

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0
Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58
Internet: www.orgentec.com

Návod k použití
2012-08



ORG 522S Rheumatoid Factor Screen

KRÁTKÝ POPIS

Rheumatoid Factor Screen je testovací systém ELISA pro kvantitativní měření IgG, IgM, IgA třídy revmatoidní faktor (RF) ve vzorcích lidského séra nebo plasmy. Tento produkt je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro	MICROPLATE	Mikrotitrační
Výrobce		CALIBRATOR A	Kalibrátor
REF	Katalogové číslo	CALIBRATOR B	Kalibrátor
96	Dostačuje pro	CALIBRATOR C	Kalibrátor
LOT	Kód šarže	CALIBRATOR D	Kalibrátor
Spotřebujte do		CALIBRATOR E	Kalibrátor
Teplotní omezení		CONTROL +	Kontrola pozitivní
Viz návod k použití		CONTROL -	Kontrola negativní
Chraňte před slunečním světlem		DILUENT	Vzorkový pufr
Pro jednorázové použití		CONJUGATE GAM	Enzymový konjugát
Datum výroby		TMB	TMB substrátový roztok
		STOP	Ukončovací roztok
		WASH	Promývací pufr
		RTU	Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Mikrotitrační destičky jsou potaženy čistěným Fc fragmenty vysoce purifikovaného lidského imunoglobulinu G. Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se naváží na antigen nanesený na povrch reakčních jamek a vytvoří komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidaný enzymatický konjugát se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolyze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Přidávek kyseliny zastaví reakci, které tvoří žlutý finální produkt. Intenzita žlutého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 450 nm.

OBSAH SOUPRAVY

ORG 522S	96	Dostačuje pro 96 stanovení
MICROPLATE	1	Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití. Kód produktu na mikrotitrační: RF
CALIBRATOR A	1x 1.5 ml	Kalibrátor A 0 U/ml, obsahující séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR B	1x 1.5 ml	Kalibrátor B 15 U/ml, obsahující rheumatoid factor v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR C	1x 1.5 ml	Kalibrátor C 50 U/ml, obsahující rheumatoid factor v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR D	1x 1.5 ml	Kalibrátor D 150 U/ml, obsahující rheumatoid factor v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR E	1x 1.5 ml	Kalibrátor E 500 U/ml, obsahující rheumatoid factor v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
CONTROL +	1x 1.5 ml	Kontrola pozitivní, obsahující rheumatoid factor v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
CONTROL -	1x 1.5 ml	Kontrola negativní, obsahující rheumatoid factor v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
DILUENT	15 ml	Vzorkový pufr P; žlutá; obsahuje PBS, BSA, saponáty, ochranný prostředek azid sodný 0.09%, 5x koncentrát.
CONJUGATE GAM	15 ml	Enzymový konjugát; světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, IgA, IgM, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek PROCLIN 0,05%
TMB	15 ml	TMB substrátový roztok; 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidin. Připraveno k použití.
STOP	15 ml	Ukončovací roztok; obsahuje kyselinu. Připraveno k použití.
WASH	20 ml	Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát.
i	1	Návod k použití: ELISA Mini-CD
i	1	Certifikát analýzy

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Reader – čtečka mikrotitračních desek schopná koncových měření při 450 nm; volitelně 620 nm referenční vlnové délky
- software pro redukci dat
- vícekanálový dávkovač nebo pipeta pro opakované dávkování o obsahu 100 µl
- mixér Vortex
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- laboratorní stopky
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 100 ml
- plastová nádoba pro skladování promývacího roztoku

Automatizace

Orgentec ELISA sety lze použít na otevřených automatických procesorů ELISA. Každý test musí být validní na příslušném automatizovaném systému. Informace jsou k dispozici na vyžádání.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Krevní vzorky odebírat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat sražit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolitičkových, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 - 8 °C chlazené vzorky séra a plazmy mohou být skladovány až 5 dní. Je-li plánováno delší skladování, měly by být vzorky rozděleny na alikvotní části a při -20 °C hluboce zmrazeny.
- Vyhnout se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést k variabilní ztrátě aktivity autoprotlátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte mikrotitrační hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené soupravy je 18 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální šarží.
- Rozředěný mycí roztok a vzorkový pufr jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Doporučujeme spotřebovat stejný den.

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Složky soupravy nepoužívejte po uplynutí doby trvanlivosti.
- Nezaměňujte jednotlivé součásti souprav z různých šarží a produkty.
- Všechny složky musejí mít pokojovou teplotu (20 – 28 °C).
- Připravte si všechny složky a vzorky. Jakmile test začne, je nutné provést celý bez přerušení.
- Dvojité kontroly mohou být provedeny. Tímto způsobem chyby pipetování mohou být více zřejmé.
- Provádějte jednotlivé kroky testu výhradně v určeném pořadí.
- Vždy používejte čerstvě naředěné vzorky.
- Pipetujte veškeré složky a vzorky na dna jamek.
- Aby nedocházelo ke kontaminaci, vyměňujte špičku mezi jednotlivými vzorky a kontrolami soupravy.
- Dosažení nejlepších výsledků je podmíněno důkladným vymytím titračních jamek a důkladným odstraněním promývacího pufru.
- Všechny kroky inkubace musejí být přesně časovány.
- Mikrotitrační destičku nepoužívejte opakovaně.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Komponenty obsahující lidské sérum byly otestovány a nebyly nalezeny HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 dle schválených metod FDA. Žádný test nemůže zaručit absenci HBsAg, HCV, HIV1 nebo HIV2 a je tedy nutno s každým lidským sérem, obsahujícím látky testu, manipulovat jako s infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhněte se kontaktu se substrátem TMB (3,3',5,5'-tetrametyl benzidín).
- Ukončovací roztok obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchněte důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně opláchněte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze: Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políty materiál řádně zlikvidujte.
- Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přirozeného latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.

- Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Skladujte na tmavém místě.
 - Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.
- Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami séry.

Příprava Složek

WASH

Naředte obsah Promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l).

DILUENT

Vzorkový pufr P: Před použitím, naředte obsah (20 ml) lahvičky koncentrovaného vzorkového pufru 5x destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 100 ml.

Příprava Složek

Před použitím naředěňte vzorků od pacientů 1:100 se vzorku pufru:

Přidejte 990 µl předdefinovaného vzorkového pufru ve zkumavce a přidejte 10 µl vzorku.

Dobře promíchejte. Kontrolní vzorky a kalibrátory jsou připraveny k použití a není třeba je ředit.

PŘÍPRAVA SLOŽEK

Připravte si dostatečný počet mikrotitračních modulů pro všechny kontrolních vzorky a ředěné vzorky.

1. Napipetujte do jamek po 100 µl kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a ředěných vzorků pacientů. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20 – 28 °C).
Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
2. Do každé jamky přidejte 100 µl enzymového konjugátu. Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
3. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku TMB substrátu. Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
4. Do každé jamky přidejte 100 µl ukončovacího roztoku. Inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
Odečtete optickou densitu při vlnové délce 450 nm (referenční 600–690 nm) a vypočtete výsledky. Vzniklá barva je stabilní minimálně po dobu 30 minut. Během této doby odečtete optickou densitu.

Příklad pro pipetovací schéma:

	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 A-E Kalibrátor C+, C- Kontrola

VALIDACE

Tento test je platný, pouze pokud optická densita při vlnové délce 450 nm pro kalibrátory / kontroly a výsledky kontrol odpovídá příslušným rozsahům hodnot uvedených v osvědčení o analýze přiloženém u každé testovací soupravy. Pokud kterékoli z těchto kritérií není splněno, jsou výsledky neplatné a test je nutno opakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro kvantitativní výsledky proložte optickou hustotu každého kalibrátoru versus kalibrační koncentrace a vytvořte kalibrační křivku. Koncentrace neznámých sér lze pak odhadnout interpolací kalibrační křivky.

Software pro zpracování dat se 4-parametrovou křivkou padnou a lin-log souřadnice optické density a koncentrace je nejlepší metoda.

CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

KALIBRACE

Tento analyzační systém je zkaližován v relativních smluvených jednotkách. Kalibrace se vztahuje k mezinárodně uznávané "1st British Standard Preparation 64/2 Rheumatoid Factor".

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy ELISA je 0 - 500 U/ml

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků sér dárců zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomoci analýzy ELISA: Cut-off 25 U/ml

Interpretace výsledků

negativní < 25 U/ml
pozitivní ≥ 25 U/ml

Linearita

Vzorky pacientů obsahující vysokou hladinu určité protilátky byly sériově zředěny ve vzorkovém roztoku pro ukázkou dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity. Aktivita pro každý roztok byla spočítána z kalibrační křivky pomocí 4-Fit s parametrem-lin-log souřadnicích.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná U/ml	Očekávaná U/ml	P/O [%]
1	1:100	496.7	453.2	110
.	1:200	136.2	136.0	100
.	1:400	66.4	68.0	98
.	1:800	35.1	34.0	103
.	1:1600	16.8	17.0	99
.	1:3200	7.7	8.5	91
2	1:100	262.4	268.1	98
.	1:200	138.0	134.0	103
.	1:400	64.5	67.0	96
.	1:800	32.7	33.5	98
.	1:1600	15.5	16.8	92
.	1:3200	7.6	8.4	90
3	1:100	497.6	441.1	113
.	1:200	221.6	220.6	100
.	1:400	111.3	110.3	101
.	1:800	56.2	55.1	102
.	1:1600	25.1	27.6	91
.	1:3200	13.6	13.8	99

Limit detekce

Funkční citlivost 1 U/ml

Technické údaje

Intraanalizační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 náleží v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalizační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 náleží při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	23.8	3.4
2	89.5	5.5
3	317.0	7.2

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	26.1	5.9
2	92.2	5.5
3	321.0	8.0

Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dl), lipemická (až do 3g/dl triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dl). Taktéž nebyly pozorovány žádné efekty interference s použitím antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

Výsledky studie

Study population	n	n Pos	%
Rheumatoid Arthritis	300	288	96.0
Normal human sera	169	19	11.2

		Klinická diagnóza		
		Pos	Neg	
ORG 522S	Pos	288	19	
	Neg	12	150	
		300	169	469
senitivita		96.0 %		
specifita		88.8 %		
diagnostická efektivita		93.4 %		

HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měly by být hodnoceny lékařem po všech klinických a laboratorních testech a porovnány s celkovým klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.

Výše patologické a normální referenční rozmezí pro protilátek u vzorků pacientů je třeba považovat za doporučení pouze. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí podle normy ISO 15189 nebo jiné použitelné laboratorní pokyny.

REFERENCE

- 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.
- 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.
- Brown P. B., Nardella F. A., Mannik M. Human complement activation by self-associated IgG rheumatoid factors. Arthritis Rheum. 1982; 25: 1101-1107.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jonsson T., Arinbjarnarson S., Thorsteinnsson 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.
- 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

9. Mogk M., Weise I., Welcker M., Oppermann M., Helmke K. Bedeutung der Rheu-mafaktor-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.

