



Facteur rhumatoïde (RF) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38063 Facteur rhumatoïde Screen ELISA 96 Tests

Menarini™ facteur rhumatoïde est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la quantification du facteur rhumatoïde (RF) d'isotype IgA/IgG/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 sérums 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. D'autre part, des études récentes ont montré que le RF et d'autres isotypes d'immunoglobulines sont également présents en cas d'arthrite rhumatoïde et d'autres désordres rhumatismaux⁵⁻¹⁰.

Le RF est présent chez 70 à 90 % des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et est inclus dans les critères de classification¹¹. 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 exclut l'arthrite rhumatoïde. Une telle classification offre 93.5% de sensibilité et 89.3% de spécificité pour l'arthrite rhumatoïde¹¹.

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'agglutinement³⁻⁵. Les méthodes ELISA décrites ici peuvent détecter des RF de différents isotypes d'immunoglobulines.

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/ml (EU/ml).

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

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'usage⁷.



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'expiration.

Matériel fourni

Menarini™ Facteur rhumatoïde Screen ELISA **REF** 38063

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	RF *	Etalon (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CONTROL	+ RF *	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	IgA/G/M-CONJ	ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
2 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
IVD	Pour usage diagnostique In vitro
	Fabricant
	Nombre de tests

**Matériel nécessaire mais non fourni**

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

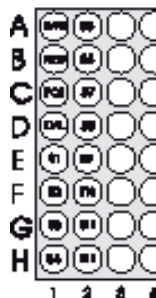
METHODE**Préparation du test**

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante pendant 30 minutes avant de les utiliser. Remplacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage à l'aide d'une large bouteille sur toute la superficie de la micro-lamelle. **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.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence.
- Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité. Remplacer immédiatement les lamelles au réfrigérateur.

Exécution du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante.
2. 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.
3. Préparer une dilution de **1:201** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **1.0 ml** de diluant pour échantillons. **Bien mélanger.**

Layout échantillon



4. Prendre les micropuits nécessaires, remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient scellé et le replacer au réfrigérateur. Placer les micropuits en sécurité sur le support fourni.
5. Ajouter **100 µl** de l'étalon, 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 ne devrait pas être supérieure à 0.3.
6. Laisser incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante.
7. Laver **4 x** avec le tampon de lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter le 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. En cas d'utilisation de bacs de lavage automatiques, programmer l'appareil comme indiqué sur la notice d'utilisation.
8. Ajouter **100 µl** de conjugué dans chaque puit.
9. Laisser incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante.
10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Ajouter **100 µl** de substrat enzymatique dans chaque puit dans le même ordre et le même timing que le conjugué.
12. Laisser incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante.
13. 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.
14. 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 doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps RF.

RESULTATS

Calcul des résultats

La méthode quantitative doit être suivie pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif :



1. DETERMINATION QUALITATIVE

D.O. Echantillon

----- X EU/ml étalon = EU/ml Echantillon

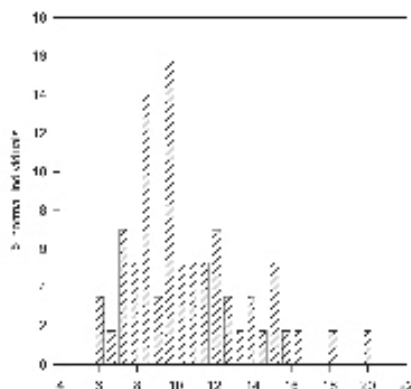
D.O. Etalon

Interprétation

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

Valeurs RF	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif (-)
>20 EU/ml	Positif (+)

Fréquence de distribution de RF dans le sang de donneurs avec le test ELISA Menarini™ RF



LIMITES D'UTILISATION

Il est recommandé de ne pas réaliser le test Menarini™ RF avec des échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Le test doit être réalisé sur des sérums humains uniquement.

VALEURS PREVUES

Le RF est présent chez 70 à 90% des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ¹¹, 74% à 86% des patients souffrant du Syndrome de Sjögren ⁶⁻⁸, et dans 50% des patients atteints de purpura Hennoch Schönlein. Dans le tableau ci-dessous se retrouvent les incidences de RF dans les cas d'arthrite rhumatoïde et d'autres désordres rhumatologiques, tels qu'extraits de la littérature:

Incidence de RF chez les patients présentant des désordres rhumatologiques

Arthrite rhumatoïde	70-90%
Syndrome de Sjörgen	58%
Lupus érythémateux systémique	18%
Dermatomyosite	16%
Diverses maladies du tissu conjonctif	13%
Artérite crânienne	10%
Pseudo polyarthrite rhumatoïde	10%
Polyarthrite	7%
Sclérodémie	6%
Arthrite rhumatoïde juvénile	6%


Précision :

Deux sérums positifs à la recherche RF ont été testés avec le test Menarini™ RF pour déterminer la variabilité inter et intra-test. Les résultats sont les suivants :

	CV Inter-test (%)	CV Intra-test (%)
Echantillon 1	5,06	4,7
Echantillon 2	8,35	4,4

Récupération :

Des échantillons présentant des concentrations connues en RF ont été mélangés à des dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec une quantité connue de RF. Les niveaux de RF du mélange ont été déterminés et le pourcentage de récupération a été calculé à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	RF conc. ajoutée (EU/ml)	RF conc. obtenue (EU/ml)	% récupération
Echantillon 1	88,5	95	107
Echantillon 2	34	32	93,2
Echantillon 3	11,1	12	108

Les résultats obtenus avec le test Menarini™ RF ont aussi été comparés aux différentes méthodes de test Menarini™ RF d'isotypes séparés. Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau ci-dessous et montrent un haut degré de corrélation :

		Menarini™ RF Screen		
		Positif	Négatif	Total
Menarini™ RF Isotypes individuels	Positif	33	3	36
	Négatif	0	73	73
	Total	33	76	109

Concordance : 97%

Sensibilité : 92%

Spécificité : 100%

PROCÉDURE MENARINI™ EN BREF
PRÉPARER LES DILUTIONS DES ÉCHANTILLONS

PIPETER 100 ML D'ÉCHANTILLONS, D'ÉTALONS ET DE CONTRÔLES DANS LES MICROPUITS

INCUBER 30 MINUTES À TEMPÉRATURE AMBIANTE

LAVER 4X LA MICRO-LAMELLE

PIPETER 100 ML DE CONJUGUÉ DANS LES MICROPUITS

INCUBER 30 MINUTES À TEMPÉRATURE AMBIANTE

LAVER 4X LA MICRO-LAMELLE

PIPETER 100 ML DE SUBSTRAT DANS LES MICROPUITS

INCUBER 30 MINUTES À TEMPÉRATURE AMBIANTE

PIPETER 100 ML DE SOLUTION D'ARRÊT DANS LES MICROPUITS

LIRE L'ABSORBANCE À 405 NM

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Jonnson T, Valdimarsson H. Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? *Ann Rheum Dis.* 1993; 52: 161-164.
2. van Zeben D, Hazes JMW, Zwinderman AH et al. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis.* 1992; 51:1029-1035.
3. Shmerling RH, Delbanco TL. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am J Med.* 1991; 91:528-534.
4. Wolfe F, Cathey MA, Roberts FK. The latex test revisited-rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. *Arthr Rheum.* 1999; 34:951-960.
5. Bampton JLM, Cawston TE, Kyle MV, Hazelman BL. Measurement of rheumatoid factors by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and comparison with other methods. *Ann Rheum Dis.* 1985; 44:13.
6. Markusse HM, Otten HG, Vroom TM et al. Rheumatoid factor isotypes in serum and salivary fluid of patients with primary Sjögren's Syndrome. *Clin Immun Immunopath.* 1993; 66:26-32.
7. Atkinson JC, Travis WD, Slocum L et al. Serum anti-SS-B/La and IgA rheumatoid factor are markers of salivary gland disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arth Rheum.* 1992; 35:1368-1372.
8. Anderson LG, Talal N. The spectrum of benign to malignant lymphoproliferation in Sjögren's Syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1972; 10:199-221.
9. Saulsbury FT. Heavy and light chain composition of serum IgA and IgA rheumatoid factor in Henoch-Schönlein purpura. *Arthr Rheum.* 1992; 35:1377-1380.
10. Saulsbury FT. IgA rheumatoid factor in Henoch Schönlein purpura. *J Pediatr.* 1986; 108:71-76.
11. Arnett FC. Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis.* 1989; 38(5):1-6.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. 1993; (HHS Pub No[CDC] 93-8395).



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 Argypopolis
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. PI4139S CE M

