



ELISA ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Microwell Method

Rheumatoid Factor IgG

Cat. No. R97423

Pro in vitro diagnostické použití

P ř í b a l o v ý l e t á k

ELISA souprava pro kvantitativní stanovení IgG
revmatoidního faktoru v lidském séru nebo plazmě



Microwell Method - 96 jamek
(12 x 8-jamek potažených antigenem)
Odlamovací

ZÁKLADNÍ INFORMACE

- Vlnová délka**
Základní filtr: 450 nm
Volitelný referenční filtr: 600 - 650 nm
- Inkubační čas**
60 minut při laboratorní teplotě (30/15/15)
- Enzyme Conjugate**
HRP (křenová peroxidáza)
- Substrate**
TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)
- Vzorek**
Sérum nebo plazma
- Stabilita vzorků**
neředěné: 5 dní při 2-8°C; až 6 měsíců při - 20 °C
- Kalibrační rozmezí**
0 - 500 U/ml
- Senzitivita**
1.0 U/ml
- Doba použitelnosti a stabilita komponent**
Souprava: 18 měsíců od data výroby
Komponenty: viz datum sxspirace na štítku
Ředící pufr: 30 dní po naředění
Promývací pufr: 30 dní po naředění

SLOŽENÍ SOUPRAVY

Microwell plate Mikrotitrační destička	12 8 jamkové stripy s odlamovacími jamkami potaženými Fc fragmenty lidských IgG protilátek k přímému použití
Positive Control Pozitivní kontrola	1 lahvička, 1,5 ml, (červené víčko) , obsahující revmatoidní faktor v séropufrovém matrixu (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%) k přímému použití . Hodnota a rozmezí jsou uvedeny v Certifikátu kvality
Negative Control Negativní kontrola	1 lahvička, 1,5 ml, (modré víčko) , obsahující revmatoidní faktor v séropufrovém matrixu (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%) k přímému použití . Hodnota a rozmezí jsou uvedeny v Certifikátu kvality
Calibrators Kalibrátory	5 lahviček, každá 1,5 ml, obsahující revmatoidní faktor v séropufrovém matrixu (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%) k přímému použití . 0, 15; 50; 150 and 500 U/ml
Enzyme Conjugate Enzym konjugát	1 lahvička, 15ml, obsahuje anti-h IgA protilátky, značené HRP, PBS, BSA, detergent, konzervans ProClin 0.05%, barevně odlišeno - růžová, k přímému použití
Substrate Solution Substrát	1 lahvička, 15ml, obsahuje 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin, k přímému použití .
Stop Solution Stopovací roztok	1 lahvička, 15ml, obsahuje kyselinu, k přímému použití
Sample Diluent Ředící roztok	1 lahvička, 20 ml, obsahuje PBS, BSA, detergent, konzervans azid sodný 0.09%, koncentrát (5x) , barevně odlišeno žlutá
Wash Buffer Promývací roztok	1 lahvička, 20 ml, obsahuje Tris, konzervans azid sodný 0.09%, koncentrát (50x) .

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL

- Reader mikrotitračních destiček sachoný měřit endpoint při 450 nm, volitelně, referenční filtr 620 nm
- Software na zpracování dat
- Multikanálový dispensor nebo opakovací pipeta na 100 µl
- Třepačka
- Pipety 10 µl, 100 µl a 1000 µl
- Laboratorní stopky
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Odměrné válce na 1000 ml a 100 ml
- plastová nádoba na uchovávání promývacího roztoku

Reader a Promývačku Vám v Dialabu nabídneme.

SUMMARY AND EXPLANATION

Revmatoidní faktor (RF) je druh protilátky, která je produkována imunitním systémem a namířena proti vlastním imunoglobulinům (protilátkám), zvláště proti IgG. Onemocnění, při kterých je činnost imunitního systému zaměřena proti vlastním tkáním a orgánům, se nazývají autoimunitní. RF je produkován hlavně lymfatickou tkání v zánětem postiženém kloubu, dále v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině a podkožních revmatických uzlících (zatvrdlé bouličky pod kůží, zejména na horních končetinách, vyskytující se u revmatoidní artritidy).

Zvýšené hladiny RF v krvi zjišťujeme především u revmatoidní artritidy (autoimunitní zánět kloubů), jiných systémových autoimunitních onemocnění a u dlouhodobých jaterních onemocnění. V nižších hladinách se RF může vyskytovat u přetrvávajících infekcí a nádorových onemocnění.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Mikrotitrační destička je potažena vysoce purifikovanými Fc fragmenty lidského imunoglobulinu. Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu v těchto krocích: protilátky, pokud jsou ve vzorku přítomné, se navážou na antigen na povrchu jamky a vytvoří komplex protilátka-antigen. Po inkubaci se promytím odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Přidaný enzymový konjugát se naváže na imobilizovaný komplex. Promytím se po inkubaci odstraní nenavázaný konjugát. Po přidání chromogenního substrátu dojde k hydrolýze a vzniku zbarvení. Přidáním kyseliny se reakce zastaví, vytvoří se žlutý finální produkt. Intenzita zbarvení, která je přímo úměrná koncentraci komplexu protilátka-antigen, se odečte při 450 nm.

VZOREK – ODBĚR, SKLADOVÁNÍ, MANIPULACE

- K odběru vzorku plné krve používejte stanové postupy tak, abyste zabránili hemolýze.
- Obvyklým způsobem připravte sérum nebo plazmu
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay

- Vzorčky pro stanovení se mohou uchovávat při 2 – 8 °C po dobu maximálně 5 dní, po zamražení v -20°C až po dobu 6 měsíců.
- Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně. Může to ovlivnit aktivitu protilátek.
- Nedoporučujeme testování tepelně inaktivovaného séra.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Reagencie skladujte při 2 – 8 °C ve tmě.
- Během skladování reagencie nevystavujte reagencie horku, slunečnímu záření nebo intenzivnímu světlu.
- Mikrotitrační destičky skladujte hermeticky uzavřené v originálním obalu.
- Neotevřená souprava je stabilní po celou dobu použitelnosti (18 měsíců). Viz etikety.
- Jednou naředěné pufrý jsou stabilní, pokud jsou skladovány při teplotě 2 – 8 °C, po dobu 30 dní.
- Nejlepší je spotřebovat je ten samý den.

UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ

- Tento test je určen pro použití in-vitro
- Složky obsahující lidské sérum byly testovány a shledány negativní na HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 pomocí postupů schválených FDA. Žádná zkouška není schopna zaručit nepřítomnost viru a proto je se složkami soupravy nutno zacházet jako s látkami potencionálně infekčními.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) byla otestována a shledána negativní na BSE.
- Vyvarujte se styku TMB s pokožkou. Pokud dojde k potřísnění, omyjte důkladně vodou a mýdlem.
- Vyvarujte se styku Stopovacího roztoku s pokožkou. Pokud dojde k potřísnění, omyjte důkladně vodou a mýdlem.
- Některé složky soupravy obsahují azid sodný jako konzervační látku (ředící a promývací pufr, kontroly). Azid sodný je v čisté formě vysoce toxický a reaktivní. Přestože je jeho koncentrace v soupravě pod hranicí nebezpečnosti, doporučujeme dodržovat zásady SLP.
- Některé složky soupravy obsahují jako konzervační činidlo Proclin 300, v bezpečné koncentraci. Při likvidaci složek naředte odpad dostatečným množstvím vody.

Při manipulaci s reagensy a vzorky dodržujte pravidla SLP:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned opláchněte vodou a mýdlem. Sejměte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím vyčistěte. Při vniknutí do očí důkladně oplachujte pod tekoucí vodou minimálně 10 minut. Podle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Ochranné pomůcky a nouzové postupy: Dodržujte směrnice pro bezpečnou práci v laboratoři. Zabraňte potřísnění nebo vniknutí reagensů do očí. Nepipetujte ústy. V laboratoři nejezte, nepijte, nekuřte a nenanášejte make-up. Při vylití nasajte inertním materiálem a zlikvidujte v souladu s předpisy.
- Expoziční limity, ochrana osob: Při práci používejte ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přírodního latexu. Používejte ochranné brýle. Při manipulaci podle zamýšleného účelu použití nejsou známy nebezpečné účinky.
- Situace, kterým je třeba předcházet: Substrát je citlivý na světlo, skladujte na tmavém místě.
- Při likvidaci laboratorního odpadu dodržujte platné předpisy.

Dodržujte pravidla pro používání kontrolních sér při kontrole kvality ve zdravotnických laboratořích.

POZNÁMKY

- Nepoužívejte reagentie po uplynutí doby použitelnosti.
- Nepoužívejte reagentie ze souprav různých šarží.
- Před zahájením testu vytemperujte všechny reagentie na laboratorní teplotu (18-28°C).
- Před zahájením testu si připravte všechny reagentie a vzorky. Po zahájení musíte provést celý test bez přerušení.
- Doporučujeme pipetovat kontroly i vzorky v dubletu. Projeví se tak lépe případná chyba v pipetování.
- Všechny kroky testu provádějte ve stanoveném pořadí.
- Používejte vždy čerstvě naředěné vzorky.
- Reagentie a vzorky pipetujte na dno jamek.
- Pokaždé používejte čistou špičku, předejdete tak křížové kontaminaci.
- Uvědomte si, že promývání je kritickým krokem testu, na jehož precizním provedení závisí reprodukovatelnost výsledku.
- Dodržujte časování mezi jednotlivými kroky.
- Nepoužívejte mikrotitrační destičku opakovaně.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací roztok

Koncentrát naředte (50x) na celkový objem 1000 ml destilovanou nebo deionizovanou vodou.

Ředící roztok

Koncentrát naředte (5x) na celkový objem 100 ml destilovanou nebo deionizovanou vodou.

Příprava vzorků

Naředte vzorky pacientů 1:100 v připraveném ředícím roztoku: 990 µl předředěného pufru + 10 µl vzorku. Promíchejte.

Kalibrátory a kontroly jsou určeny k přímému použití, neředí se.

POSTUP

Připravte si dostačující množství jamek.

1. Napipetujte 100 µl kalibrátorů, kontrol a předředěných vzorků do příslušných jamek (v dubletu).
Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě (20-28 °C).
Obsah jamek vylijte a 3 x vypláchněte 300 µl promývacího roztoku.
2. Do každé jamky napipetujte 100 µl konjugátu a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě.
Obsah jamek vylijte a 3 x vypláchněte 300 µl promývacího roztoku.
3. Do každé jamky napipetujte 100 µl substrátu a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě.
4. Reakci ukončete přidáním 100 µl stopovacího roztoku. Dbejte na to, abyste roztok přidávali ve stejném pořadí jako substrát. Absorbanci odečtete po cca 5 minutách při 450/600–690 nm. Neodečítejte po více než 30 minutách.

Příklad pipetovacího schématu:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P2										
B	B	P3										
C	C											
D	D											
E	E											
F	C+											
G	C-											
H	P1											

P1...vzorky pacientů, A-F...Kalibrátory, C+, C-...Kontroly

VALIDITA

Test je validní, pokud OD při 450 nm pro kontroly a kalibrátory odpovídá rozsahům uvedeným v Certifikátu, který přiložen u každé soupravy. Pokud tomu tak není, je třeba test opakovat.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Kvantitativní výsledky: vynesete absorbance jednotlivých kalibrátorů proti jejich koncentraci a proložíte kalibrační křivku. Interpolací z křivky odečtete hodnotu vzorků pacientů. Při použití softwaru doporučujeme 4-parametrovou křivku a lin-log souřadnice.

HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI

Očekávané hodnoty

Ve studii se zdravými dárci byla stanovena cut-off 20 U/ml.

Interpretace výsledků

Negativní: < 20 U/mL

Pozitivní: ≥ 20 U/mL

Linearita

Vzorky pacientů s vysokou hladinou protilátky byly sériově zředěny a testovány. Koncentrace byly odečteny z kalibrační křivky. Aktivita pro každou diluci byla odečtena ze 4-parametrové křivky v lin-log souřadnicích.

Vzorek	Ředění	Zjištěno U/mL	Očekáváno U/mL	O/E [%]
1	1:100	652.3	560.3	116
	1:200	293.9	280.2	105
	1:400	142.7	140.1	102
	1:800	64.4	70.0	92
	1:1600	36.3	35.0	104
	1:3200	15.7	17.5	90
2	1:100	490.2	452.7	108
	1:200	214.5	226.4	95
	1:400	108.9	113.2	96

	1:800	53.3	56.6	94
	1:1600	26.1	28.3	92
	1:3200	14.2	14.1	101
3	1:100	269.0	260.5	103
	1:200	123.4	130.3	95
	1:400	58.9	65.1	90
	1:800	27.4	32.6	84
	1:1600	15.7	16.3	96
	1:3200	7.1	8.1	88

Reprodukovatelnost

Intra-assay přesnost: Variační koeficient (CV) byl pro každý ze tří vzorků vypočítán z 24 stanovení v jednom cyklu. Výsledky jsou uvedeny níže.

Inter-assay přesnost: Variační koeficient (CV) byl pro každý ze tří vzorků vypočítán z výsledků 6 stanovení v pěti jednotlivých cyklech. Výsledky jsou uvedeny níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr U/mL	CV %
1	22.8	5.5
2	65.3	7.4
3	160.7	6.9

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr U/mL	CV %
1	27.1	6.5
2	54.0	7.2
3	136.8	7.8

Interference

Nebyla pozorována interference se séry, která byla hemolytická (do 1000 mg/dl), lipemická (do 33,9 mmol/l triglyceridů) nebo s obsahem bilirubinu až do 684 µmol/l. Nebyly pozorovány interference s antikoagulačními činidly (EDTA, heparin, citrát). Přesto doporučujeme vysoce hemolyzované nebo lipemické vzorky netestovat.

Výsledky studie

Populace	n	n pos	%
Revmatoidní nemoci	302	252	83.4
Normální lidská séra	169	16	9.5

Klinická diagnóza

	Pos	Neg	
Pos	252	16	
Neg	50	153	
	302	169	471

Sensitivita	83.4 %
Specificita	90.5 %
Overall agreement	86.0 %

OMEZENÍ TESTU

Test je diagnostickou pomůckou. Klinická diagnóza nemůže být stanovena pouze na základě výsledků tohoto testu, ale musí vycházet z celkového klinického obrazu a výsledků dalších testů. Každá laboratoř si podle ISO15189 nebo jiné vhodné metodiky musí stanovit vlastní rozmezí normálních a abnormálních hodnot.

LITERATURA

1. Arinbjarnarson S., Jonsson T., Steinsson K. et al. IgA rheumatoid factor correlates with changes in B and T lymphocyte subsets and disease manifestations in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1997; 24: 269-274.
2. Borretzen M., Mellbye O. J., Thompson K. M., Natvig J. B. Rheumatoid Factors. In: Peter J. B., Shoenfeld Y. eds. *Autoantibodies*. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1996: 706-715.
3. Brown P. B., Nardella F. A., Mannik M. Human complement activation by self-associated IgG rheumatoid factors. *Arthritis Rheum.* 1982; 25: 1101-1107.
4. Ernst E., Espersen G. T., Andersen M. V., Grunnet N. RF-classes (IgM, IgG, IgA) in a group of highly active RA patients in relation to disease activity and treatment. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 1988; 75: 250-255.
5. Espersen G. T., Ernst E., Vestergaard M., Grunnet N. ELISA estimations of rheumatoid factor IgM, IgA, and IgG in sera from RA patients with high disease activity. DTT treatment studies. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 1988; 75: 40-45.
6. Houssien D. A., Jonsson T., Davies E., Scott D. L. Clinical significance of IgA rheumatoid factor subclasses in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1997; 24: 2119-2122.
7. Jonsson T., Arinbjarnarson S., Thorsteinsson J. et al. Raised IgA rheumatoid factor (RF) but not IgM RF or IgG RF is associated with extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 1995; 24: 372-375.
8. Kleveland G., Egeland T., Lea T. Quantitation of rheumatoid factors (RF) of IgM, IgA and IgG isotypes by a simple and sensitive ELISA. Discrimination between false and true IgG-RF. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 1988; 75: 15-24.
9. Mogk M., Weise I., Welcker M., Oppermann M., Helmke K. Bedeutung der Rheumafaktor Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM in der Diagnostik rheumatologischer und immunologischer Erkrankungen. *Clin. Lab.* 1995; 41: 885-891.
10. Paimela L., Palosuo T., Leirisalo-Repo M., Helve T., Aho K. Prognostic value of quantitative measurement of rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1995; 34: 1146-1150.
11. Pope R. M. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and early recognition. *Am. J. Med.* 1996; 100: 3S-9S.
12. Scutellari P. N., Orzincolo C. Rheumatoid arthritis: sequences. *Eur. J. Radiol.* 1998; 27 Suppl. 1: S31-S38.
13. Swedler W., Wallman J., Froelich C. J., Teodorescu M. Routine measurement of IgM, IgG, and IgA rheumatoid factors: high sensitivity, specificity, and predictive value for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1997; 24: 1037-1044.
14. Winska W. H., Thompson K., Young A., Corbett M., Shipley M., Hay F. IgA and IgM rheumatoid factors as markers of later erosive changes in rheumatoid arthritis (RA). *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 1988; 75: 238-243.

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Österreich, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at