavage selon les instructions du fabricant.
- Étape 9** Verser à l'aide d'une pipeteur **100 µl** de Conjugué dans les micropuits.
- Étape 10** Laisser incuber **pendant 30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les micropuits selon la même méthode que lors de l'étape 8.
- Étape 12** Verser à l'aide d'un pipeteur **100 µl** de Substrat d'Enzyme dans chaque micropuits dans le même ordre et selon le même minutage que pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber **pendant 30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 14** Verser à l'aide d'un pipeteur **100 µl** de Solution d'Arrêt dans chaque micropuits dans le même ordre et selon le même minutage que lors de l'ajout du Substrat d'Enzyme. Lire les valeurs d'absorbance dans un délai de **30 minutes** à partir du moment où la solution d'arrêt a été ajoutée.
- Étape 15** Lire l'absorbance de chaque micropuits à **450 nm** en utilisant un lecteur simple ou à 450/630 nm en utilisant un lecteur de microplaques à double longueur d'onde en comparaison avec le blanc de réactif placé sur zéro absorbance.

Contrôle Qualité

Les calibres, les résolutions positives et négatives et un réactif vierge doivent être utilisés pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. Le résultat d'absorbance du réactif vierge doit être <0,3. Le calibre A ne doit pas avoir un résultat d'absorbance inférieur à 1,0, sinon le test doit être répété. La résolution négative doit être <10 EU/ml pour IgA et IgG et de moins de 5 IU/ml pour IgM. Lors de l'exécution des déterminations qualitatives, la densité optique du Calibre D doit être supérieure à celle de la résolution négative et inférieure à celle de l'absorbance de la résolution positive. Pour les déterminations semi-quantitatives, la résolution positive doit donner des valeurs dans la gamme figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

La concentration des échantillons de patients peut être déterminée par l'une des deux méthodes suivantes :

1. DETERMINATION QUALITATIVE

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon Test}}{\text{Abs. du Calibre D}} \times \text{Unités du Calibre D} = \text{Unités Échantillon Test*}$$

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au calibre D sont considérés comme positifs.

Note : Les unités pour le FR IgA et IgG sont les UE/ml. Les unités pour le FR IgM sont les UI/ml

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Relever l'absorbance du calibre A jusqu'au calibre E par rapport à leurs concentrations respectives sur un papier graphique à logarithme linéaire. Relever les concentrations en U/ml sur l'axe X par rapport à l'absorbance sur l'axe Y et tracer une courbe point par point. Déterminer les concentrations sur les échantillons patients en se basant sur la courbe en accord avec les valeurs d'absorbance correspondantes. Alternativement, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

Il est recommandé que les résultats semi quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs en UE/ml ou en UI/ml. Les résultats indéterminés ou limites doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant des donneurs de sang normaux et des spécimens de contrôle non atteints d'arthrite rhumatoïde (IgA n=147, IgG 144 et IgM 142). La moyenne des sujets normaux, à laquelle sont ajoutés 2 écarts types, a été établie comme limite de l'analyse pour l'IgA et la valeur de 20 UE/ml lui a été attribuée. La moyenne des sujets normaux, à laquelle sont ajoutés 2 écarts types, a été établie comme limite de l'analyse pour l'IgG et la valeur de 20 UE/ml lui a été attribuée. La moyenne des sujets normaux, à laquelle sont ajoutés 2 écarts types, a été établie comme limite de l'analyse pour l'IgM et la valeur de 10 UI/ml lui a été attribuée. IMMCO suggère l'utilisation de l'intervalle de référence ci-dessous. Chaque laboratoire doit valider les valeurs de l'analyse selon les conditions qui lui sont propres.

Valeur FR IgA ou IgG	Valeur FR IgM	Interprétation
----------------------	---------------	----------------

FR

<20 UE/ml	<10 UI/ml	Négatif
20-25 UE/ml	10-12,5 UI/ml	Indéterminé (Limite)
>25 UE/ml	>12,5 UI/ml	Positif

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et ils doivent être utilisés avec chaque test. Les échantillons de patients contenant de hauts niveaux d'anticorps peuvent avoir des valeurs supérieures à celles du calibreur A.

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Le test ne doit pas être effectué sur des échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes. Cette méthode doit être utilisée pour tester des échantillons de sérum humain seulement. Les résultats obtenus servent seulement comme aide au diagnostic. Ces résultats seuls ne doivent pas être interprétés comme un diagnostic.

VALEURS ATTENDUES

Il a été prouvé que les tests ELISA pour le FR sont considérablement plus sensibles que les tests d'agglutination conventionnels. Environ 90% des patients atteints d'arthrite rhumatoïde présentent un FR élevé selon le système ELISA, alors qu'en comparaison le résultat est de 70% par agglutination.^{7,8} La plupart des patients atteints d'arthrite rhumatoïde ont des niveaux élevés de 2 ou plus des isotopes de FR en comparaison avec les maladies rhumatismales telles que le lupus érythémateux disséminé. De plus, les patients atteints de rhumatoïde ont des niveaux élevés de FR en comparaison avec les autres conditions rhumatismales. Les tableaux suivants résument l'importance des divers isotopes de FR.^{9,12} Le tableau suivant résume la prévalence de facteurs rhumatoïdes rapportés dans la littérature.

Prévalence pour Divers Isotypes de FR

Isotype FR	Prévalence (%)
IgM	66
IgG	44
IgA	51
IgM, IgG, and/or IgA	70-90

Prévalence du facteur rhumatoïde chez des patients atteints d'autres maladies rhumatismales^{6,9,11-14}

Syndrome de Sjögren	60 %
Lupus érythémateux systémique	35 %
Sclérose systémique	25 %
Maladies des tissus conjonctifs variées	15 %
Arthrite rhumatoïdale juvénile	15 %
Polymyosite / Dermatomyosite	10 %

Des ensembles d'échantillons cliniques ont été testés à l'aide d'ELISA Immulisa™ FR. Les résultats démontrant l'incidence chez les populations pour cette étude sont fournis ci-dessous.

Groupe de Patients	IgA		IgG		IgM	
	n	n Pos (%)	n	% Pos (%)	n	% Pos (%)
Arth. rhumatoïdale.	249	131 (52.6%)	249	126 (50.6%)	249	176 (70.7%)

FR

Arth. juvénile	10	0	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Ostéo-arthrite	30	0	30	0	30	1 (3.3%)
Arth. psoriasique	33	2 (6.1%)	33	3 (9.1%)	33	2 (6.1%)
Spondylarthrite	33	1 (3%)	33	0	33	1 (3.3%)
Syndrome Churg-Strauss	10	1 (10%)	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Maladies des tissus connectifs variées	10	1 (10%)	10	2 (20%)	10	4 (40%)
Syndrome de Sjögren	20	9 (45%)	20	2 (10%)	20	11 (55%)
Lupus érythémateux systémique	30	11 (36.7%)	30	6 (20%)	30	5 (16.7%)
Sclérose systémique	20	3 (15%)	20	4 (20%)	20	5 (25%)
Granulomatose de Wegener	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)
Diverses maladies auto-immunes*	36	0	36	2 (5.6%)	36	1 (2.8%)
Diverses immunodéficiences**	70	4 (5.7%)	70	1 (1.4%)	70	6 (8.6%)
En bonne santé, normal	122	5 (4.1%)	120	7 (5.8%)	144	5 (3.5%)

* Comprend maladie coeliaque (8), maladie de Graves (10), thyroïdite de Hashimoto (8), rectocolite hémorragique (10)

** Comprend syphilis (10), rubéole (10), mononucléose (5), maladie de Lyme (5), virus de l'hépatite C (10), CMV (10), virus de l'herpès simplex (10), toxoplasmose (10)

La sensibilité et la spécificité clinique de l'arthrite rhumatoïdale utilisant ces tests sont résumées ci-dessous* :

IgA de facteur rhumatoïde		IgG de facteur rhumatoïde		IgM de facteur rhumatoïde	
Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

* à l'exclusion des échantillons de sang humain normal.

CHARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité de la solution Immulisa™ FR ELISA a été évaluée en testant des spécimens bien caractérisés provenant de sujets atteints d'arthrite rhumatoïde et des sérums humains « normaux ». Ces spécimens ont également été testés avec des kits ELISA disponibles dans le commerce. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. Comparaison Méthode : Immulisa™ FR ELISAs contre d'autres ELISA anticorps FR.

		Autres ELISA FR IgA		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	113	9	122
FR IgA	Négatif	5	250	255
ELISA	Total	118	259	377
Concordance en pourcentage cas positifs :		95,8% (95% CI 89,9% - 98,4%)		
Concordance en pourcentage cas négatifs :		96,5% (95% CI 93,3% - 98,3%)		
Concordance en pourcentage tous les cas :		96,3% (95% CI 93,7% - 9,9%)		
Maladie associée :		147		
Contrôle Maladie :		230		

		Autres ELISA FR IgG		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	88	24	112

FR

FR IgG	Négatif	7	271	278
ELISA	Total	95	295	390

Concordance en pourcentage cas positifs : 92,6% (95% CI 89,4% - 96,7%)

Concordance en pourcentage cas négatifs : 91,8% (95% CI 88,0% - 94,6%)

Concordance en pourcentage tous les cas : 92,1% (95% CI 88,8% - 94,5%)

Maladie associée : 154

Contrôle Maladie : 236

			Autres ELISA FR IgM	
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	124	16	140
FR IgM	Négatif	4	235	239
ELISA	Total	128	251	379

Concordance en pourcentage cas positifs : 96,9% (95% CI 91,7% - 99,0%)

Concordance en pourcentage cas négatifs : 93,6% (95% CI 89,7% - 96,2%)

Concordance en pourcentage tous les cas : 94,7% (95% CI 91,8% - 96,7%)

Maladie associée : 139

Contrôle Maladie : 239

B. Réactivité croisée : Un total de 106 spécimens à réaction potentiellement croisée d'individus ayant d'autres troubles auto-immunitaires et maladies infectieuses non rapportées pour démontrer une forte incidence aux anticorps du facteur rhumatoïde ont été testés en utilisant le système Immulisa™ d'ELISA pour facteur rhumatoïde.

Condition	IgA		IgG		IgM	
	n	n Pos (%)	n	n Pos (%)	n	n Pos (%)
Maladie cœliaque	8	0	8	0	8	0
Maladie de Graves	10	0	10	1 (10.0%)	10	1 (10.0%)
Thyroïdite de Hashimoto	8	0	8	0	8	0
Rectocolite hémorragique	10	0	10	1 (10.0%)	10	0
Syphilis	10	0	10	0	10	0
Rubéole	10	0	10	0	10	1 (10.0%)
Mononucléose	5	1 (20.0%)	5	0	5	0
Maladie de Lyme	5	0	5	0	5	0
Virus de l'hépatite C	10	1 (10%)	10	1 (10.0%)	10	2 (20.0%)
CMV	10	0	10	0	10	0
Virus de l'herpès simplex	10	1 (10%)	10	0	10	2 (20.0%)
Toxoplasmose	10	1 (10%)	10	0	10	1 (10.0%)
Total	106	4 (3.8%)	106	3 (2.8%)	106	7 (6.6%)

Précision

La précision a été testée avec de multiples spécimens sélectionnés à travers la gamme de tests pour chaque isotype. Des tests ont été effectués reproduisant 6 fois chaque échantillon sur environ 21 jours. Un test supplémentaire de 12 dupliqués a été effectué pour déterminer la répétabilité.

Échantillon	Moyenne (unités/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		En cours (Reproductibilité)	
		Écart type (unités/ml)	CV%	Écart type (unités/ml)	CV%	Écart type (unités/ml)	CV%
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%
IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%
IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%
IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Reproductibilité qualitative

Quatre-vingt-dix reproductions d'échantillons dans la gamme négative, env. 20 % en dessous de la limite de démarcation, env. 20 % au-dessus de la limite de démarcation et dans la gamme positive modérée de l'analyse ont été effectuées pour chaque isotype afin de déterminer la reproductibilité qualitative. Ces échantillons ont été testés sur plusieurs tests. Les résultats pour chaque échantillon ont produit 100 % d'accord qualitatif.

Limites de Détection

La limite de détection (LoD) pour le FR a été déterminée à partir de 60 mesures d'échantillons vierges et 10 mesures de chacun des 6 échantillons avec des niveaux bas (SHN) et a été déterminée à 3,7 UE/ml pour l'IgA, 2,2 UE/ml pour l'IgG et 1,3 pour l'IgM.

Linéarité

Des études ont été menées en utilisant des séries de dilutions équidistantes d'échantillons positifs avec des valeurs comprises tout au long de l'éventail des calibres afin de déterminer l'étendue linéaire de l'analyse. L'étendue linéaire du FR IgA a été déterminée à 3,3 - 160 UE/ml. L'étendue linéaire du FR IgG a été déterminée à 2,6 - 160 UE/ml. L'étendue linéaire du FR IgM a été déterminée à 1,2 - 80 UE/ml. Les résultats sont résumés ci-dessous. Il est suggéré que les échantillons produisant des résultats supérieurs aux plus hauts calibres soient dilués et testés de nouveau.

Échantillon	Test Étendue	Pente	Segment sur l'axe	R ²	%
-------------	--------------	-------	-------------------	----------------	---

	(unités/ml)	(95% CI)	Y (95% CI)		Récupération
IgA 1	4.8 - 13.7	0.96 (0.86 - 1.06)	0.83 (-0.12 - 1.77)	1.00	91.2 - 100.0
IgA 2	10.5 - 64.9	0.96 (0.84 - 1.09)	3.66 (-1.16 - 8.48)	0.98	83.4 - 101.3
IgA 3	17.3 - 155.0	1.00 (0.88 - 1.14)	2.55 (-9.4 - 14.5)	0.99	88.0 - 104.1
IgG 1	3.6 - 13.8	1.00 (0.92 - 1.08)	0.33 (-0.40 - 1.07)	1.00	92.2 - 100.9
IgG 2	7.0 - 68.7	1.01 (0.89 - 1.12)	1.81 (-2.85 - 6.47)	0.99	87.5 - 100.1
IgG 3	16.1 - 154.7	1.07 (0.95 - 1.20)	-1.59 (-13.3 - 10.2)	1.00	88.2 - 105.6
IgM 1	2.0 - 8.1	0.97 (0.82 - 1.26)	-0.50 (-2.60 - 1.25)	0.99	83.0 - 102.3
IgM 2	8.1 - 61.4	0.96 (0.91 - 1.01)	1.43 (-0.56 - 3.43)	1.00	87.6 - 103.1
IgM 3	13.0 - 73.3	1.00 (0.84 - 1.15)	2.24 (-4.88 - 9.36)	1.00	89.4 - 100.0

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant le sérum avec des niveaux d'isotypes FR connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 µmol/L), Cholestérol (13 mmol/L) and Triglycérides (37 mmol/L). Il faut noter que les échantillons contenant de la bilirubine, du cholestérol et du triglycéride ont démontré jusqu'à 10 % de différence au-dessus du coefficient de variance de pourcentage attendu pour ces essais. Veuillez noter les exigences concernant les échantillons répertoriées dans les Limites de procédure.



ImmuliSa™ Enhanced RF ELISA

Rilevamento del fattore reumatoide (RF) IgA, IgG o IgM

IVD Per uso diagnostico *in vitro*

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 5138A	RF IgA ELISA	96 determinazioni
REF 5138G	RF IgG ELISA	96 determinazioni
REF 5138M	RF IgM ELISA	96 determinazioni

USO PREVISTO

ImmuliSa Enhanced™ Anticorpo RF IgA ELISA: Immunodosaggio enzimatico (ELISA) per la rilevazione qualitativa o semi-quantitativa di anticorpi del fattore reumatoide IgA in siero umano come aiuto nella diagnosi dell'artrite reumatoide (RA) in connessione con altri test di laboratorio e scoperte cliniche.

ImmuliSa Enhanced™ Anticorpo RF IgG ELISA: Immunodosaggio enzimatico (ELISA) per la rilevazione qualitativa o semi-quantitativa di anticorpi del fattore reumatoide IgG in siero umano come aiuto nella diagnosi dell'artrite reumatoide (RA) in connessione con altri test di laboratorio e scoperte cliniche.

ImmuliSa Enhanced™ Anticorpo RF IgM ELISA: Immunodosaggio enzimatico (ELISA) per la rilevazione qualitativa o semi-quantitativa di anticorpi del fattore reumatoide IgM in siero umano come aiuto nella diagnosi dell'artrite reumatoide (RA) in connessione con altri test di laboratorio e scoperte cliniche.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La misurazione di RF è importante nella diagnosi e nella prognosi dell'artrite reumatoide, dato che nei pazienti che tendono a sviluppare complicanze extrarticolari sono presenti titoli elevati di RF.^{1,2} La maggior parte dei test di laboratorio di routine misura RF IgM in base alla sua capacità di agglutinare eritrociti di pecora, lattice o simili particelle rivestiti con IgG.¹⁻⁴ Gli studi suggeriscono tuttavia la presenza del RF di altri isotipi dell'immunoglobulina anche nell'artrite reumatoide e altri disturbi.⁵⁻⁸

RF è presente nel 70-90% dei pazienti con artrite reumatoide ed è incluso nei criteri di classificazione.¹⁰ Secondo i criteri ARA revisionati, un basso risultato RF positivo contribuisce a 2 punti su 6 e un alto RF positivo contribuisce a 3 punti su 6 per la classificazione di RA definito.

L'RF, come rilevato in base all'agglutinazione appartiene all'isotipo IgM. Altri metodi, quali ad esempio i dosaggi ELISA, hanno migliorato la specificità, la sensibilità e l'affidabilità rispetto ai metodi di agglutinazione attuali e utilizzati di routine.³⁻⁵ I metodi ELISA possono rilevare RF di vari isotipi dell'immunoglobulina. Tale distinzione non è possibile con i test di agglutinazione tradizionali. Livelli significativi di un isotipo di RF comunemente rilevato nelle malattie reumatiche e aumenti contemporanei dei vari isotipi hanno praticamente valore diagnostico per l'artrite reumatoide.⁷ Una combinazione di RF IgM, IgG e IgA positivi ha un valore predittivo del 96% rispetto al 62% per il solo RF IgM.⁸ Una combinazione dei risultati di IgM, IgG e IgA RF aumenta la sensibilità per RA rispetto ai soli risultati IgM RF.⁹

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I micropozzetti sono rivestiti con IgG di coniglio purificata, cui segue un passaggio di arresto per ridurre il legame non specifico durante l'esecuzione del dosaggio. Controlli, calibratori e sieri del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene. Gli anticorpi non legati e le altre proteine sieriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai micropozzetti un coniugato anti-IgA, anti-IgG o anti-IgM umane marcato enzimaticamente. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e viene rilevata la presenza degli anticorpi tramite una variazione di colore prodotta dalla conversione del substrato TMB in un prodotto di reazione colorato. La reazione viene arrestata e l'intensità della variazione di colore, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati per RF IgA e RF IgG sono espressi in unità ELISA per millilitro (UE/ml), quelli per RF IgM in unità internazionali per millilitro (UI/ml) e tutti sono refertati come positivi o negativi.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere sigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

Studi su kit aperti sono stati eseguiti con materiali/reagenti e dimostrano la stabilità in un minimo di 30 giorni.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.¹⁰

La soluzione di arresto è costituita da acido solforico diluito. L'acido solforico (H₂SO₄) è velenoso e corrosivo. Non ingerire ed evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Evitare l'esposizione a basi, metalli o altri composti che possono reagire con gli acidi.

Il substrato enzimatico TMB contiene un irritante che può essere nocivo se inalato, ingerito o assorbito attraverso la pelle. Non ingerire ed evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

Attenzione: la legge federale degli Stati Uniti limita la vendita di questo dispositivo a medici autorizzati.

Materiali forniti

ImmuLisa™ RF IgA ELISA

REF 5138A

ImmuLisa™ RF IgG ELISA

REF 5138G

ImmuLisa™ RF IgM ELISA

REF 5138M

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8

MICROPLATE|**RF**

Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene IgG di coniglio purificato. Pronto per l'uso.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**+**|**RFA**

Controllo positivo (tappo rosso) pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per RF IgA. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**+**|**RFG**

Controllo positivo (tappo rosso) pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per RF IgG. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**+**|**RFM**

Controllo positivo (tappo rosso) pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per RF IgM. L'intervallo di concentrazione previsto in UI/ml è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|**-**

Controllo negativo (tappo bianco) pronto per l'uso. Contiene siero umano.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|**A**|**RFA**

CALIBRATOR|**B**|**RFA**

CALIBRATOR|**C**|**RFA**

CALIBRATOR|**D**|**RFA**

CALIBRATOR|**E**|**RFA**

Serie di 5 **calibratori** pronti per l'uso. Calibratore A (tappo verde) 160 UE/ml, calibratore B (tappo viola) 80 UE/ml, calibratore C (tappo blu) 40 UE/ml, calibratore D (tappo giallo) 20 UE/ml, e calibratore E (tappo arancione) 1 UE/ml. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-RF IgA. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|**A**|**RFG**

CALIBRATOR|**B**|**RFG**

CALIBRATOR|**C**|**RFG**

CALIBRATOR|**D**|**RFG**

CALIBRATOR|**E**|**RFG**

Serie di 5 **calibratori** pronti per l'uso. Calibratore A (tappo verde) 160 UE/ml, calibratore B (tappo viola) 80 UE/ml, calibratore C (tappo blu) 40 UE/ml, calibratore D (tappo giallo) 20 UE/ml, e calibratore E (tappo arancione) 1 UE/ml. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-RF IgG. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|**A**|**RFM**

CALIBRATOR|**B**|**RFM**

CALIBRATOR|**C**|**RFM**

CALIBRATOR|**D**|**RFM**

CALIBRATOR|**E**|**RFM**

Serie di 5 **calibratori** pronti per l'uso. Calibratore A (tappo verde) 80 UI/ml, calibratore B (tappo viola) 40 UI/ml, calibratore C (tappo blu) 20 UI/ml, calibratore D (tappo giallo) 10 UI/ml, e calibratore E (tappo arancione) 1 UI/ml. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-RF IgM. Le concentrazioni in UI/ml sono stampate sulle etichette.

1 x 15 ml

IgA-CONJ|**HRP**

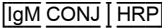




Coniugato HRP di montone **anti-IgA umane**. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.

1 x 15 ml

IgG-CONJ|**HRP**

Coniugato HRP di coniglio **anti-IgG umane**.









IT

1 x 15 ml		Pronto per l'uso. Colore codificato rosa. Coniugato} HRP di montone anti-IgG umane . Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 60 ml		Diluente per siero. Pronto per l'uso. Colore codificato porpora.
1 x 15 ml		Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce..
1 x 15 ml		Soluzione di arresto. Pronto per l'uso.
2 x vials		Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.
1 x		Schede del protocollo

Componenti facoltativi

1 x 60 ml		Tampone di lavaggio liquido concentrato. Ricostituire a un litro.
-----------	---	---

Simboli utilizzati sulle etichette

	Numero di lotto
	Catalog number
	Per uso diagnostico in vitro
	Usare entro
	Temperatura di conservazione
	Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di test
	Fabbricante

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua deionizzata o distillata
- Boccetta comprimibile per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso per pipette
- Provette pulite 12 x 75 mm e rastrelliera per provette
- Contaminuti
- Salviette di carta assorbente
- Lettore per micropiastre capace di leggere valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Si raccomanda

di analizzare i campioni congelati entro un anno. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

PROCEDURA

Note sulla procedura

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente. Prima dell'uso, si consiglia di lasciare i reagenti sul piano di lavoro e fuori dalla scatola per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere nel frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta nel frigorifero.
- **È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo un energico getto di tampone di lavaggio con una boccetta di lavaggio a bocca larga sull'intera micropiastrella **Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.**
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di riempire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Questo strumento accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e dei reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

Metodo del test

Passaggio 1 Lasciar equilibrare a temperatura ambiente tutti i reagenti e i campioni.

Passaggio 2 Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.

Passaggio 3 Per una **determinazione qualitativa** utilizzare unicamente il calibratore D (*flacone con tappo giallo*).

oppure

Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i calibratori da A fino a E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

	Qualitativa		
A	Bianco	S5	Ecc.
B	Controllo -	S6	
C	Controllo +	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	

	Semiquantitativa		
A	Bianco	S1	Ecc.
B	Controllo -	S2	
C	Controllo +	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	

	1	2	3	1	2	3
Passaggio 4	Preparare una diluizione 1:101 dei campioni del paziente miscelando 5 µl dei sieri del paziente con 500 µl di diluente per siero.					
Passaggio 5	Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere in frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.					
Passaggio 6	Pipettare 100 µl di calibratori pronti all'uso, controlli positivo e negativo e campioni diluiti del paziente (1:101) nei micropozzetti appropriati in base alla scheda del protocollo.					
	Nota: includere un pozzetto contenente 100 µl del diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.					
Passaggio 7	Incubare per 30 minuti (± 5 min) a temperatura ambiente.					
Passaggio 8	Lavare 4 volte con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti capovolgendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su salviette di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del fabbricante.					
Passaggio 9	Pipettare 100 µl di coniugato nei micropozzetti.					
Passaggio 10	Incubare per 30 minuti (± 5 min) a temperatura ambiente.					
Passaggio 11	Lavare tutti i micropozzetti come al Passaggio 8.					
Passaggio 12	Pipettare 100 µl di substrato enzimatico in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per il coniugato.					
Passaggio 13	Incubare per 30 minuti (± 5 min) a temperatura ambiente.					
Passaggio 14	Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere i valori di assorbanza entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.					
Passaggio 15	Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a 450 nm utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola oppure a 450/630 nm se si utilizza un lettore a lunghezza d'onda doppia, contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.					

Controllo di qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1,0, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere <10 EU/ml per IgA e IgG e inferiore a 5 IU/ml per IgM. Quando si eseguono determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semi-quantitative il controllo positivo deve fornire valori nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere stabilite con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. campione test

X Unità di calibratore D = Unità campione di prova*

Ass. calibratore D

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". I risultati del campione maggiori o pari al calibratore D sono considerati positivi.

Nota: le unità per RF IgA e RF IgG sono UE/ml. Le unità per IgM sono UI/ml.

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare su carta illimitata lineare-logaritmica l'assorbanza dal calibratore A fino al calibratore E rispetto alle loro concentrazioni. Tracciare le concentrazioni in U/ml sull'asse X rispetto all'assorbanza sull'asse Y e disegnare una curva interpolante punto per punto. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbanza corrispondenti. In alternativa, è possibile utilizzare una curva a quattro parametri per tracciare la curva standard.

Si raccomanda di refertare i risultati semiquantitativi come "positivi", "negativi" o "indeterminati" con i valori delle unità in UE/ml oppure UI/ml. In presenza di risultati indeterminati/borderline, ripetere il test e valutare unitamente ad altri metodi di laboratorio.

Interpretazione

I valori di interpretazione sono stati determinati testando donatori di sangue normali e campioni di controllo di malattia di artrite reumatoide (n=147 IgA, 144 IgG e 142 IgM). Il cut-off del dosaggio per IgA è stato stabilito utilizzando la media dei soggetti normali più 2 DS ed è stato assegnato un valore arbitrario di 20 UE/ml. Il cut-off del dosaggio per IgG è stato stabilito utilizzando la media dei soggetti normali più 2 DS ed è stato assegnato un valore arbitrario di 20 UE/ml. Il cut-off del dosaggio per IgM è stato stabilito utilizzando la media dei soggetti normali più 2,5 DS ed è stato assegnato un valore di 10 UI/ml. IMMCO suggerisce l'uso dell'intervallo di riferimento riportato di seguito. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del dosaggio in base alle proprie condizioni.

Valore RF IgA o IgG	Valore RF IgM	Interpretazione
<20 UE/ml	<10 UI/ml	Negativi
20-25 EU/ml	10-12,5 UI/ml	Indeterminati (borderline)
>25 EU/ml	>12,5 UI/ml	Positivi

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso sono presenti per fornire semi-quantizzazione e devono essere usati ad ogni ciclo. I campioni dei pazienti contenenti elevati livelli di anticorpi possono fornire valori di assorbimento maggiori del Calibratore A.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Non eseguire il dosaggio su campioni che presentano emolisi macroscopica, contaminazione microbica o lipemia. Questo metodo deve essere utilizzato solo per testare campioni di siero umano. I risultati ottenuti servono solo come ausilio nella diagnosi. Considerati da soli, questi risultati non devono essere interpretati come diagnostici.

VALORI PREVISTI

I test ELISA per RF sono risultati molto più sensibili rispetto ai test di agglutinazione convenzionali. Circa il 90% dei pazienti con artrite reumatoide ha livelli elevati di RF con il

sistema ELISA, rispetto a circa il 70% con i test di agglutinazione.⁷ La maggior parte dei pazienti con artrite reumatoide mostra aumenti in 2 o più isotipi di RF, rispetto alle altre malattie reumatiche, come ad esempio il lupus eritematoso sistemico. Inoltre, i pazienti con artrite reumatoide hanno livelli maggiori di RF rispetto ad altre condizioni reumatiche. Le seguenti tabelle riassumono la significatività dei vari isotipi di RF.^{9,12} Le tabelle seguenti riassumono la prevalenza di RF riportata in letteratura.

prevalenza di isotipi RF nelle malattie reumatiche

Isotipo RF	~prevalenza (%)
IgM	60
IgG	44
IgA	51
IgM, IgG, and/or IgA	70-90

Incidenza di RF nei pazienti con malattie reumatiche^{6,9,11-14}

Sindrome di Sjogren	60%
Lupus eritematoso sistemico	35%
Sclerosi sistemica	25%
Malattia del tessuto connettivo misto	15%
Artrite reumatoide giovanile	15%
Polimiosite/dermatomiosite	10%

Serie di campioni clinici sono state testate con i dosaggi Immulisa™ RF ELISA. La tabella seguente fornisce i risultati dell'incidenza nelle popolazioni per questo studio.

Gruppo di pazienti	IgA		IgG		IgM	
	n	n pos (%)	n	n. pos (%)	n	n. pos (%)
Artrite reumatoide	249	131 (52.6%)	249	126 (50.6%)	249	176 (70.7%)
Artrite giovanile	10	0	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Osteoartrite	30	0	30	0	30	1 (3.3%)
Artrite psoriasica	33	2 (6.1%)	33	3 (9.1%)	33	2 (6.1%)
Spondiloartrite	33	1 (3%)	33	0	33	1 (3.3%)
Chrug-Strauss	10	1 (10%)	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Malattia CT mista	10	1 (10%)	10	2 (20%)	10	4 (40%)
Sjögren	20	9 (45%)	20	2 (10%)	20	11 (55%)
Lupus eritematoso sistemico	30	11 (36.7%)	30	6 (20%)	30	5 (16.7%)
Sclerosi sistemica	20	3 (15%)	20	4 (20%)	20	5 (25%)
Wegner	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)
Varie AI*	36	0	36	2 (5.6%)	36	1 (2.8%)
Varie ID**	70	4 (5.7%)	70	1 (1.4%)	70	6 (8.6%)
Normali sani	122	5 (4.1%)	120	7 (5.8%)	144	5 (3.5%)

*INCLUDE CELIACI (8), GRAVES (10), HASHIMOTO (8), COLITE ULCEROSA (10)

** INCLUDE SIFILIDE (10), ROSOLIA (10), MONONUCLEOSI (5), LINFATICA (5), HCV (10), CMV (10), HSV (10), TOXOPLASMOSSI (10)

La sensibilità clinica e la specificità per RA che usa questi dosaggi sono riassunte di seguito*:

RF IgA

RF IgG

RF IgM

Sensibilità	Specificità	Sensibilità	Specificità	Sensibilità	Specificità
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

* Esclude NHS.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità dei dosaggi Immulisa™ RF ELISA è stata valutata analizzando campioni serici di artrite reumatoide ben caratterizzati, accanto a controlli di malattia e sieri umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su kit ELISA commercialmente disponibili. Questi risultati sono riepilogati nella seguente tabella.

A. Confronto dei metodi: Immulisa™ RF ELISA vs. altro ELISA antic. anti-RF.

		Altro ELISA RF IgA		
		Positivi	Negativi	Totale
IMMCO	Positivi	113	9	122
RF IgA	Negativi	5	250	255
ELISA	Totale	118	259	377

Concordanza percentuale positiva: 95,8% (95% CI 89,9% - 98,4%)

Concordanza percentuale negativa: 96,5% (95% CI 93,3% - 98,3%)

Concordanza percentuale totale: 96,3% (95% CI 93,7% - 99,9%)

Malattia associata: 147

Controllo di malattia: 230

		Altro ELISA RF IgG		
		Positivi	Negativi	Totale
IMMCO	Positivi	88	24	112
RF IgG	Negativi	7	271	278
ELISA	Totale	95	295	390

Concordanza percentuale positiva: 92,6% (95% CI 89,4% - 96,7%)

Concordanza percentuale negativa: 91,8% (95% CI 88,0% - 94,6%)

Concordanza percentuale totale: 92,1% (95% CI 88,8% - 94,5%)

Malattia associata: 154

Controllo di malattia: 236

		Altro ELISA RF IgM		
		Positivi	Negativi	Totale
IMMCO	Positivi	124	16	140
RF IgM	Negativi	4	235	239
ELISA	Totale	128	251	379

Concordanza percentuale positiva: 96,9% (95% CI 91,7% - 99,0%)

Concordanza percentuale negativa: 93,6% (95% CI 89,7% - 96,2%)

Concordanza percentuale totale: 94,7% (95% CI 91,8% - 96,7%)

Malattia associata: 139

Controllo di malattia: 239

- B. Réactivité croisée : Un total de 106 spécimens à réaction potentiellement croisée d'individus ayant d'autres troubles auto-immunitaires et maladies infectieuses non rapportées pour démontrer une forte incidence aux anticorps du

fattore reumatico ont été testés en utilisant le système Immulisa™ d'ELISA pour facteur reumatico.

Condizione	IgA		IgG		IgM	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)	n	n pos (%)
Malattia celiaca	8	0	8	0	8	0
Graves	10	0	10	1 (10.0%)	10	1 (10.0%)
Hashimoto	8	0	8	0	8	0
Colite ulcerosa	10	0	10	1 (10.0%)	10	0
Sifilide	10	0	10	0	10	0
Rosolia	10	0	10	0	10	1 (10.0%)
Mononucleosi	5	1 (20.0%)	5	0	5	0
Malattia linfatica	5	0	5	0	5	0
HCV	10	1 (10%)	10	1 (10.0%)	10	2 (20.0%)
CMV	10	0	10	0	10	0
HSV	10	1 (10%)	10	0	10	2 (20.0%)
Toxoplasmosi	10	1 (10%)	10	0	10	1 (10.0%)
Totale	106	4 (3.8%)	106	3 (2.8%)	106	7 (6.6%)

Precisione

La precisione è stata testata con campioni positivi selezionati nell'intervallo del dosaggio per ogni isotipo. Cicli di dosaggio di 6 riproduzioni di ogni campione sono stati eseguiti in circa 21 giorni. La ripetibilità è stata determinata con 12 riproduzioni di ogni campione.

Campione	Media (unità/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
		DS (unità/ml)	CV %	DS (unità/ml)	CV %	DS (unità/ml)	CV %
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%
IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%
IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%

IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Riproducibilità qualitativa

Novanta riproduzioni di campioni nell'intervallo negativo, ~20% al di sotto del limite, ~20% al di sopra del limite e nell'intervallo positivo moderato del dosaggio sono stati eseguiti per determinare la riproducibilità qualitativa per ogni isotipo. Questi campioni sono stati testati più volte. I risultati del dosaggio per ogni campione hanno prodotto il 100% di accordo qualitativo.

Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) per gli anticorpi RF utilizzando questi dosaggi è stato determinato pari a 3,7 UE/ml per IgA, 2,2 UE/ml per IgG e 1,3 UI/ml per IgM, in base a 60 replicati del bianco e 10 replicati ciascuno dei 6 campioni a basso livello (NHS).

Linearità

Per determinare l'intervallo lineare del dosaggio, sono stati effettuati studi utilizzando serie di diluizioni equidistanti dei campioni positivi con i valori attraverso l'intervallo del calibratore. L'intervallo lineare determinato per RF IgA era di 3,3-160 UE/ml. L'intervallo lineare determinato per RF IgG era di 2,6-160 UE/ml. L'intervallo lineare determinato per RF IgM era di 1,2-80 UI/ml. I risultati sono riepilogati di seguito. Si raccomanda di diluire e ripetere il test sui campioni che producono risultati maggiori al calibratore superiore.

Campione	Intervallo del test (unità/ml)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero
IgA 1	4.8 - 13.7	0.96 (0.86 - 1.06)	0.83 (-0.12 - 1.77)	1.00	91.2 - 100.0
IgA 2	10.5 - 64.9	0.96 (0.84 - 1.09)	3.66 (-1.16 - 8.48)	0.98	83.4 - 101.3
IgA 3	17.3 - 155.0	1.00 (0.88 - 1.14)	2.55 (-9.4 - 14.5)	0.99	88.0 - 104.1
IgG 1	3.6 - 13.8	1.00 (0.92 - 1.08)	0.33 (-0.40 - 1.07)	1.00	92.2 - 100.9
IgG 2	7.0 - 68.7	1.01 (0.89 - 1.12)	1.81 (-2.85 - 6.47)	0.99	87.5 - 100.1
IgG 3	16.1 - 154.7	1.07 (0.95 - 1.20)	-1.59 (-13.3 - 10.2)	1.00	88.2 - 105.6
IgM 1	2.0 - 8.1	0.97 (0.82 - 1.26)	-0.50 (-2.60 - 1.25)	0.99	83.0 - 102.3
IgM 2	8.1 - 61.4	0.96 (0.91 - 1.01)	1.43 (-0.56 - 3.43)	1.00	87.6 - 103.1
IgM 3	13.0 - 73.3	1.00 (0.84 - 1.15)	2.24 (-4.88 - 9.36)	1.00	89.4 - 100.0

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di isotipi RF con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa con le seguenti sostanze ai livelli indicati: Emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 µmol/l), colesterolo (13 mmol/l) e trigliceridi (37 mmol/l). Fu annotato che campioni di bilirubina, colesterolo e trigliceride hanno dimostrato fino a +10% in più di differenza rispetto al coefficiente previsto di percentuale di variante di questi dosaggi. Notare i requisiti di campioni elencati in Limiti della procedura



ImmLisa™ Enhanced RF ELISAs

Detecção do Factor Reumatóide da IgA, IgG ou IgM (RF)

IVD Para utilização diagnóstica *in vitro*

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5138A	RF IgA ELISA	96 Determinações
REF 5138G	RF IgG ELISA	96 Determinações
REF 5138M	RF IgM ELISA	96 Determinações

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Ensaio ELISA ImmLisa Enhanced™ para anticorpos IgA do FR: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a deteção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos IgA do fator reumatóide no soro humano para ajudar no diagnóstico de artrite reumatoide (AR) em conjugação com outros exames laboratoriais e descobertas clínicas.

Ensaio ELISA ImmLisa Enhanced™ para anticorpos IgG do FR: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a deteção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos IgG do fator reumatóide no soro humano para ajudar no diagnóstico de artrite reumatoide (AR) em conjugação com outros exames laboratoriais e descobertas clínicas.

Ensaio ELISA ImmLisa Enhanced™ para anticorpos IgM do FR: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a deteção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos IgM do fator reumatóide no soro humano para ajudar no diagnóstico de artrite reumatoide (AR) em conjugação com outros exames laboratoriais e descobertas clínicas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A medição do RF é importante no diagnóstico e prognóstico da artrite reumatóide, pois as elevadas titragens de RF ocorrem no soro de pacientes com tendência a desenvolver complicações extra-articulares.^{1,2} A maioria dos testes laboratoriais de rotina medem o IgM RF pela sua capacidade de aglutinar os glóbulos vermelhos de carneiro, látex ou partículas similares revestidas com IgG.¹⁻⁴ No entanto, os estudos sugerem que o RF de outros isótipos de imunoglobulina está igualmente presente na artrite reumatóide.⁵⁻⁸

O FR está presente em 70-90% dos pacientes com artrite reumatoide e está incluído nos critérios de classificação.¹⁰ De acordo com os critérios ARA, um resultado positivo baixo para FR contribui com 2 em 6 pontos e um resultado positivo elevado para FR contribui com 3 de 6 pontos na classificação de AR definitiva.

O RF conforme detectado por aglutinação é do isótipo IgM. Outros métodos, como o ELISA, possuem uma especificidade, sensibilidade e rigor melhorados, comparativamente com os métodos de aglutinação existentes e utilizados de forma rotineira.³⁻⁵ Os métodos ELISA podem detectar RF de diversos isótipos de imunoglobulina. Esta distanciação não é possível com os testes de aglutinação tradicionais. Níveis significativos de um isótipo de RF normalmente encontrados nas doenças reumáticas e elevações de diversos isótipos constituem em conjunto praticamente um diagnóstico de artrite reumatóide.⁷ Uma combinação de RF positivo de IgM, IgG IgA possui um valor preditivo de 96%, quando comparado a 62% para o IgM RF isoladamente.⁸ Uma combinação de resultados de FR para IgM, IgG e IgA aumenta a sensibilidade da AR em comparação com resultados de FR para IgM isolados.⁹

PT

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Os micropoços são revestidos com IgG purificado de coelho, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação da proteína não específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e o soro do paciente são incubados em poços revestidos com antigénios, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antigénio. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados pela adição de uma enzima conhecida como conjugado IgA, IgG ou IgM anti-humana aos micropoços. O conjugado não ligado é eliminado através de lavagem. Posteriormente, é adicionado aos poços um substrato de uma enzima específica (TMB) e a presença de anticorpos é detectada através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reacção colorida. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em Unidades ELISA por mililitro (EU/ml) para RF IgA e RF IgG e Unidades Internacionais por milímetro (IU/ml) para RF IgM, comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

Foram realizados estudos abertos com materiais/reagentes que demonstram estabilidade durante um mínimo de 30 dias.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser consideradas potencialmente infecciosos. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.¹⁰

A solução de paragem é uma solução diluída de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) é venenoso e corrosivo. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos. Evitar a exposição a bases, metais ou outros compostos que possam reagir com ácidos.

O Substrato Enzimático TMB contém um irritante que pode ser nocivo se inalado, ingerido ou absorvido através da pele. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos.

As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit com componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

PT

Cuidado: a lei federal dos Estados Unidos limita este dispositivo a venda por ou a pedido de um médico licenciado.

Material fornecido

ImmuLisa™ RF IgA ELISA

REF 5138A

ImmuLisa™ RF IgG ELISA

REF 5138G

ImmuLisa™ RF IgM ELISA

REF 5138M

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE RF	Microplaca com micropoços individuais separados. Revestida com antígeno de coelho IgG. Pronta a utilizar,
1 x 1.75 ml	CONTROL + RFA	Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para RF IgA. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL + RFG	Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para RF IgG. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL + RFM	Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para RF IgM. A faixa de concentração esperada em IU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Controlo Negativo pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFA CALIBRATOR B RFA CALIBRATOR C RFA CALIBRATOR D RFA CALIBRATOR E RFA	Conjunto de 5 Calibradores prontos a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 EU/ml e Calibrador E (tampa laranja) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos RF IgA. As concentrações em EU/ml estão impressas nas etiquetas.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFG CALIBRATOR B RFG CALIBRATOR C RFG CALIBRATOR D RFG CALIBRATOR E RFG	Conjunto de 5 Calibradores prontos a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 EU/ml e Calibrador E (tampa laranja) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos RF IgG. As concentrações em EU/ml estão impressas nas etiquetas.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RFM CALIBRATOR B RFM CALIBRATOR C RFM CALIBRATOR D RFM CALIBRATOR E RFM	Conjunto de 5 Calibradores prontos a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 80 IU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 40 IU/ml, Calibrador C (tampa azul) 20 IU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 10 IU/ml e Calibrador E (tampa laranja) 1 IU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos RF IgM. As concentrações em IU/ml estão impressas nas etiquetas.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Conjugado HRP de cabra IgA anti-humano. Pronta a utilizar, Código de cor rosa.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado HRP de coelho IgG anti-humano. Pronta a utilizar, Código de cor rosa.

PT

1 x 15 ml IgM-CONJ|HRP

Conjugado HRP de cabra IgM anti-humano. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.

1 x 60 ml DIL

Diluyente de Soro. Pronto a utilizar, Código de cor púrpura.

1 x 15 ml SUBSTRATE|TMB

Substrato enzimático TMB Pronto a utilizar, **Proteger da luz.**

1 x 15 ml STOP|H2SO4

Solução de Paragem. Pronto a utilizar,

2 x vials BUF|WASH

Tampão de Lavagem de Pó. **Reconstituir para um litro cada.**

1 x

Folhas de Protocolo.

Componentes Opcionais

1 x 60ml BUF|WASH

Tampão de Lavagem líquido concentrado. **Reconstituir para um litro.**

Símbolos utilizados nas etiquetas



Número de lote



Número de catálogo



[IVD] Utilização diagnóstica in vitro



Utilização por



Temperatura de armazenamento



Ler as instruções antes de utilizar



Número de testes



Fabricante

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2° a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras.

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Sugere-se que os reagentes sejam deixados em cima da bancada, no exterior da caixa, durante 30 minutos antes da sua utilização. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação dos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- **Uma boa técnica de lavagem é fundamental.** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de ponta larga. **Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.**
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.
- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

Método de Teste

1º Passo Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente

2º Passo Etiquetar folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.

3º Passo Para uma determinação qualitativa utilizar exclusivamente o Calibrador D (ampola com tampa amarela) .

ou

Para uma determinação semi-quantitativa utilizar os Calibradores A a E, conforme ilustrado no exemplo seguinte.

	Qualitativa			Semi-Quantitativa			
A	Branco	S5	Etc.	A	Branco	S1	Etc.
B	-Controlo	S6		B	-Controlo	S2	
C	+	S7		C	+ Controlo	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

4º Passo Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com 500ul de Diluente de Soro.

PT

5º Passo Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.

6º Passo Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.

Nota: Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.

7º Passo Incubar durante 30 minutos (± 5 min) a temperatura ambiente.

8º Passo Lavar 4x com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.

9º Passo Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.

10º Passo Incubar durante 30 minutos (± 5 min) a temperatura ambiente.

11º Passo Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.

12º Passo Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados para o Conjugado.

13º Passo Incubar durante 30 minutos (± 5 min) a temperatura ambiente.

14º Passo Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados na adição do Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de 30 minutos, da adição da solução de paragem.

15º Passo Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Devem ser executados calibradores, controlos positivos e negativos e um ensaio em branco de reagentes com cada ensaio para verificar a integridade e precisão do teste. A leitura de absorção do ensaio em branco de reagentes deve ser $< 0,3$. O calibrador A deve apresentar uma leitura de absorção de pelo menos 1,0; caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser < 10 UE/ml no caso de IgA e IgG e inferior a 5 UI/ml no caso de IgM. Ao efetuar determinações qualitativas, a densidade ótica do calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorção do controlo positivo. No caso de determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores que estejam dentro do intervalo indicado no frasco.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador D}} \times \text{Unidade do Calibrador D} = \text{Unidade da Amostra de Teste}^*$$

PT

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como "positivos" ou "negativos". Os resultados das amostras superiores ou iguais ao Calibrador D são considerados positivos.

Nota: As unidades para RF IgA e IgG estão em EU/ml. As unidades para IgM estão em IU/ml

2. **DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA**

Traçar a absorvância do Calibrador A até E, consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em U/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como "positivos," "negativos," ou "indeterminados", com valores unitários de EU/ml ou IU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados, a par de outros métodos laboratoriais.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados, testando doadores de sangue humano normal e amostras de controlos da doença artrite não reumatóide (n=147 IgA, 144 IgG e 142 IgM). A média dos indivíduos normais mais 2SD SD foi estabelecida como o corte do ensaio para IgA e foi atribuído um valor arbitrário de 20 EU/ml. A média dos indivíduos normais mais 2SD SD foi estabelecida como o corte do ensaio para IgG e foi atribuído um valor arbitrário de 20 EU/ml. A média dos indivíduos normais mais 2.5SD SD foi estabelecida como o corte do ensaio para IgM e foi atribuído um valor arbitrário de 10 IU/ml. A IMMCO sugere a utilização da série de referência seguinte. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

Valor RF IgA ou IgG	Valor RF IgM	Interpretação
<20 EU/ml	<10 IU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	10-12,5 IU/ml	Indeterminado (Linha divisória)
>25 EU/ml	>12,5 IU/ml	Positivo

Calibrador

Os calibradores prontos a utilizar são incluídos para permitir a semi-quantificação e devem ser utilizados em cada série. As amostras dos pacientes que contêm elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorção superiores aos do calibrador A.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipémicas. Este método deve ser exclusivamente utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem unicamente como ajuda ao diagnóstico. Caso sejam considerados isoladamente, estes resultados não devem ser interpretados como um diagnóstico

VALORES ESPERADOS

Os testes ELISA para o RF foram considerados mais sensíveis do que os testes de aglutinação convencionais. Aproximadamente 90% dos pacientes com artrite reumatóide apresentam RF elevado pelo sistema ELISA, comparativamente a cerca de 70% por aglutinação.^{7,8} A maioria dos pacientes com artrite reumatóide possuem elevação de 2 ou

PT

mais isótipos do RF, comparativamente a outras doenças reumáticas, como o lúpus eritematoso sistémico. Além disso, os pacientes reumatóides possuem níveis mais elevados de RF comparativamente a outras condições reumáticas. As seguintes tabelas resumem a significância dos diversos isótipos do RF.^{9,12} As tabelas seguintes resumem a prevalência do FR indicada na literatura.

Prevalência dos Vários Isótipos do RF

Isótipo RF	Prevalência (%)
IgM	66
IgG	44
IgA	51
IgM, IgG, and/or IgA	70-90

Incidência do RF em Pacientes com Doenças Reumáticas^{6,9,11-14}

Síndrome de Sjögren	60%
Lúpus eritematoso sistémico	35%
Esclerose sistémica	25%
Doença mista do tecido conjuntivo	15%
Artrite reumatoide juvenil	15%
Polimiosite/dermatomiosite	10%

Foram testados conjuntos de amostras clínicas pelo ImmuLisa™ RF ELISAs. Os resultados que demonstram a incidência deste estudo na população são seguidamente apresentados.

Grupo de Pacientes	IgA		IgG		IgM	
	n	n Pos	n	n Pos	n	n Pos
Artrite reumatoide	249	131 (52.6%)	249	126 (50.6%)	249	176 (70.7%)
Artrite juvenil	10	0	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Osteoartrite	30	0	30	0	30	1 (3.3%)
Artrite psoriática	33	2 (6.1%)	33	3 (9.1%)	33	2 (6.1%)
Espondiloartrite	33	1 (3%)	33	0	33	1 (3.3%)
Síndrome de Churg-Strauss	10	1 (10%)	10	1 (10%)	10	1 (10%)
Doença mista do tecido conjuntivo	10	1 (10%)	10	2 (20%)	10	4 (40%)
Síndrome de Sjögren	20	9 (45%)	20	2 (10%)	20	11 (55%)
Lúpus eritematoso sistémico	30	11 (36.7%)	30	6 (20%)	30	5 (16.7%)
Esclerose sistémica	20	3 (15%)	20	4 (20%)	20	5 (25%)
Granulomatose de Wegener	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)	8	1 (12.5%)
Al. diversos*	36	0	36	2 (5.6%)	36	1 (2.8%)
ID. diversos**	70	4 (5.7%)	70	1 (1.4%)	70	6 (8.6%)
Pessoais normais saudáveis	122	5 (4.1%)	120	7 (5.8%)	144	5 (3.5%)

*inclui doença celíaca (8), doença de Graves (10), tiroidite de Hashimoto (8), colite ulcerativa (10)

** inclui sífilis (10), rubéola (10), mononucleose (5), doença de Lyme (5), VHC (10), CMV (10), HSV (10), toxoplasmose (10)

PT

A sensibilidade e especificidade clínicas da AR com a utilização destes ensaios são resumidas abaixo*:

FR IgA		FR IgG		FR IgM	
Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
52.6%	89.4%	50.6%	92.9%	70.7%	87.4%

* Exclui NHS.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLISA™ RF ELISAs foi avaliada através de testes a amostras de soro bem caracterizadas de artrite reumatóide, a par de controlos de doença e soro humano "normal". Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste ELISA comercialmente disponíveis. Os resultados são seguidamente resumidos.

A. Método Comparativo: ImmuLISA™ RF ELISAs vs. outros RF antibody ELISAs.

Outro RF IgA ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	113	9	122
RF IgA	Negativo	5	250	255
ELISA	Total	118	259	377

Acordo Percentual Positivo: 95,8% (95% CI 89,9% - 98,4%)

Acordo Percentual Negativo: 96,5% (95% CI 93,3% - 98,3%)

Acordo Percentual Global: 96,3% (95% CI 93,7% - 9,9%)

Associação de Doenças: 147

Controlo de Doenças: 230

Outro RF IgG ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	88	24	112
RF IgG	Negativo	7	271	278
ELISA	Total	95	295	390

Acordo Percentual Positivo: 92,6% (95% CI 89,4% - 96,7%)

Acordo Percentual Negativo: 91,8% (95% CI 88,0% - 94,6%)

Acordo Percentual Global: 92,1% (95% CI 88,8% - 94,5%)

Associação de Doenças: 154

Controlo de Doenças: 236

Outro RF IgM ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	124	16	140
RF IgM	Negativo	4	235	239
ELISA	Total	128	251	379

Acordo Percentual Positivo: 96,9% (95% CI 91,7% - 99,0%)

Acordo Percentual Negativo: 93,6% (95% CI 89,7% - 96,2%)

Acordo Percentual Global: 94,7% (95% CI 91,8% - 96,7%)

Associação de Doenças: 139

Controlo de Doenças: 239

B. Reatividade cruzada: um total de 106 espécimes com potencial reatividade cruzada obtidos de indivíduos com doenças autoimunes e doenças infecciosas não demonstrou uma elevada incidência de autoanticorpos para FR quando testado com os ensaios ELISA para FR ImmuLISA™.

PT

Condição	IgA		IgG		IgM	
	n	n Pos	n	n Pos	n	n Pos
Doença celíaca	8	0	8	0	8	0
Doenças de Graves	10	0	10	1 (10.0%)	10	1 (10.0%)
Tiroidite de Hashimoto	8	0	8	0	8	0
Colite ulcerativa	10	0	10	1 (10.0%)	10	0
Sífilis	10	0	10	0	10	0
Rubéola	10	0	10	0	10	1 (10.0%)
Mononucleose	5	1 (20.0%)	5	0	5	0
Doença de Lyme	5	0	5	0	5	0
VHC	10	1 (10%)	10	1 (10.0%)	10	2 (20.0%)
CMV	10	0	10	0	10	0
HSV	10	1 (10%)	10	0	10	2 (20.0%)
Toxoplasmose	10	1 (10%)	10	0	10	1 (10.0%)
Total	106	4 (3.8%)	106	3 (2.8%)	106	7 (6.6%)

Precisão

A precisão foi testada com 7 espécimes positivos selecionados durante o ensaio para cada isotipo. Foram realizadas séries de 6 réplicas de cada espécime durante aproximadamente 21 dias. A repetibilidade foi determinada com 12 réplicas de cada espécime.

Amostr a	Média (unidade s/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na experiência (Repetibilidade)	
		SD (unidade s/ml)	CV%	SD (unidade s/ml)	CV%	SD (unidade s/ml)	CV%
IgA 1	9.2	0.54	5.9%	0.37	4.0%	0.39	4.2%
IgA 2	14.9	0.81	5.5%	0.57	3.8%	0.58	3.9%
IgA 3	21.2	1.20	5.7%	0.71	3.3%	0.97	4.6%
IgA 4	26.4	1.42	5.4%	1.22	4.6%	0.73	2.8%
IgA 5	74.6	5.00	6.7%	3.86	5.2%	3.18	4.3%
IgA 6	115.6	5.28	4.6%	4.09	3.5%	3.34	2.9%
IgA 7	158.1	6.36	4.0%	3.89	2.5%	5.03	3.2%
IgG 1	8.8	0.76	8.7%	0.43	4.9%	0.63	7.2%
IgG 2	16.4	1.04	6.3%	0.71	4.3%	0.76	4.6%
IgG 3	19.4	1.06	5.5%	0.6	3.1%	0.88	4.5%
IgG 4	22.7	1.08	4.8%	0.54	2.4%	0.94	4.1%
IgG 5	45.9	2.16	4.7%	1.11	2.4%	1.86	4.0%
IgG 6	79.7	4.92	6.2%	4.15	5.2%	2.65	3.3%
IgG 7	133.0	6.36	4.8%	4.14	3.1%	4.83	3.6%
IgM 1	4.8	0.17	3.6%	0.13	2.7%	0.11	2.4%
IgM 2	8.5	0.33	3.9%	0.11	1.3%	0.31	3.7%
IgM 3	10.3	0.79	7.7%	0.48	4.7%	0.63	6.1%
IgM 4	11.9	0.70	5.9%	0.54	4.5%	0.44	3.7%
IgM 5	25.6	1.08	4.2%	0.81	3.2%	0.71	2.8%
IgM 6	45.5	1.87	4.1%	1.46	3.2%	1.17	2.6%
IgM 7	80.2	3.64	4.5%	2.99	3.7%	2.08	2.6%

Reprodutibilidade qualitativa

Foram realizadas noventa réplicas de amostras na faixa negativa, ~20% abaixo do limite, ~20% acima do limite e na faixa positiva moderada do ensaio para determinar a reprodutibilidade de cada isotipo. Estas amostras foram testadas em várias séries. Os resultados do ensaio relativamente a cada espécime produziram uma concordância qualitativa de 100%.

Limite de Detecção

Os limites de detecção (LoD) para os anticorpos RF utilizando estes ensaios foram determinados como sendo 3.7 EU/ml para IgA, 2.2 EU/ml para IgG e 1.3 IU/ml para IgM, com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das 6 amostras de baixo nível (NHS).

Linearidade

Foram realizados estudos utilizando séries de diluições equidistantes de amostras positivas com valores através de toda a série de calibração, para determinar a série linear do ensaio. A série linear do RF IgA foi determinada como 3.3 – 160 EU/ml. A série linear do RF IgG foi determinada como 2.6 – 160 EU/ml. A série linear do ensaio RF IgM foi determinada como 1.2 – 80 IU/ml. Os resultados são seguidamente resumidos. Sugere-se que as amostras que produzam resultados superiores ao calibrador principal sejam diluídas e novamente testadas.

Amostra	Série de Teste	Desvio (95% CI)	Intercepção-Y (95% CI)	R ²	% Recuperação
IgA 1	4.8 - 13.7	0.96 (0.86 - 1.06)	0.83 (-0.12 - 1.77)	1.00	91.2 - 100.0
IgA 2	10.5 - 64.9	0.96 (0.84 - 1.09)	3.66 (-1.16 - 8.48)	0.98	83.4 - 101.3
IgA 3	17.3 - 155.0	1.00 (0.88 - 1.14)	2.55 (-9.4 - 14.5)	0.99	88.0 - 104.1
IgG 1	3.6 - 13.8	1.00 (0.92 - 1.08)	0.33 (-0.40 - 1.07)	1.00	92.2 - 100.9
IgG 2	7.0 - 68.7	1.01 (0.89 - 1.12)	1.81 (-2.85 - 6.47)	0.99	87.5 - 100.1
IgG 3	16.1 - 154.7	1.07 (0.95 - 1.20)	-1.59 (-13.3 - 10.2)	1.00	88.2 - 105.6
IgM 1	2.0 - 8.1	0.97 (0.82 - 1.26)	-0.50 (-2.60 - 1.25)	0.99	83.0 - 102.3
IgM 2	8.1 - 61.4	0.96 (0.91 - 1.01)	1.43 (-0.56 - 3.43)	1.00	87.6 - 103.1
IgM 3	13.0 - 73.3	1.00 (0.84 - 1.15)	2.24 (-4.88 - 9.36)	1.00	89.4 - 100.0

Interferência

A interferência foi estudada, através da mistura do soro com os níveis conhecidos de isotopos RF com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), Colesterol (13 mmol/L) e Triglicéridos (37 mmol/L). Observou-se que os espécimes reforçados com bilirrubina, colesterol e triglicéridos demonstraram uma diferença até +10% superior relativamente à percentagem do coeficiente de variação previsto nestes ensaios. Consulte os requisitos das amostras indicados na secção Limitações do procedimento.

REFERENCES

1. Jónsson T et al. Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? *Ann Rheum Dis.* 1993; 52: 161-164.
2. van Zeben D et al. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis.* 1992; 51:1029-1035.
3. Shmerling RH et al. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am J Med.* 1991; 91:528-534.
4. Wolfe F et al. The latex test revisited-rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. *Arthr Rheum.* 1991; 34:951-960.
5. Bampton JLM et al. Measurement of rheumatoid factors by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and comparison with other methods. *Ann Rheum Dis.* 1985; 44: 13-19.
6. Markusse HM et al. Rheumatoid factor isotypes in serum and salivary fluid of patients with primary Sjögren's Syndrome. *Clin Immun Immunopath.* 1993; 66:26-32.
7. Jónsson P. Studies on the clinical significance of rheumatoid factor isotypes. Thesis University of Iceland, Reykjavik Iceland, 1993.
8. Jónsson T et al. Combined elevation of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1998; 18: 119-22.
9. Vallbracht I et al. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic Citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 1079-1084.
10. Aletaha D et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2569-2581.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
12. Sheldon J. Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004; 18:249-69.
13. Atkinson JC et al. Serum anti-SS-B/La and IgA rheumatoid factor are markers of salivary gland disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthr Rheum.* 1992; 35:1368-1372.
14. Anderson LG et al. The spectrum of benign to malignant lymphoproliferation in Sjögren's Syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1972; 10:199-221.
15. Saulsbury FT. Heavy and light chain composition of serum IgA and IgA rheumatoid factor in Henoch-Schönlein purpura. *Arthr Rheum.* 1992; 35:1377-1380.
16. Saulsbury FT. IgA rheumatoid factor in Henoch Schönlein purpura. *J Pediatr.* 1986; 108:71-76.
17. Bas S et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis *Rheumatology.* 2003; 42:677-680.
18. Westwood OMR et al. Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology.* 2006; 45:379-385.
19. Ingegnoli F et al. Rheumatoid factors: clinical applications. *Dis Markers.* 2013; 35:727-34.
20. Barcelos F et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Sjögren's syndrome. *Acta Reumatol Port.* 2009; 34:608-12.
21. Huo AP et al. Predictive and prognostic value of antinuclear antibodies and rheumatoid factor in primary Sjogren's syndrome. *Int J Rheum Dis.* 2010; 13:39-47.
22. Mimura Y et al. Rheumatoid factor isotypes in mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol.* 2006; 25:572-4.

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante Autorizzato/Representante
Autorizado/Représentant Autorisé
EMERGO Group, Inc.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

December 2015
Document No. PI5138