



Facteur rhumatoïde IgM ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 37978 Facteur rhumatoïde IgM ELISA 96 Tests

Menarini™ facteur rhumatoïde IgM est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la quantification du facteur rhumatoïde (RF) isotype IgM dans le sérum humain.

GENERALITES

La mesure du RF est importante pour le diagnostic et les pronostics de l'arthrite rhumatoïde, vu que l'on retrouve des titres élevés de RF dans les sérum de patients qui tendent à développer des complications extra-articulaires^{1,2}. La majorité des tests de routine en laboratoire mesurent le RF IgM de par sa capacité à s'agglutiner aux globules rouges de mouton, au latex ou à d'autres particules similaires recouvertes d'IgG¹⁻⁴.

Le RF est présent chez 70 à 90 % des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et est inclus dans les critères de classification⁵. D'après les nouveaux critères ARA, si le RF est positif chez des patients souffrant d'arthrite dans plus de trois articulations, le patient souffre d'arthrite rhumatoïde. De l'arthrite dans moins de 3 articulations, associée à un RF négatif exclus l'arthrite rhumatoïde. Une telle classification offre 93.5% de sensibilité et 89.3% de spécificité pour l'arthrite rhumatoïde⁵.

Le RF détecté par agglutinement est de l'isotype IgM. D'autres méthodes telles l'ELISA ont démontré leur spécificité, sensibilité et précision par rapport à d'autres méthodes de routine telles l'agglutinement^{3,4,6}. Les méthodes ELISA peuvent détecter le RF de différents isotypes d'immunoglobulines. Ceci n'est pas possible par les méthodes traditionnelles par agglutinement.

PRINCIPES DE LA METHODE

Les RF sont fixés sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont immédiatement bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque RF présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique d'immunoglobulines humaines est alors ajouté dans chaque puit. 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 par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (IU/ml, WHO).

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser. Le tampon salin reconstitué est stable jusqu'à la date de péremption du kit lorsqu'il est conservé entre 2 et 8°C. Reconstituer le tampon salin avec 1 litre d'eau distillée ou déionisée. Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

Précautions

Pour diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁷.



ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

Matériel fourni

Menarini™ Facteur rhumatoïde IgM ELISA **REF** 37978

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	MICROPLATE RF	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène IgG de lapin.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A RF-IgM *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B RF-IgM *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C RF-IgM *	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D RF-IgM *	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CONTROL + RF-IgM *	Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protéger de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient < 0.1% NaN_3

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant



-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Timer
- Papier absorbant
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

METHODE**Préparation du test**

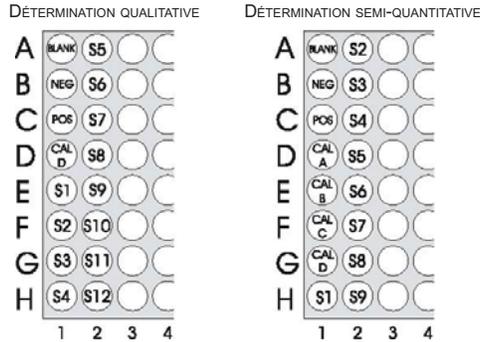
- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité.**
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.

MODE OPERATOIRE**Exécution du test**

1. **PORTER TOUS LES RÉACTIFS ET ÉCHANTILLONS À TEMPÉRATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT DE COMMENCER LE TEST.**



- Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
- Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D.
ou Détermination semi-quantitative : employer les étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



- Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
- Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.
Note : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle. L'absorbance de ce puit devrait être inférieure à 0.3.
- Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
- Lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter 200 à 300µl de tampon **reconstitué** dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne pas assécher complètement les puits.
- Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puit.
- Laisser incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
- Ajouter 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puit.
- Laisser incuber pendant **30 minute** (± 5 min) à température ambiante.
- Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puit. 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.
- Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à **405nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double 405/630 nm en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

CONTROLE QUALITE

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon A doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 7 IU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps RF. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs dans les fourchettes figurant sur le flacon.



RESULTATS

Calcul des résultats

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

1. DETERMINATION QUALITATIVE

D.O. Echantillon

$$\text{-----} \times \text{IU/ml étalon D} = \text{IU/ml Echantillon}$$

D.O. Etalon D

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des étalons A à D par rapport leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en IU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche. Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance.

Etalons

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les retester jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en IU / ml, multiplier 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.

Valeurs RF-IgM	Interprétation
7 IU/ml<	Négatif (-)
7-9 IU/ml	Indéterminé
>9 IU/ml	Positif (+)

Les valeurs limites pour les résultats négatif, indéterminé ou positif ont été déterminés en testant 99 échantillons de donneurs en bonne santé. Lorsque l'on obtient un résultat indéterminé, l'échantillon doit être retesté avant d'enregistrer le résultat. Si la valeur demeure indéterminée, un nouveau test patient devra être considéré.

LIMITES D'UTILISATION

Il est recommandé de ne pas réaliser le test Menarini™ RF-IgM avec des échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Le test doit être réalisé sur des sérums humains uniquement. Les résultats obtenus servent comme aide au diagnostic et ne doivent pas être considérés comme un diagnostic en eux-mêmes.

VALEURS PREVUES

Le RF est présent chez 59% des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ⁵. Les sérums RF-IgM sont positifs chez 58% des patients souffrant du Syndrome de Sjögren ⁶⁻⁸. L'incidence du RF dans les cas d'arthrite rhumatoïde et d'autres désordres rhumatologiques, tels qu'extrait de la littérature, est présentée dans le tableau 1 à la fin de ce document.

PERFORMANCES

Le test de détection du RF-IgM a été comparé à d'autres tests de détection du RF dans le sérum humain actuellement commercialisés.



Un total de 87 sérums ont été fournis par un laboratoire clinique de référence. Ils ont été reconnus positifs et négatifs au RF et ont été testés selon les procédures recommandées par le fabricant. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 à la fin de ce document.

Le test Menarini™ RF-IgM a démontré une corrélation significative et une concordance relative avec un autre test de prédiction, avec un coefficient de corrélation de 0.8 et une pente de 0.95.

Précision

Le coefficient de variation inter et intra-test du système de test RF-IgM varie de 5 à 10% suivant la concentration de l'anticorps. En utilisant trois sérums positifs de niveaux de RF différents à six reprises, le CV intra et inter-test est respectivement de 0.8 à 4.1% et 3.0 à 8.2%.



REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Jonnson Thorbjorn, Valdimarsson H. Is measurement of rheumatoid factor isotypesclinically useful? Ann Rheum Dis 52: 161164, 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. Clin 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 10:199221, 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 Menarini™ RF-IgM to another ELISA

		Menarini™ RF-IgM		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other ELISA	POS (+)	45	1	46
	NEG (-)	2	39	41
	TOT (=)	47	40	87

relative specificity: 97%
relative sensitivity: 98%
relative agreement: 95%



A. Menarini Diagnostics S.r.l.
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

UK

UNITED KINGDOM

Distributed by
A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argyroupolis
Attiki

ES

ESPAÑA

Distribuido por
A. Menarini Diagnostics
S.A.
Avenida del Maresme, 120
08918 Badalona
Barcelona

DE

DEUTSCHLAND

Vertrieb durch
A. Menarini Diagnostics
Eine Division der Berlin-
Chemie AG
Glienicke Weg 125
12489 Berlin

AT

ÖSTERREICH

Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

FR

FRANCE

Distribué par
A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

BE

BELGIQUE

Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

IT

ITALIA

Distribuito da
A. Menarini Diagnostics
Via lungo l'Ema, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

PT

PORTUGAL

Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND

Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

EN > Revision date: April 2011
EL > Ημερομηνία αναθεώρησης: Απρίλιος 2011
ES > Fecha de revisión: Abril de 2011
DE > Datum der Überarbeitung: April 2011
FR > Date de révision: Avril 2011
IT > Data di revisione: Aprile 2011
PT > Data de revisão: Abril de 2011

Document No. PI4139 M

