



**ELISA** ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

**Microwell Method**

# **Rheumatoid Factor IgM**

**Cat. No. R97424**

*Pro in vitro diagnostické použití*

P ř í b a l o v ý l e t á k

ELISA souprava pro kvantitativní stanovení IgM  
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

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

## 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 použijte 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 nařeďte 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 přerušování.
- 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	482.7	431.7	112
	1:200	218.0	215.9	101
	1:400	108.0	107.9	100
	1:800	54.5	54.0	101
	1:1600	26.7	27.0	99
	1:3200	13.4	13.5	99
2	1:100	549.3	502.7	109
	1:200	245.4	251.4	98
	1:400	125.2	125.7	100

	1:800	61.1	62.8	97
	1:1600	32.4	31.4	103
	1:3200	15.6	15.7	99
3	1:100	220.5	221.5	100
	1:200	110.4	110.7	100
	1:400	55.6	55.4	100
	1:800	27.3	27.7	99
	1:1600	13.9	13.8	101
	1:3200	6.7	6.9	97

### 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	17.1	4.3
2	59.7	4.6
3	148.0	4.3

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr U/mL	CV %
1	24.5	8.2
2	59.4	5.9
3	123.0	8.1

### 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	276	91.4
Normální lidská séra	169	11	6.5

### Klinická diagnóza

	Pos	Neg	
Pos	276	11	
Neg	26	158	
	302	169	471

Sensitivita	91.4 %
Specificita	93.5 %
Overall agreement	92.1 %



## 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