



# Immuli<sup>TM</sup> Rheumatoid Factor IgM ELISA

IVD

## PRODUCT INSERT

REF	Code	1139	96 Determinations
-----	------	------	-------------------

## INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for the detection and quantitation of Rheumatoid Factor (RF) IgM isotype in human serum.

## 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<sup>1,2</sup>. 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<sup>1-4</sup>.

RF is present in 70-90% of patients with rheumatoid arthritis and is included in the classification criteria<sup>5</sup>. According to the revised ARA criteria, if RF is positive in patients with arthritis of three or more joints then the patient has rheumatoid arthritis. Arthritis of less than three joints with RF negative excludes rheumatoid arthritis. Such a classification affords 93.5% sensitivity and 89.3% specificity for rheumatoid arthritis<sup>5</sup>.

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<sup>3,4,6</sup>. ELISA methods can detect RF of various immunoglobulin isotypes. Such a distinction is not possible with traditional agglutination tests.

## PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

IgG is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any RF present to bind. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin. After washing away any unbound conjugate, specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells. After stopping the enzymatic reaction, the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in International units per milliliter (IU/ml, WHO).

## REAGENTS

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** 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. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

### Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. 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<sup>17</sup>. **WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly

explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

**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 other than the same catalog number from IMMCO DIAGNOSTICS.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

**Materials provided**

ImmuLisa™ IgM-RF ELISA **REF** 1139

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

<b>12 x 8</b>	<b>MICROPLATE RF</b>	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with IgG antigen.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR A IgM-RF</b> *	Ready to use <b>Calibrator A</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing RF antibodies.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR B IgM-RF</b> *	Ready to use <b>Calibrator B</b> ( <i>violet cap</i> ). Human serum containing RF antibodies.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR C IgM-RF</b> *	Ready to use <b>Calibrator C</b> ( <i>blue cap</i> ). Human serum containing RF antibodies.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR D IgM-RF</b> *	Ready to use <b>Calibrator D</b> ( <i>yellow cap</i> ). Human serum containing RF antibodies.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CONTROL + IgM-RF</b> *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for RF antibodies.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CONTROL -</b> *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
<b>1 x 12 ml</b>	<b>IgM-CONJ ALKPHOS</b> *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
<b>1 x 60 ml</b>	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
<b>1 x 12 ml</b>	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . Contains pNPP. <b>Protect from light.</b>
<b>1 x 12 ml</b>	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b> .
<b>2</b>	<b>BUF WASH</b>	Powder <b>Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

**Materials Required But Not Provided**

- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer

- Timer
- Absorbent paper
- 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. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

**PROCEDURE**

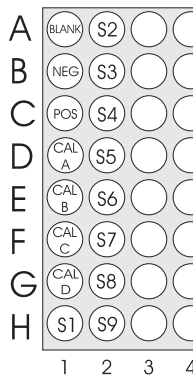
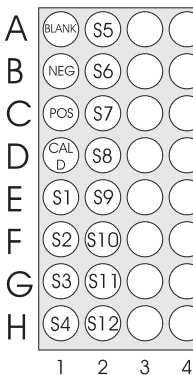
**Procedural Notes**

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

**Assay procedure**

1. **ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
2. Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.
3. **Qualitative determination:** use only Calibrator D.  
**Semi-quantitative determination:** use Calibrators A - D as shown in the example below.

**Qualitative determination:      Semi-quantitative determination:**



4. Prepare a **1:101** dilution of the patient specimen by mixing **5 µl** of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
5. Add **100 µl** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.

**Note:** Include one well with **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.

6. Incubate **30 minutes** (± 5 minutes) at room temperature on a level surface.

7. Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300µL of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
8. Add 100µL of the Conjugate to each well.
9. Incubate the wells for 30 minutes.
10. Wash step: Repeat step 7.
11. Add 100µL of Enzyme Substrate to each well.
12. Incubate for 30 minutes at room temperature.
13. Add 100µL of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
14. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or 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 <7 IU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the IU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser 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**

**Abs. of Test Sample**

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{IU/ml of Calibrator D} = \text{IU/ml Test Sample}$$

**Abs. of Calibrator D**

**2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION**

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in IU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

**Calibrator**

The calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each test. Patient specimens containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining IU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

**Interpretation**

The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

RF-IgM	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valueur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação

<7 IU/ml	Neg (-)
7-9 IU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>9 IU/ml	Pos (+)

The cutoff values for negative, indeterminate and positive were determined by testing 99 samples from healthy blood donors. When indeterminate values are obtained, the sample should be retested before reporting the results. If the values remain indeterminate, repeated testing of the patient ought to be considered.

#### **LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

The IgM-RF Test System should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated 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 and should not be interpreted as diagnostic in themselves.

#### **EXPECTED VALUES**

RF is present in 59% of patients with rheumatoid arthritis (5). Serum IgM-RF is positive in 58% of Sjögren's Syndrome patients (8,9). As compiled from the cited literature, the incidence of RF in rheumatoid arthritis or other rheumatological disorders is summarized in table 1 at the end of this document:

#### **PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

The IgM-RF Test System was compared with a commercially available test kit for the detection of RF in human serum.

A total of 87 sera were obtained from a clinical reference laboratory. They were identified as positive or negative for RF and were tested according to the procedures recommended by the manufacturer. The results are summarized in table 2 at the end of this document.

The ImmuLisa IgM-RF Test System showed a significant correlation and relative agreement with another predicate device, with a correlation coefficient of 0.8 and a slope of 0.95.

#### **Precision:**

The inter-assay and intra-assay Coefficient of Variation (CV) of the IgM-RF Test System ranges from 5% to 10% depending upon the levels of RF. Using three positive serum samples with varying RF levels in six replicates, intra- and inter- assay CV values are 0.8 to 4.1% and 3.0 to 8.2% respectively.



# ImmuLisa™

## Facteur Rhumatisme (RF) IgM

### ELISA

IVD

**REF**      **Code**      1139      96 Determinations

RF IgM est un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) pour la détection semi-quantitative des anticorps IgM contre le facteur rhumatisme (RF) dans les sérums des patients.

#### GENERALITES

La mesure du RF est importante dans le diagnostic et le pronostic de l'arthrite rhumatoïdes, car les titres élevés du RF se produisent en sérums des patients qui développent des complications supplémentaire-articulaires <sup>1,2</sup>. Les la plupart des essais en laboratoire courants mesure IgM RF par sa capacité d'agglutiner les globules rouges de moutons, le latex ou les particules semblables enduits d'IgG <sup>1,4</sup>.

Le RF est présent dans 70-90% de patients présentant l'arthrite rhumatoïdes et est inclus dans les critères de classification <sup>5</sup>. Selon les critères révisés d'ARA, si le RF est positif dans les patients présentant l'arthrite de trois joints ou plus puis le patient a l'arthrite rhumatoïdes. L'arthrite de moins de trois joints avec le négatif de RF exclut l'arthrite rhumatoïdes. Une telle classification a les moyens la spécificité 93.5% la sensibilité et 89.3% pour l'arthrite rhumatoïdes <sup>5</sup>.

Le RF comme détecté par l'agglutinement est de l'isotype IgM. D'autres méthodes telles qu'ELISA ont amélioré la spécificité, exister d'excédent de sensibilité et de fiabilité et les méthodes par habitude utilisées d'agglutinement <sup>3,4,6</sup>. Les méthodes d'ELISA peuvent détecter le RF de divers isotypes d'immunoglobuline. Une telle distinction n'est pas possible avec les essais d'agglutinement traditionnels.

#### PRINCIPE DU TEST

L'IgG est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène. La plaque est bloqué pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les RF présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Ces anticorps lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence de RF sera déterminée en comparant la densité optique de l'échantillon à celle d'une courbe d'étalonnage à quatre points. Les résultats sont enregistrés de façon semi-quantitative en unités internationales/ml (IU/ml, WHO).

#### CONTENU DU COFFRET

##### Conditions de conservation

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.

N'employez pas si le réactif n'est pas clair.

Tampon de lavage: Ajoutez l'eau distillée ou désionisée pour le volume de 1L.

Micropuits: Employez une fois seulement.

### Précautions

Tout le matériel d'origine humain utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.

L'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) est utilisé comme conservateur.  $\text{NaN}_3$  est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.

Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.

Employez les bonnes techniques de laboratoire pour réduire au minimum la contamination microbienne et chimique.

**N'employez pas après date d'échéance.**

### Matériel fourni

ImmuLisa™ IgM-RF ELISA **REF** 1139

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 déterminations chacune.

12 x 8	<b>MICROPLATE RF</b>	barettes de 96 micropuits individuels, revêtue d'IgG
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RF-IgM</b> *	étalon A (chapeau vert), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RF-IgM</b> *	étalon B (chapeau violet), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RF-IgM</b> *	étalon C (chapeau bleu), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D RF-IgM</b> *	étalon D (chapeau jaune), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RF-IgM</b> *	contrôle positif (chapeau rouge), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	contrôle négatif (chapeau blanc), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 12 ml	<b>IgM-CONJ ALKPHOS</b> * †	conjugué phos. alc. Rose codé par couleur.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluant pour échantillons. Bleu codé par couleur.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrat enzymatique. Contient le pNPP.
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	solution d'arrêt
2	<b>BUF WASH</b>	tampon de lavage pour 1 litre/flacon

\* Contient < 0.1%  $\text{NaN}_3$

## Autre matériel nécessaire non fourni

- Pipettes pour 5- 1000 µl
- Cônes jetables
- Tubes de 4ml pour la dilution de sérum
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Temporisateur
- Papier absorbant

## Echantillons

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter. Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Évitez la congélation répétée et le dégel.

## MÉTHODE

### Préparation du test

- Avant de commencer l'analyse a lu ces instructions soigneusement.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Matériaux de retour au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des spécimens patients avant de commencer l'essai.
- **Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.**
- Lavage: La bonne technique est critique. Une rondelle automatisée de plaque microtitration ELISA est recommandée.
- Utiliser une pipette multicanale capable de fournir 8 positions simultanément. Ceci expédie le processus et prévoit un temps plus uniforme d'incubation.
- La synchronisation soigneuse est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution du réactifs.

### Exécution du test

1. **PORTER TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS À TEMPERATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT DE LES UTILISER.**
2. Employer le page de protocole pour noter la position des spécimens dans le plaque microtitration. Il est dans de bons habitudes de laboratoire d'examiner des spécimens deux fois.
3. **Détermination qualitative :** employer seulement étalon D.  
**Détermination semi - quantitative :** employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.

**Détermination qualitative :**      **Détermination semi - quantitative :**

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
	1	2	3	4

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
	1	2	3	4

4. Préparez une dilution de **1:101** du spécimen patient en mélangeant **5 µl** du spécimen patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
  5. Distribuer 100 µl des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits.
- Note :** Incluez une position avec **100 µl** du diluant pour échantillons comme blanc de réactif. La valeur nulle du lecteur de plaque microtitration devrait être placée en utilisant cette position. L'absorbance de ce micropuit ne devrait pas être 0.3 plus grand que.
6. Laisser incubé pendant 30 minutes à température ambiante.
  7. Lavage: aspirer le contenu de tous les puits. Ajouter 200-300µl de tampon dans tous les puits et l'aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne séchez pas les puits complètement.
  8. Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque puits.
  9. Laisser incubé pendant 30 minutes à température ambiante.
  10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
  11. Distribuer 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puits
  12. Laisser incubé 30 minutes à température ambiante.
  13. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
  14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puits à 405nm en utilisant un lecteur simple ou dual de plaque microtitration de longueur d'onde contre l'ensemble blanc de réactif à l'absorbance nulle.

### Contrôle de qualité

Des étalons, le contrôle positif et le contrôle négatif et un blanc doivent être courus avec chaque analyse pour vérifier l'intégrité et l'exactitude de l'essai. La lecture d'absorbance du blanc devrait être < 0.3. L'étalon A devrait avoir un DO pas moins de de 1.0, autrement l'essai doit être répété. La contrôle négative doit être <7 IU/ml. Si l'essai est exécuté deux fois, le moyen des deux lectures devrait être pris pour détermination de IU/ml. Tout en effectuant des déterminations qualitative, le DO d'étalon D doit être plus grand que le contrôle négatif et de moins que l'DO du contrôle positif. Pour des déterminations semi-quantitatives le contrôle positif doit avoir des valeurs dans la gamme imprimée sur la fiole.

## RÉSULTATS

### Calcul des résultats

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de deux méthodes :

#### 1. DÉTERMINATION QUALITATIVE

**D.O. de Spécimen**

----- X IU/ml de étalon D = IU/ml de Spécimen

**D.O. de Étalon D**

#### 2. DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Absorbance de parcelle de terrain de étalon A à D contre leur concentration respective sur un papier graphique linéaire-linéaire. Tracez la concentration dans IU/ ml sur l'X-axe contre l'absorbance sur l'Y-axe et dessinez la meilleure courbe convenable. Déterminez les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe contre sa valeur correspondante d'absorbance.

## Étalons

Les étalons sont inclus pour fournir semi - quantitation et doivent être employés avec chaque essai. Les spécimens patients contenant des niveaux plus élevés d'anticorps peuvent donner à des valeurs d'absorbance plus grandes que cela du étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises que de tels spécimens devraient être encore dilués ainsi ils font partie de la marge de la courbe d'étalonnage une fois essayés de nouveau. Pour la détermination de IU/ ml, multipliez les unités obtenues par le facteur de dilution.

## Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

RF-IgM	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<7 IU/ml	Neg (-)
7-9 IU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>9 IU/ml	Pos (+)

Les valeurs de coupure pour le négatif, les indéterminés et le positif ont été déterminés en examinant 99 échantillons provenant des donateurs de sang en bonne santé. Quand des valeurs indéterminées sont obtenues, l'échantillon devrait être essayé de nouveau avant de rapporter les résultats. Si les valeurs demeurent essai indéterminé et répété du patient doivent être considérées.

## LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

L'IgM-RF système ne devrait pas être exécuté dessus les échantillons hémolysés excessivement, par microbes souillés ou lipémiques. Cette méthode devrait être employée pour examiner les échantillons humains de sérum seulement. Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic dans eux-mêmes.

## VALEURS PRÉVUES

Le RF est présent dans 59% de patients présentant l'arthrite rhumatoïde <sup>5</sup>. Le sérum IgM-RF est positif dans 58% de patients de Syndrome de Sjögren <sup>8,9</sup>. Comme compilé de la littérature citée, l'incidence du RF dans l'arthrite rhumatoïde ou d'autres désordres rhumatismal est récapitulée dans le tableau 1 à la fin de ce document.

## CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

L'IgM-RF système a été comparé à un kit disponible dans le commerce d'essai pour la détection du RF en sérum humain.

Un total de 87 sérums ont été obtenus à partir d'un laboratoire clinique de référence. Ils ont été identifiés en tant que positif ou négatif pour le RF et ont été examinés selon les procédures recommandées par le fabricant. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 2 à la fin de ce document.

L'ImmuLISA IgM-RF système a montré une corrélation significative et un accord relatif avec un autre dispositif d'attribut, avec un coefficient de corrélation de 0.8 et une pente de 0.95.

## Précision :

L'inter-analyse et l'intra-analyse CV du l'IgM-RF système s'étend de 5% à 10% dépendant des niveaux de RF. Avec trois échantillons positifs de sérum avec changer des niveaux de RF dans six répliques, les intra- et inter valeurs de cv d'analyse sont de 0.8 à 4.1% et 3.0 à 8.2% respectivement.



# Immuli<sup>TM</sup> Antifactor Reumatoide (RF) IgM ELISA

IVD

**REF**      **Code**    1139      96 Determinations

RF IgM es un ensayo basado en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la detección semi cuantitativa de anticuerpos antifactor reumatoide (FR) IgM en suero de pacientes.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La medida del RF es importante en la diagnosis y el pronóstico de la artritis reumatoide, pues los altos títulos del RF ocurren en sueros de los pacientes que desarrollan las complicaciones adicional-articulares <sup>1,2</sup>. La mayoría de los pruebas de laboratorio rutinarios miden IgM RF por su capacidad de aglutinar las células de sangre rojas de las ovejas, el látex o las partículas similares cubiertos con IgG <sup>1-4</sup>.

El RF está presente en 70-90% de pacientes con artritis reumatoide y se incluye en los criterios de la clasificación <sup>5</sup>. Según los criterios revisados de ARA, si el RF es positivo en pacientes con la artritis de tres o más empalmes entonces el paciente tiene artritis reumatoide. La artritis de menos de tres empalmes con la negativa del RF excluye artritis reumatoide. Tal clasificación produce la especificidad 93.5% la sensibilidad y 89.3% para la artritis reumatoide <sup>5</sup>.

El RF según lo detectado por la aglutinación está del isotipo de IgM. Otros métodos tales como ELISA han mejorado la especificidad, el existir y los métodos rutinariamente usados de la aglutinación <sup>3,4,6</sup> del excedente de la sensibilidad y de la confiabilidad. Los métodos de ELISA pueden detectar el RF de los varios isotipos de la inmunoglobulina. Tal distinción no es posible con las pruebas de aglutinación tradicionales.

## PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

Los pocillos de la microplaca contienen IgG. La microplaca se bloquea para reducir reacciones no específicas. Se añaden controles, calibradores y muestras diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los RF al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado humana a cada pocillo. Este la enzima conjugó los anticuerpos ata específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase apropiada. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se agrega el sustrato enzimático específico (pNPP). Tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. Se determina la presencia o ausencia de RF por medio de la comparación de la densidad óptica de la muestra con la de una curva de calibración de cuatro puntos. Los resultados se dan a conocer de forma semicuantitativa en unidades internacionales/ml (IU/ml, WHO).

## REACTIVOS

### Condiciones de Almacenaje

Guardar todos los reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente. No utilizar si el reactivo no está claro.

Tampón de lavado: Agregar el agua destilada o desionizada para el volumen del 1L.

Micropocillos: Utilizar una vez solamente.

## Precauciones

Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HbsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, los reactivos deben manejarse como si fueran material potencialmente contagioso.

Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.

La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes.

Utilizar las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química.

No utilizar después de fecha de vencimiento.

## Materiales Suministrados

ImmuLisa™ IgM-RF ELISA **REF** 1139

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 96 determinaciones.

12 x 8	<b>MICROPLATE RF</b>	Microplaca con los micropocillos disidentes individuales cubrió con el IgG.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RF-IgM</b> *	Calibrador A ( <i>casquillo verde</i> ), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RF-IgM</b> *	Calibrador B ( <i>casquillo violeta</i> ), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RF-IgM</b> *	Calibrador C ( <i>casquillo azul</i> ), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D RF-IgM</b> *	Calibrador D ( <i>casquillo amarillo</i> ), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RF-IgM</b> *	control positivo, listo para uso. ( <i>casquillo rojo</i> ). Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	control negativo, listo para uso. ( <i>casquillo blanco</i> ). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<b>IgM-CONJ ALKPHOS</b> * †	conjugado fos. alc. Color de rosa cifrado color.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	tampón de dilución para muestras. Azul cifrado color.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzimático. Contiene el pNPP. <b>Proteger contra luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	solución de parada
2	<b>BUF WASH</b>	tampón de lavado para 1 litro/vial

\* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Material necesario no incluido

- Micropipetas para 5 - 1000µl
- Puntas desechables para micropipeta
- Tubos para dilución de muestras, 4ml
- Agua destilada
- Lector de microplacas capaz de medir densidades ópticas a 405nm
- Botella para tampón de lavado

- Contador de tiempo
- Papel absorbente

### Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. Si el ensayo no se va completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Evitar congelar repetido y deshelar.

### PROCEDIMIENTO

#### Notas Procesales

- Antes comenzando con el análisis leer cuidadosamente el relleno del producto.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivo de la prueba equilibrar en la temperatura ambiente antes comenzando con el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al refrigerador inmediatamente después del uso.
- Todas las diluciones de las muestras pacientes se deben preparar antes comenzando con del análisis.
- Quitar requirió tiras del micropocillos de la bolsa y resellan cuidadosamente la bolsa para prevenir la condensación en los pozos inusitados. Volver la bolsa inmediatamente al refrigerador.
- *Lavado: La buena técnica es crítica. Se recomienda una arandela automatizada del microplaca.*
- Utilizar una pipeta de varios canales capaz de entregar 8 pozos simultáneamente. Esto apresura el proceso y preve por un más tiempo uniforme de la incubación.
- Para todos los pasos, el control cuidadoso de la sincronización es importante. El comienzo de todos los períodos de la incubación comienza con la terminación de la adición del reactivo.

### Metodología

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente.
2. Indicar la colocación del espécimen en la página del protocolo. Es buena práctica del laboratorio funcionar muestras en duplicado.
3. **Determinación cualitativo:** Utilizar solamente el calibrador D.  
**Determinación semi cuantitativo:** Utilizar calibradores A a D según lo representado en la disposición de la muestra abajo.

#### Determinación cualitativo

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

#### Determinación semi cuantitativo

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Preparar una dilución 1:101 de cada muestra a procesar añadiendo 5 µl de muestra a 0.5 ml de tampón de dilución para muestras.
  5. Agregar 100 µl de los controles, de calibradores, de y las muestras pacientes diluidas a los micropocillos apropiados según protocolo cubre.
- Nota:** Incluir un pozo que contenga **100 µl** del tampón de dilución para muestras como espacio en blanco el reactivo. Poner a cero a lector de ELISA contra el espacio en blanco el reactivo.
6. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
  7. Lavado (4x): Aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300µl de solución de lavado a todos pocillos y aspirar. Para el lavado manual, llenar cada micropocillos del almacenador intermediario reconstituido de la colada. Desechar el líquido invirtiendo y golpeando ligeramente fuera del contenido de cada uno el pozo o aspirando el líquido de cada uno bien. Para borrar en el extremo de la colada pasada, de las tiras invertidas y golpear ligeramente los pozos vigoroso en las toallas de papel absorbentes. Para las arandelas automáticas, programar la arandela según las instrucciones del fabricante.
  8. Agregar 100 µl de conjugado en micropocillos.
  9. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
  10. Lavado: Todos los micropocillos como en 7.
  11. Agregar 100 µl de sustrato enzimático en cada micropocillos en la misma orden y la sincronización que para el conjugado.
  12. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
  13. Agregar 100 µl de solución de parada en cada micropocillos usando la misma orden y midiendo el tiempo que para la adición del sustrato enzimático. Leer los valores de la absorbencia en el plazo de 1 hora de agregar solución de parada.
  14. Leer la absorbancia (OD) de cada pocillo a 405nm en un plazo máximo de una hora. Si se desea seguir el método de lectura bicromática puede utilizarse 620 nm como longitud de onda de referencia.

### Control de calidad

Los calibradores, control positivo y control negativo y un espacio en blanco el reactivo se deben funcionar con cada análisis para verificar la integridad y la exactitud de la prueba. La lectura de la absorbencia del espacio en blanco el reactivo debe ser < 0.3. El calibrador A debe tener una lectura de la absorbencia de no menos que 1.0, si no la prueba debe ser repetida. El control negativo debe ser <7 IU/ml. Si la prueba se funciona en duplicado, el medio de las dos lecturas se debe tomar para IU/ml de determinación. Mientras que realiza las determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y de menos que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semi cuantitativas el control positivo debe dar valores en la gama indicada en el frasco.

## RESULTADOS

### Cálculo de Resultados

Las concentraciones de las muestras pacientes se pueden determinar por cualquiera de dos métodos:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

OD Espécimen

OD Calibradore D

$$\frac{\text{OD Espécimen}}{\text{OD Calibradore D}} \times \text{IU/ml de Calibradore D} = \text{IU/ml Espécimen}$$

#### 2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTATIVE

Absorbancia del diagrama de Calibradore A a D contra su concentración respectiva en un papel de gráfico linear-linear. Trazar la concentración en IU/ ml en el X-eje contra la

absorbancia en el Y-eje y dibujar la mejor curva apta. Determinar las concentraciones de las muestras pacientes de la curva contra su valor correspondiente de la absorbancia.

### Calibrador

Los calibradores se incluyen para proporcionar semi - cuantificación y se deben utilizar con cada prueba. Los especímenes pacientes que contienen niveles más altos del anticuerpo pueden dar los valores de la absorbancia mayores que el del Calibrador A. Para que determina valores semi-cuantitativos exactos tales especímenes debe ser diluido más a fondo así que bajan dentro de la gama de la curva del calibrador cuando están reexaminados. Para determinación IU/ ml, multiplicar las unidades obtenidas por el factor de la dilución.

### Interpretación

La información siguiente sirve solamente como guía en la interpretación de los resultados del laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

RF-IgM	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<7 IU/ml	Neg (-)
7-9 IU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>9 IU/ml	Pos (+)

Los valores del atajo para la negativa, el indeterminados y el positivo fueron determinados probando 99 muestras de donantes de sangre sanos. Cuando se obtienen los valores indeterminados, la muestra debe ser reexaminada antes de divulgar los resultados. Si los valores siguen siendo prueba indeterminada, repetida del paciente ser considerado.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El IgM-RF método no se debe realizar encendido hemolizadas grueso, microbioano contaminadas o las muestras lipémicas. Este método se debe utilizar para probar muestras humanas del suero solamente. Los resultados obtenidos sirven solamente como ayuda en la diagnosis y no se deben interpretar como diagnóstico en sí mismos.

### VALORES PREVISTOS

El RF está presente en el 59% de pacientes con la artritis reumatoide<sup>5</sup>. El suero IgM-RF es positivo en el 58% de los pacientes de síndrome de Sjögren <sup>8,9</sup>. Según lo compilado de la literatura citada, la incidencia del RF en artritis reumatoide u otros desórdenes reumático se resume en la tabla 1 en el extremo de este documento:

### CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El IgM-RF método fue comparado con un kit comercialmente disponible de la prueba para la detección del RF en suero humano.

Un total de 87 sueros fue obtenido de un laboratorio clínico de la referencia. Fueron identificados como positivo o negativa para el RF y probados según los procedimientos recomendados por el fabricante. Los resultados se resumen en la tabla 2 en el extremo de este documento.

El Immulisa IgM-RF método demostró una correlación significativa y un acuerdo relativo con otro dispositivo del predicado, con un coeficiente de correlación de 0.8 y una cuesta de 0.95.

### Precisión:

El inter-análisis y el intra-análisis CV del IgM-RF método se extiende a partir de la 5% hasta el 10% dependiendo de los niveles de RF. Usar tres muestras positivas del suero con variar niveles del RF en seis réplicas, los intra e inter valores del CV del análisis son 0.8 a 4.1% y 3.0 a 8.2% respectivamente.



# ImmuLisa™ Rheumafaktor (RF) IgM ELISA

IVD

**REF**    **Code**    1139    96 Determinations

RF IgM ist ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für die semi-quantitative Bestimmung von IgM Antikörper gegen den Rheumafaktor (RF) in Patientenseren.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das Maß von Rf ist in der Diagnose und die Prognose von Rheumatoiden Arthritis wichtig, da hohe Titer von RF in den Seren der Patienten auftreten, die Extra-Gelenkkomplikationen<sup>1,2</sup> entwickeln. Die meisten Routinelaborversuche messen IgM RF durch seine Fähigkeit, die roten Blutzellen der Schafe zu verbinden, Latex oder ähnliche Partikel, die mit IgG<sup>1-4</sup> beschichtet werden.

Rf ist in 70-90% von Patienten mit Rheumatoiden Arthritis anwesend und ist in den Klassifikationskriterien<sup>5</sup> eingeschlossen. Entsprechend den korrigierten ARA Kriterien wenn RF bei Patienten mit Arthritis von drei oder mehr Verbindungen dann positiv ist, hat der Patient Rheumatoiden Arthritis. Arthritis von weniger als drei Verbindungen mit RF Negativ schließt Rheumatoiden Arthritis aus. Solch eine Klassifikation leistet sich Besonderheit 93.5% Empfindlichkeit und 89.3% für Rheumatoiden Arthritis<sup>5</sup>.

RF, wie durch Agglutination ermittelt ist vom IgM isotyp. Andere Methoden wie ELISA haben Besonderheit, Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit Überschußbestehen und routinemäßig verwendete Agglutination Methoden<sup>3,4,6</sup> verbessert. ELISA Methoden können RF der verschiedenen Immunoglobulin isotyps ermitteln. Solch eine Unterscheidung ist nicht mit traditionellen Agglutination Tests möglich.

## TESTPRINZIP

IgG wurde an die Einzelvertiefungen der Polystyrol-Mikrotiterplatte. Der ohne Reaktion Aufstellungsorte werden blockiert, um unspezifische Reaktionen zu verringern. Kontrollen, Kalibratoren und verdünnte Patientenseren werden in verschiedene Einzelvertiefungen pipettiert. Die vorhandenen RF binden an das Antigen. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humane wird in die Einzelvertiefungen pipettiert. Dieses konjugierte Enzym Antikörper binden spezifisch an das menschliche Immunoglobulin der passenden Kategorie. Nachdem in einem weiteren Waschschrift das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein spezifisch Substrat (pNPP) zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Nach Anhalten der enzymatischen Reaktion von farbigen Produkten die Intensität der Farbe Änderung zur Konzentration des Antikörpers ist proportional. Die Ergebnisse werden semi-quantitativ in International-Standardeinheiten/ml (IU/ml, WHO) protokolliert.

## INHALT DER TESTPACKUNG

### Lagerung

Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.

Nicht verwenden, wenn Reagens nicht frei ist.

Wäschepuffer: Destilliertes oder entionisiertes Wasser für 1L Volumen hinzufügen.

Einzelvertiefungen: Nur einmal verwenden.

## Vorsichtsmaßnahmen

Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.

NaN<sub>3</sub> wird als Stabilisator verwendet. NaN<sub>3</sub> ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.

Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.

Gute Labortechniken verwenden, um Mikroben- und chemische Verschmutzung herabzusetzen.

Nicht nach Verfallsdatum verwenden.

## In der Testpackung vorhandenes Material

ImmuLisa™ IgM-RF ELISA **REF** 1139

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 96 Ermittlungen jede durchzuführen.

12 x 8	<b>MICROPLATE RF</b>	Mikroplatte mit 96 Einzelvertiefungen beschichtet mit IgG.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RF-IgM</b> *	Kalibrator A ( <i>grüne Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RF-IgM</b> *	Kalibrator B ( <i>violette Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RF-IgM</b> *	Kalibrator C ( <i>blaue Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D RF-IgM</b> *	Kalibrator D ( <i>gelbe Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RF-IgM</b> *	Positive Kontrolle ( <i>rote Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Negative Kontrolle ( <i>weiße Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 12 ml	<b>IgM-CONJ ALKPHOS</b> * †	Alkalische Phosphatase Konjugat. Farbe kodierter Pink.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gepuffertes Probediluent. Farbe kodiertes Blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Enzym Substrat. Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Stopplösung
2	<b>BUF WASH</b>	Waschpuffer für je 1 Liter

\* enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5 - 1000 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Reader für Mikrotiterplatten mit 405 nm Filter
- Flasche für Wäschepuffer

- Timer
- Saugfähiges Papier

### Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Das wiederholte Einfrieren und das Auftauen vermeiden.

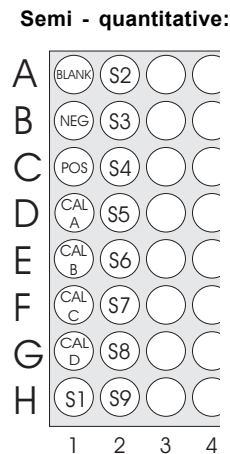
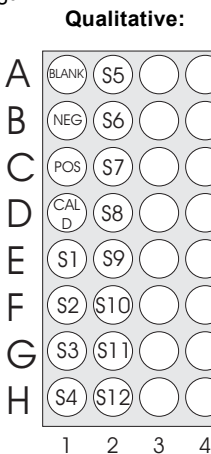
### Methode

#### Testvorbereitung

- Bevor sie begann, las die Probe diese Anweisungen sorgfältig.
- Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) für 30 Minuten. Rückholmaterialien zum Kühlraum sofort nach Gebrauch.
- Alle Verdünnungen der geduligen Probestücke vorbereiten, bevor Sie den Test beginnen.
- **Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
- Waschen: Gute Technik ist kritisch. Eine automatisierte Mikrotiter-ELISA-Platte Unterlegscheibe wird empfohlen.
- Eine Mehrkanalpipette benutzen, die zu 8 Positionen gleichzeitig liefern fähig ist. Dieses beschleunigt den Prozeß und stellt während einer konstanteren Ausbrütungzeit zur Verfügung.
- Zeit sorgfältig überwachen. Ausbrütung- Perioden fangen an, nachdem sie Reagenzien zugeführt haben.

#### Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.**
2. Protokollaufzeichnung benutzen, um Position der Probestücke zu merken. Es ist gutes Laborüblich, Probestücke in doppelter Ausführung zu prüfen.
3. **Qualitative:** nur Kalibrator D verwenden.  
**Semi - quantitative:** Kalibratoren A - D verwenden, wie im Beispiel unten gezeigt.



4. Eine **1:101** Verdünnung des geduligen Probestücks vorbereiten, indem Sie **5 µL** des geduligen Probestücks mit **0.5 ml** von Gepuffertes Probendiluent.

5. 100µL von jedem der Kalibratoren, der verdünnten Patientenproben, der Negative Kontrolle und der Positive Kontrolle in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
- Anmerkung:** Eine Position mit **100 µL** Gepuffertes Probediluent als Reagensfreier Raum einschließen. Der nullwert des Mikrotiter-Platte Lesers sollte mit dieser Position eingestellt werden. Die Absorption dieses Einzelvertiefung sollte nicht als 0.3 grösser sein.
6. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
  7. Waschen: Den Inhalt aller Einzelvertiefungen absaugen. Die Einzelvertiefungen vollständig (200-300 µL) mit Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch dreimal wiederholen (Insgesamt: vier Waschschrift). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Nicht vollständig trocknen.
  8. 100 µL des Konjugates in jede Einzelvertiefung geben.
  9. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
  10. Waschen: Schritt Nr. 7 wiederholen.
  11. 100 µL Enzym Substrat in jede Einzelvertiefung geben.
  12. 30 Minuten bei Raum-temperatur inkubieren.
  13. 100 µL Stopplösung in jede Einzelvertiefung pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des Enzym Substrat einhalten. Die optische Dichte (OD) innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen.
  14. Die optische Dichte (OD) jeder Einzelvertiefung bei 405 nm ablesen mit einem einzelnen oder Doppelwellenlänge Mikrotiter-Platte Leser mit dem Reagensfreier Kavität bei null lesen.

### Qualitätskontrolle

Kalibratoren, Positive Kontrolle und Negative Kontrolle und ein freier Raum müssen mit jeder Probe laufen gelassen werden, um die Vollständigkeit und die Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Absorption Messwert des freien Raumes sollte < 0.3 sein. Kalibrator A sollte ein OD von nicht weniger als 1.0 haben, andernfalls muß der Test wiederholt werden. Die negative Steuerung muß <7 IU/ml sein. Wenn der Test in doppelter Ausführung laufen gelassen wird, sollte das Mittel der zwei Messwerte für feststellen IU/ml genommen werden. Beim Durchführen der qualitative Ermittlungen, muß das OD von Kalibrator D als das der negativen Steuerung und kleiner als das OD der positiven Steuerung grösser sein. Für semiquantitative Ermittlungen muß die positive Steuerung Werte in der Strecke haben, die auf der Phiole gedruckt wird.

## ERGEBNISSE

### Berechnung der Ergebnisse

Die Konzentrationen der geduldigen Proben können durch irgendeine von zwei Methoden festgestellt werden:

#### 1. QUALITATIVE ERMITTLUNG

OD von Probestück

$$\frac{\text{OD von Probestück}}{\text{OD von Kalibrator D}} \times \text{IU/ml von Kalibrator D} = \text{IU/ml von Probestück}$$

#### 2. SEMIQUANTITATIVE ERMITTLUNG

Die optische Dichte von Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf linear-linearen Zeichenpapier mit Maßseinteilung notieren. Die Konzentration IU/ ml auf der X-Mittellinie gegen die Absorption auf der Y-Mittellinie plotten und die beste passende Kurve zeichnen. Die Konzentrationen der geduldigen Proben von der Kurve gegen seinen entsprechenden Absorption Wert feststellen.

## Kalibratoren

Die Kalibratoren sind eingeschlossen, um halb zur Verfügung zu stellen - quantitative Bestimmung und müssen mit jedem Test verwendet werden. Die geduldigen Probestücke, die höhere Antikörperrniveaus enthalten, können die Absorption Werte geben, die grösser sind, als das des Kalibrator A. Das genaue semiquantitative Werte solche Probestücke feststellt, weiter verdünnt werden sollte, also sie innerhalb des Bereiches der Kalibratorkurve fallen, wenn sie erneut getestet werden. Für feststellen IU/ ml, die Maßeinheiten multiplizieren, die mit dem Verdünnungsfaktor erhalten werden.

## Deutung

Die folgenden Informationen dienen nur als Führer in der Deutung der Laborresultate. Jedes Labor muß seine eigenen normalen Werte feststellen.

RF-IgM	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação

<7 IU/ml	Neg (-)
7-9 IU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>9 IU/ml	Pos (+)

Die Abkürzungswerte für Negativ, die unbestimmten und Positiv wurden festgestellt, indem man 99 Proben von den gesunden Blutspenden prüfte. Wenn unbestimmte Werte erhalten werden, sollte die Probe erneut getestet werden, bevor man über die Resultate berichtet. Wenn die Werte unbestimmte, wiederholte Prüfung des Patienten sollen betrachtet werden bleiben.

## BESCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der IgM-RF System sollte nicht an durchgeführt werden grob hämolytische, durch Mikroben verschmutzte oder lipämische Proben. Diese Methode sollte für die Prüfung nur der menschlichen Serumproben verwendet werden. Die erreichten worden Resultate dienen nur als Hilfsmittel in der Diagnose und sollten nicht als Diagnose in selbst gedeutet werden.

## ERWARTETE WERTE

RF ist in 59% von Patienten mit rheumatisch Arthritis <sup>5</sup> anwesend. Serum IgM-RF ist in 58% von Patienten Sjögrens Syndrom <sup>8,9</sup> positiv. Wie von der zitierten Literatur kompiliert, wird die Ausdehnung von RF in der rheumatisch Arthritis oder andere rheumatisch Störungen in Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes zusammengefaßt:

## LEISTUNGSMERKMALE

Der IgM-RF System wurde mit einem im Handel erhältlichen Testinstallationssatz für die Abfragung von RF im menschlichen Serum verglichen.

Eine Gesamtmenge von 87 Seren wurden von einem klinischen Bezugslabor erhalten. Sie wurden als positives oder Negativ für RF gekennzeichnet und wurden entsprechend den Verfahren geprüft, die durch den Hersteller empfohlen wurden. Die Resultate werden in Tabelle 2 am Ende dieses Dokumentes zusammengefaßt.

Der Immulisa IgM-RF System zeigte eine bedeutende Wechselbeziehung und eine relative Vereinbarung mit einer anderen Prädikatvorrichtung, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.8 und einer Steigung von 0.95.

## Präzision:

Die Zwischen-Probe und die Intra-Probe CV des IgM-RF System reicht von 5% bis 10%, abhängig nach den Niveaus von RF. Mit drei positive Serumproben mit dem Verändern der RF Niveaus in sechs Verdoppelungen, sind Intra- und Zwischenprobe Lebenslauf Werte 0.8 bis 4.1% und 3.0 bis 8.2% beziehungsweise.



# ImmuLisa™ Anti-Fattore Reumatoide IgM ELISA

IVD

**REF**      **Code**      1139      96 Determinations

RF IgM è un test immunoenzimatico per la ricerca semi-quantitativa di anticorpi della classe IgM anti-fattore reumatoide (RF) nel siero umano.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La misura della RF è importante nella diagnosi e nella prognosi dell'artrite reumatoide, poiché gli alti titoli della RF si presentano in sieri dei pazienti che sviluppano le complicazioni supplementare-articolari<sup>1,2</sup>. La maggior parte delle prove di laboratorio sistematiche misurano IgM RF dalla relativa capacità di agglutinare le cellule di anima rosse delle pecore, il latte o le particelle simili ricoperti d'IgG<sup>1-4</sup>.

La RF è presente in 70-90% dei pazienti con l'artrite reumatoide ed è inclusa nei test di verifica di classificazione<sup>5</sup>. Secondo i test di verifica modificati di ARA, se la RF è positiva in pazienti con un'artrite di tre o più giunti allora il paziente ha artrite reumatoide. L'artrite di più meno di tre giunti con la negazione di RF esclude l'artrite reumatoide. Una tal classificazione si permette specificità 93.5% la sensibilità e 89.3% per l'artrite reumatoide<sup>5</sup>.

La RF come rilevata dall'agglutinazione è del isotipo di IgM. Altri metodi quale ELISA hanno migliorato la specificità, esistere dell'eccedenza di affidabilità e di sensibilità e metodi ordinariamente usati dell'agglutinazione<sup>3,4,6</sup>. I metodi del ELISA possono rilevare la RF di vari isotipi dell'immunoglobulina. Una tal distinzione non è possibile con le prove di agglutinazione tradizionali.

## PRINCIPIO DELLA METODICA

L'IgG è adsorbito sulla parete dei pozzetti di una piastra microtiter di polistirene. La piastra è ostruita per ridurre le reazioni di non-specifico. I controlli, I calibratori, i sieri diluiti dei pazienti vengono distribuiti nei pozzetti corrispondenti, consentendo agli RF eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito. L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante il lavaggio e successivamente si aggiunge a ciascun pozzetto un anticorpo umano marcato con un enzima. Questo l'enzima ha coniugato gli anticorpi si lega specificamente all'immunoglobulina umana del categoria adatto. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpi umani marcati con l'enzima, il substrato enzimatico specifico (pNPP) allora è aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la produzione enzimatica del prodotto colorato si determina la presenza o l'assenza di RF confrontando la densità ottica del campione con quella di una curva di calibrazione standard a 4 punti. I risultati sono riportati in modo semi-quantitativo in unità internazionale/ml (IU/ml, WHO).

## REAGENTI

### Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

## Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

## Materiali forniti

ImmuLisa™ IgM-RF ELISA      **REF**      1139

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE RF</b>	microstrips da 96 pozzetti individuali con IgG
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RF-IgM</b> *	calibratore A (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RF-IgM</b> *	calibratore B (protezione viola), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RF-IgM</b> *	calibratore C (protezione blu), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D RF-IgM</b> *	calibratore D (protezione gialla), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RF-IgM</b> *	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgM-CONJ ALKPHOS</b> * †	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. <b>Proteggere da luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	soluzione bloccante
2	<b>BUF WASH</b>	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Materiali richiesti ma non forniti

- Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000 µL
- Puntali monouso per micropipette
- Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm
- Bottiglia per tampone di lavaggio

- Temporizzatore
- Carta assorbente

### Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici. Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

### METODICA

#### Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-26°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.
- Preparare tutte le diluizioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essiccante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione del reagentes.

#### Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. **Determinazione qualitativa:** usare soltanto Calibratore D.  
**Determinazione semi-quantitativa:** usare Calibratori A - D come indicato nell'esempio qui sotto.

#### Determinazione qualitativa

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

#### Determinazione semi-quantitativa

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Preparare una diluzione di **1:101** dei campioni mescolando **5 µl** dei campioni con **0.5 ml** di diluente per campioni.
5. Distribuire 100 µL di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo

e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.

- Nota:** Includere una posizione con **100 µl** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione. La capacità di assorbimento di questo pozzetto non dovrebbe essere più grande di 0.3.
6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
  7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire 200-300µL di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
  8. Distribuire 100µL di Coniugato in ciascun pozzetto.
  9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
  10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
  11. Distribuire 100µL di substrato enzimatico in ciascun pozzetto
  12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
  13. Distribuire 100µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
  14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio del piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

### **Controllo di qualità**

I calibratori, controllo positivo e controllo negativo e uno spazio in bianco devono essere fatti funzionare con ogni analisi per verificare l'integrità e l'esattezza della prova. La lettura di capacità di assorbimento dello spazio in bianco dovrebbe essere < 0.3. Il calibratore A dovrebbe avere un OD di 1.0, altrimenti la prova deve essere ripetuta. Il controllo negativo deve essere <7 IU/ml. Se la prova è funzionata due volte, la media delle due letture dovrebbe essere presa per IU/ml di determinazione. Mentre realizza le determinazioni qualitative, il OD di calibratore D deve essere più grande di quello del controllo negativo e di di meno che il OD del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitativa il controllo positivo deve avere valori nella gamma stampata sulla fiala.

## **RISULTATI**

### **Calcolo dei risultati**

Le concentrazioni dei campioni pazienti possono essere determinate da uno di due metodi:

#### **1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA**

**OD di Esempire**

$$\frac{\text{OD di Esempire}}{\text{OD di Calibratore D}} \times \text{IU/ml de Calibratore D} = \text{IU/ml di Esempire}$$

#### **2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA**

Capacità di assorbimento del diagramma di calibratores da A a D contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare la concentrazione IU/ ml sull'X-asse contro la capacità di assorbimento sull'Y-asse e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni pazienti dalla curva contro il relativo valore corrispondente di capacità di assorbanza.

### **Calibratore**

I calibratori sono inclusi per fornire semi - la quantificazione e devono essere usati con ogni prova. Gli esemplari pazienti che contengono i livelli elevati dell'anticorpo possono dare i

valori di capacità di assorbanza più grandi di quello del calibratore A. Per che determina i valori semiquantitativi esatti tali esemplari dovrebbe più ulteriormente essere diluito in modo da fanno parte della gamma della curva del calibratore una volta riprovati. Per determinazione IU/ ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### **Interpretazione**

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

RF-IgM	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<7 IU/ml	Neg (-)
7-9 IU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>9 IU/ml	Pos (+)

I valori di taglio per la negazione, l'indeterminati ed il positivo sono stati determinati esaminando 99 campioni dai donatori di anima in buona salute. Quando i valori indeterminati sono ottenuti, il campione dovrebbe essere riprovato prima della segnalazione dei risultati. Se i valori rimangono prova indeterminata e ripetuta del paziente devono essere considerati.

### **LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

La IgM-RF sistema non dovrebbe essere effettuata sopra grossolanamente emolizzati, campioni da microbi contaminati o lipemici. Questo metodo dovrebbe essere usato per la prova dei campioni umani del siero soltanto. I risultati ottenuti servono soltanto da sussidio nella diagnosi e non dovrebbero essere interpretati come diagnostico in se stesso.

### **VALORI PREVISTI**

La RF è presente in 59% dei pazienti con l'artrite reumatoide <sup>5</sup>. Il siero IgM-RF è positivo in 58% dei pazienti di sindrome dello Sjögren <sup>8,9</sup>. Come compilato dalla letteratura citata, l'incidenza della RF nell'artrite reumatoide o altri disordini reumatico è ricapitolata in tabella 1 all'estremità di questo documento:

### **CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI**

La IgM-RF sistema è stata paragonata ad un corredo disponibile in commercio della prova per la rilevazione della RF in siero umano.

Un totale di 87 sieri è stato ottenuto da un laboratorio clinico di riferimento. Sono stati identificati come positivo o negazione per la RF e sono stati esaminati secondo le procedure suggerite dal fornitore. I risultati sono ricapitolati in tabella 2 all'estremità di questo documento. Il ImmuLISA IgM-RF sistema ha mostrato una correlazione significativa e un accordo relativo con un altro dispositivo di attributo, con un coefficiente di correlazione di 0.8 e un pendio di 0.95.

### **Precisione:**

L'inter-analisi e l'intra-analisi CV della IgM-RF sistema varia da 5% a 10% dipendendo dai livelli della RF. Con tre campioni positivi del siero con la variazione dei livelli di RF in sei repliche, gli intra e valori inter del cv di analisi sono rispettivamente 0.8 - 4.1% e 3.0 - 8.2%.



# ImmuLisa™ Fator Rheumatoid (RF) IgM ELISA

IVD

**REF**      **Code**      1139      96 Determinations

RF IgM ELISA é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de Fator Rheumatoid IgM no soro humano.

## SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

A medida do RF é importante no diagnóstico e o diagnóstico do artrite reumatoid, porque os títulos elevados do RF ocorrem nos soro dos pacientes que desenvolvem as complicações extra-articular <sup>1,2</sup>. A maioria de testes de laboratório rotineiros medem IgM RF por sua habilidade de aglutinar as pilhas de sangue vermelhas dos carneiros, o latex ou as partículas similares revestidos com o IgG <sup>1,4</sup>.

O RF está atual em 70-90% dos pacientes com artrite reumatoid e é incluído nos critérios da classificação <sup>5</sup>. De acordo com os critérios revisados de ARA, se o RF for positivo nos pacientes com artrite de três ou mais junções então o paciente está com o artrite reumatoid. O artrite de menos de três junções com negativo do RF exclui o artrite reumatoid. Tal classificação tem recursos para o especificação 93.5% a sensibilidade e 89.3% para o artrite reumatoid <sup>5</sup>.

O RF como detectado pelo aglutinação é do isotipo de IgM. Outros métodos tais como ELISA melhoraram o especificação, existir do excesso da sensibilidade e da confiabilidade e os métodos rotineiramente usados do aglutinação <sup>3,4,6</sup>. Os métodos de ELISA podem detectar o RF de vários isotipos do imunoglobulin. Tal distinção não é possível com testes de aglutinação tradicionais.

## PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os poços da microplaca de poliestireno, encontram-se revestidos com IgG. A placa é obstruída para reduzir o emperramento não é específica. Os controles, calibradores e as amostras diluídas são pipetados nos diferentes poços, permitindo que os RF presentes se liguem ao antígeno imobilizado. Depois de proceder à lavagem dos poços, para retirar a amostra não ligada, adiciona-se o conjugado anti humano marcado. Estes anticorpos ligam especificamente ao imunoglobulin humano da classe apropriada. Depois da segunda lavagem, para retirar o excesso de conjugado, adiciona-se o substrato (pNPP) que provoca uma alteração da cor na presença do Conjugado. Após adição da solução de paragem a presença ou ausência de RF é determinada por comparação da densidade óptica da amostra com a densidade óptica dos 4 pontos da curva de calibração. Os resultados são apresentados semi-quantitativamente em unidades internacionais/ml (IU/ml, WHO).

## COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO

### Precauções particulares de conservação

Conservar todos os reagentes a 2-8° C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.

Não usar se o reagente não estiver desobstruído.

Tampão de lavagem: Adicionar a água destilada ou deionizada para o volume do 1L.

Micropoços: Usar uma vez somente.

## Precauções

Todo o material de origem humana, utilizado na preparação dos controlos para este produto foi testado e deu resultados negativos para testes aprovados pela FDA em relação a anticorpos anti HBs Ag, HIV e HCV. Contudo nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência destes anticorpos ou outros agentes infecciosos. Assim os controlos e calibradores devem ser manipulados como material potencialmente infectante.

A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é considerado venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. Pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão ao deitarmos fora os restos de reagentes devemos deixar correr água em quantidade suficiente para evitar a formação destas substâncias.

A Substituição de componentes do dispositivo pode originar resultados inconsistentes.

Usar técnicas de laboratório boas minimizar a contaminação microbiana e química.

Não usar após a data de expiração.

## Material fornecido

ImmuLisa™ IgM-RF ELISA **REF** 1139

Os jogos contêm reagents suficientes para executar 96 determinações cada uma.

12 x 8	<b>MICROPLATE RF</b>	96 micropoços partilhados, IgG
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RF-IgM</b> *	calibrador A ( <i>tampão verde</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RF-IgM</b> *	calibrador B ( <i>tampão violeta</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RF-IgM</b> *	calibrador C ( <i>tampão azul</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D RF-IgM</b> *	calibrador D ( <i>tampão amarelo</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RF-IgM</b> *	controle positivo ( <i>tampão vermelho</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	controle negativo ( <i>tampão branco</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 12 ml	<b>IgM-CONJ ALKPHOS</b> * †	conjugado fos. alc. Cor-de-rosa codificada cor.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluinte de amostras. Azul codificado cor.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzime. Contem pNPP. <b>Proteger da luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	solução de parada
2	<b>BUF WASH</b>	tampão de lavagem do 1 litro/viale

\* Contem < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Material necessário não fornecido com o kit

- Micropipetas de 5 - 1000 µl
- Pontas descartáveis para as micropipetas
- Tubos para diluições de 4 ml de volume
- Água destilada ou desionizada
- Fotometro para leitura de microplaca, com filtro de 405 nm
- Frasco para tampão de lavagem
- Temporizador
- Papel absorvente

## Colheita da Amostra

Este procedimento deve ser efectuado com soro. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras hemolizadas ou lipémicas devem ser evitadas.

Armazenar as amostras á temperatura ambiente apenas durante 8 horas. Se o teste não for efectuado em 8 horas, guardar as amostras a 2-8°C. Se o teste não for efectuado em 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20°C ou a temperatura inferior. Evitar congelar-se e aquecer-se repetidos.

## MÉTODO

### Antes de Iniciar

- Antes de começar o teste leu estas instruções com cuidado.
- Todos os componentes devem encontrar-se á temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos antes de usar. Materiais do retorno ao refrigerador imediatamente depois do uso.
- Preparar todas as diluições dos espécimes pacientes antes de começar o teste.
- **Guardar imediatamente as restantes estripes na saqueta e selar convenientemente para minimizar a exposição ao vapor de água.**
- Lavagem: A técnica boa é crítica. Uma arruela automatizada do microplaca é recomendada.
- Usar uma pipeta capaz de entregar 8 posições simultaneamente. Isto apressa o processo e fornece-o por um tempo mais uniforme.
- O sincronismo cuidadoso é importante. Os períodos das incubações começam após ter dispensado líquidos.

### Técnica

1. **ANTES DE INICIAR TODOS OS COMPONENTES DEVEM ENCONTRAR-SE Á TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C).**
2. Usar o registro do protocolo anotar a posição dos espécimes no microplaca. É prática boa do laboratório testar espécimes na duplicata.
3. **Determinação qualitativa:** usar somente Calibrador D.  
**Determinação semi-quantitativa:** usar Calibradores A - D como mostrado no exemplo abaixo.

**Determinação qualitativa:      Determinação semi-quantitativa:**

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Preparar uma diluição de **1:101** do espécime paciente misturando **5 µl** do espécime paciente com **0.5 ml** de diluente de amostras.
5. Pipetar 100 µl de cada um dos calibradores, das amostras diluidas, do controlo negativo e do controlo positivo para os poços.

**Nota:** Incluir uma posição com **100 µl** do diluente de amostras como um espaço em branco.

O valor zero do leitor do microplaca deve ser ajustado usando esta posição. A absorvância deste micropoço não deve ser mais grande de 0.3.

6. Incubar durante 30 minutos á temperatura ambiente.
7. Lavagem: Aspirar os pocitos. Adicionar 200-300 ul de tampão e aspirar novamente. Repetir esta sequencia mais 3 vezes num total de 4 lavagens. Após a ultima lavagem, inverter a placa em papel absorvente para retirar todo o liquido residual. Não secar micropoços completamente.
8. Pipetar 100 µl do conjugado em cada pocito.
9. Incubar os poços durante 30 minutos á temperatura ambiente.
10. Lavagem:Repetir o ponto 7.
11. Dispensar 100 µl do substrato enzime em cada pocito.
12. Incubar durante 30 min, e á temperatura ambiente.
13. Adicionar 100 µl de solução de parada em cada pocito. Manter a mesma sequência para a adição da solução de parada, conforme a sequência anteriormente utilizada para a adição do substrato enzime. Ler a densidade optica (DO) no espaço de 1 hora após para a reacção.
14. Ler a densidade optica (DO) a 405 nm no espaço usando um único ou leitor duplo do microplaca de encontro ao jogo em branco do reagente no absorvância zero.

### **Controle De Qualidade**

Os calibradores, controle positivo e controle negativo e um espaço em branco devem ser funcionados com cada test para verificar a integridade e a exatidão do teste. A leitura do OD do espaço em branco deve ser < 0.3. O calibrador A deve ter um OD não mais menos de de 1.0, se não o teste deve ser repetido. O controle negativo deve ser <7 IU/ml. Se o teste for funcionado na duplicata, o meio das duas leituras deve ser feito exame para IU/ml determinando. Ao executar determinações de qualitativa, o OD de calibradore D deve ser mais grande do que aquele do controle negativo e de menos do que o OD do controle positivo. Para determinações semi-quantitativa o controle positivo deve ter valores na escala impressa no tubo.

## **RESULTADOS**

### **Cálculo dos resultados**

As concentrações das amostras pacientes podem ser determinadas por qualquer um de dois métodos:

#### **1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA**

**DO Espécime**

$$\frac{\text{DO Espécime}}{\text{DO Calibradore D}} \times \text{IU/ml Calibradore D} = \text{IU/ml Espécime}$$

#### **2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA**

A absorvância do lote de Calibradore A a D de encontro a sua concentração respectiva em um papel de gráfico linear-linear. Traçar a concentração IU/ ml na X-linha central de encontro ao absorvância na Y-linha central e extrair a mais melhor curva apta. Determinar as concentrações das amostras pacientes da curva de calibradores a seu valor correspondente do absorvância.

### **Calibrador**

Os calibradores são incluídos para fornecer semi -quantitativa e devem ser usados com cada teste. Os espécimes pacientes que contêm uns níveis mais elevados do anticorpos

podem dar os valores de absorvância mais grandes do que aquele do Calibrador A. Para que determina valores semi-quantitativa exatos tais espécimes deve mais ser diluído assim que caem dentro da escala da curva do calibrador quando reexaminados. Para determinando IU/ ml, multiplicar as unidades obtidas pelo fator da diluição.

### Interpretação

A seguinte informação serve somente como uma guia na interpretação dos resultados do laboratório. Cada laboratório deve determinar seus próprios valores normais.

RF-IgM	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação

<7 IU/ml	Neg (-)
7-9 IU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>9 IU/ml	Pos (+)

Os valores da interrupção para o negativo, o indeterminados e o positivo foram determinados testando 99 amostras dos doadores de sangue saudáveis. Quando os valores indeterminados são obtidos, a amostra deve ser reexaminada antes de relatar os resultados. Se os valores remanescerem testar indeterminado, repetido do paciente ser considerado.

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O IgM-RF sistema não deve ser executado sobre hemolizadas bruta, amostras microbial contaminadas ou lipêmicas. Este método deve ser usado testando amostras humanas do soro somente. Os resultados obtidos servem somente como um dae (dispositivo automático de entrada) no diagnóstico e não devem ser interpretados como o uso diagnóstico.

### VALORES PREVISTOS

O RF está atual em 59% dos pacientes com artrite reumatoid<sup>5</sup>. O soro IgM-RF é positivo em 58% dos pacientes de síndrome de Sjögren<sup>8,9</sup>. Como compilados da literatura, a incidência do RF no artrite reumatoid ou outros doenças reumático são sumariados na tabela 1 na extremidade deste original:

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O IgM-RF sistema foi comparado com um jogo comercialmente disponível do teste para a detecção do RF no soro humano.

Um total de 87 soro foi obtido de um laboratório clínico da referência. Foram identificados como positivo ou o negativo para o RF e testados de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. Os resultados são sumariados na tabela 2 na extremidade deste original.

O Immulisa IgM-RF sistema mostrou uma correlação significativa e um acordo relativo com um outro dispositivo do predicado, com um coeficiente de correlação de 0.8 e uma inclinação de 0.95.

### Precisão:

O inter-assay e o intra-assay CV do IgM-RF sistema variam de 5% a 10% dependendo em cima dos níveis de RF. Com três amostras positivas do soro com variar níveis do RF em seis replicata, os valores intra- e inter- assay CV são 0.8 a 4.1% e 3.0 a 8.2% respectivamente.

## REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Jonnson Thorbjorn, Valdimarsson H. Is measurement of rheumatoid factor isotypesclinically useful? Ann Rheum Dis 52: 161-164, 1993.
2. van Zeven D, Hazes JMW, Zwinderman AH, Cats A, Van der Voort EAM, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in earlyrheumatoid arthritis: results of a follow up study. Ann Rheum Dis 51:1029-1035, 1992.
3. Shmerling RH, Delbanco TL. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. Am J Med 91:528-534, 1991.
4. Wolfe F, Cathey MA, Roberts FK. The latex test revisited-rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. Arthr Rheum 34:951-960, 1991.
5. Bampton JLM, Cawston TE, Kyle MV, Hazelman BL. Measurement of rheumatoid factors by enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) and comparison with other methods. Ann Rheum Dis 44: 13-19, 1985.
6. Markusse HM, Otten HG, Vroom TM, Smeets TJM, Fokkens N, Breedveld FC. Rheumatoid factor isotypes in serum and salivary fluid of patients with primary Sjögren's Syndrome. Ciin Immun Immunopath 66:26-32, 1993.
7. Atkinson JC, Travis WD, Slocum L, Ebbs WL, Fox P. Serum anti-SS-B/La and IgA rheumatoid factor are markers of salivary gland disease activity in primary Sjögren's syndrome. Arth Rheum 35:1368-1372, 1992.
8. Anderson LG, Talal N. The spectrum of benign to malignant lymphoproliferation in Sjögren's Syndrome. Clin Exp Immunol 10:199-221, 1972.
9. Saulsbury FT. Heavy and light chain composition of serum IgA and IgA rheumatoid factor in Henoch-Schönlein purpura Arthr Rheum 35:1377-1380, 1992.
10. Saulsbury FT. IgA rheumatoid factor in Henoch Schönlein purpura. J Pediatr 108:71-76, 1986.
11. Arnett FC. Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Bull Rheum Dis 38(5):1-6, 1989.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No[CDC] 93-8395), 1993.

**Table 1. Incidence of RF in Patients with Rheumatic Diseases**

Rheumatoid Arthritis	70-90%
Sjögren's Syndrome	58%
Systemic lupus erythematosus	18%
Dermatomyositis	16%
Mixed connective tissue disease	13%
Cranial arteritis	10%
Polymyalgia rheumatica	10%
Polyarthritis	7%
Scleroderma	6%
Juvenile rheumatoid arthritis	6%

**Table 2. Comparison of Immulisa™ RF-IgM to another ELISA**

		IMMCO RF-IgM		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
<b>Other/Autre/Otro</b>	POS (+)	45	1	46
<b>Andere/Altro/Otra</b>	NEG (-)	2	39	41
<b>ELISA</b>	TOT (=)	47	40	87

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 97%

relative sensitivity/sensibilitè relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 98%

relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 95%

*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](mailto: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](http://www.emergogroup.com)

REV.DEC2003

Document No. PI4139