



Facteur rhumatoïde (RF) IgG ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38065 Facteur rhumatoïde IgG ELISA 96 Tests

Menarini™ facteur rhumatoïde IgG est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la quantification du facteur rhumatoïde (RF) isotype IgG dans le sérum humain de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde.

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. D'autre part, des études récentes ont montré que le RF et d'autres isotypes d'immunoglobulines sont également présents en cas d'arthrite rhumatoïde⁵⁻⁸.

Le RF est présent chez 70 à 90 % des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et est inclus dans les critères de classification⁹. 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 rhumatoïde⁹.

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 peuvent détecter le RF de différents isotypes d'immunoglobulines. Ceci n'est pas possible par les méthodes traditionnelles par agglutinement. Des niveaux significatifs d'un isotype de RF trouvé couramment en cas de maladies rhumatismales associés à des augmentations des autres isotypes représente quasi un diagnostic d'arthrite rhumatoïde⁷. Une combinaison de RF IgM, IgG et IgA positifs a une valeur prédictive de 96% comparé aux 62% des RF IgM seuls⁸.

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.

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'usage¹⁰.

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 IgG ELISA **REF** 38065

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-IgG *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B	RF-IgG *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C	RF-IgG *	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D	RF-IgG *	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps RF.
1 x 1,5 ml	CONTROL +	RF-IgG *	Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps RF IgG.
1 x 1,5 ml	CONTROL -	*	Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-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:

-  Numéro de lot
-  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

- 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

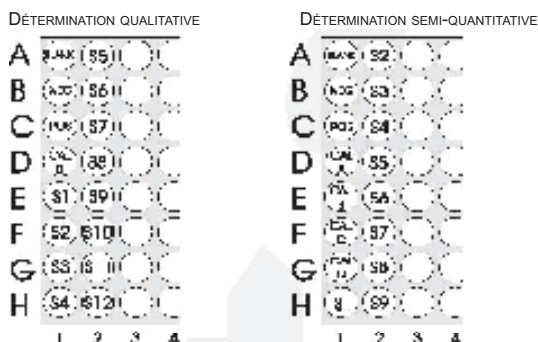
- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- 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. Replacer immédiatement les lamelles au réfrigérateur.



MODE OPERATOIRE

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. **Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D (*couvercle jaune*).
ou Détermination semi-quantitative : employer les étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+/- 5 minutes) à température ambiante.
8. 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.
9. Ajouter **100 µl** de conjugué dans chaque puit.
10. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+/- 5 minutes) à température ambiante.
11. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 8.
12. Ajouter **100 µl** de substrat enzymatique dans chaque puit dans le même ordre et le même timing que le conjugué.
13. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+/- 5 minutes) à température ambiante.
14. 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.
15. 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.



Contrôle qualité

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 0.5. 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 20 EU/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

----- X EU/ml étalon D = EU/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 EU / 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.

Étalons

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 EU / 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 définir ses propres valeurs de référence.

Valeurs RF-IgG	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif (-)
20 – 25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif (+)

LIMITES D'UTILISATION

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

VALEURS PREVUES

Les tests ELISA sont reconnus comme beaucoup plus sensibles que les tests conventionnels par agglutinement. Environ 90% des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ont un taux élevé de RF avec la méthode ELISA comparé à 70% par test d'agglutinement^{7,8}. La plupart des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde présentent une augmentation de 2 ou plus isotypes de RF par rapport au cas d'autres désordres rhumatismaux tels que le lupus érythémateux endémique. De plus, ces patients présentent des niveaux de RF plus élevés que dans le cas d'autres conditions rhumatismales. Le tableau ci-dessous montre l'incidence des différents isotypes de RF:


Incidence des différents isotypes de RF dans différents désordres du tissu conjonctif

	IgM	IgG	IgA	IgM/IgG/IgA
Arthrite rhumatoïde	91	54	80*	53
Maladie de tissu conjonctif	29	7	58	4
Diverses maladies de tissu conjonctif	28	3	14	1
Normal	5	2	2	0

* Niveaux élevés de RF en comparaison à d'autres désordres

Valeur de diagnostic de différentes valeurs de RF

Isotype RF	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Valeur prédictive (%)
IgM	91	76	62
IgG	55	95	87
IgA	80	80	77
IgM/IgG/IgA	53	99	96
Agglutinement latex	83	46	57

Précision

	CV Inter-test (%)	CV Intra-test (%)
	IgG	IgG
Echantillon 1	4,1	5,2
Echantillon 2	5,7	6,5

Récupération :

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

	RF-IgG Ab.conc. ajoutée (EU/ml)	RF-IgG Ab.conc. obtenue (EU/ml)	% récupération
Echantillon 1	87	92	106
Echantillon 2	72	69	96
Echantillon 3	44	43	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 Thorbjorn, Valdimarsson H. Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? Ann Rheum Dis 52: 161-164, 1993.
2. van Zeben D, Hazes JMW, Zwinderman AH, Cats A, Van der Voort EAM, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid 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 immunosorbent 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. Jónsson P. Studies on the clinical significance of rheumatoid factor isotypes. Thesis University of Iceland, Reykjavik Iceland, 1993.
8. Swedler W, Wallman J, Froelich CJ and Teodorescu. Routine measurement of IgM, IgG and IgA rheumatoid factors; high sensitivity, specificity and predictive value for rheumatoid arthritis. J Rheumatol 24:1037-1044, 1997.
9. Arnett FC. Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Bull Rheum Dis 38(5):1-6, 1989.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No[CDC] 93-8395),1993.



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 Argynopolis
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. PI4139G CE M

