

ELI.H.A RF

Kwantitatieve bepaling van de reumatoïde serumfactor door indirecte hemagglutinatie

220 testen
(Ref. 04115)

8000180-DU-2011-11

Alleen voor diagnostisch gebruik *in vitro*, alleen voor professioneel gebruik.
Tests voor eenmalig gebruik.



1 - DOEL

ELI.H.A RF maakt de kwantitatieve bepaling mogelijk van reumatoïde serumfactor van het type IgM (4, 5) door indirecte hemagglutinatie (10, 11). Met de kit kunnen 220 testen of 20 reacties van 11 verdunningen worden uitgevoerd.

2 - INLEIDING

De reumatoïde factor is een biologische marker van groot diagnostisch belang in het verloop van volwassen reumatoïde polyarthritis (5).

3 - PRINCIPE

ELI.H.A RF is gebaseerd op de specifieke hemaggluterende eigenschappen van de reumatoïde factor, gebruikt in de reacties van het type Waaler-Rose (1, 2, 8). Het reagens R1 bestaat uit rode bloedcellen van schapen, gesensibiliseerd door een gammaglobulinefractie van een konijnenserum anti-rode bloedcellen van schapen. De aanwezigheid van de reumatoïde serumfactor veroorzaakt hemagglutinatie van het reagens R1 wat resulteert in een rood/bruine sluis die de cupula bedekt. Bij gebrek aan de reumatoïde factor bezinken deze rode bloedcellen op de bodem van de cupula in de vorm van een punctiforme knop.

Het reagens R2, bestaande uit een suspensie van niet-gesensibiliseerde rode bloedcellen van schapen, garandeert de specificiteit van de reactie en elimineert interferentie door natuurlijke antischaapagglutinininen (heteroantilichamen van Frossman, antilichamen van infectieuze mononucleose en andere macroglobulinen).

De reactie vindt plaats in een V-vormige microtiterplaat.

De hantering is snel en eenvoudig. Resultaten worden verkregen in 2 uur.

4 - REAGENTIA EN MATERIAAL

Beschrijving	Aantal
R1 : flacon van 4,4 mL van het indicatieve reagens	1
R2 : flacon van 1 mL van controle reagens	1
BUF: flacon van 55 mL fosfaatbuffer pH 7,2	1
R3 : flacon van 2 mL adsorbens	1
CONTROL +: flacon van 0,5 mL van getitreeerde positieve controle	1
CONTROL -: flacon van 0,5 mL van negatieve controle.	1
MICROPLATE: V-vormige microtiterplaat	3
DROPPER: speciale druppelaar	2

5 - VOORZORGEN BIJ GEBRUIK

- Reagentia zijn alleen bedoeld voor *in-vitro*-diagnose en dienen door geautoriseerd personeel te worden gehanteerd.
- De testen zijn voor eenmalig gebruik.
- Alle reagentia, behalve het reagens BUF, bevatten stoffen van dierlijke oorsprong en dienen voorzichtig te worden gehanteerd.
- De monsternemingen zijn potentieel besmettelijk. Ze moeten worden gehanteerd met de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen en met inachtneming van de in het land van gebruik geldende hygiënevoorschriften.
- Het reagens R1 bevat stoffen van menselijke oorsprong die negatief op HIV-antilichamen, HCV-antilichamen en Ag Hbs zijn getest, maar als een potentieel besmettelijk product moeten worden behandeld.
- CONTROL- flacons bevatten natriumazide (< 0,1%).
- Gebruik reagentia niet langer dan de vervaldatum.
- Gebruik geen reagentia uit verschillende batches.
- Wacht tot het serum en de reagentia op kamertemperatuur komen.
- Schud de reagentia R1 en R2 voorzichtig vóór gebruik.
- Bij het toedienen van reagentia R1 en R2 moet ervoor worden gezorgd dat de druppelaar perfect verticaal staat. Controleer of er geen luchtbelletjes in de druppels zitten, zodat de geleverde volumes constant zijn.

6 - VERZAMELING EN VERWERKING VAN MONSTERS

Gebruik verse serums of serums die bij - 20 °C bewaard worden en die geen troebele hemolyse of verontreiniging vertonen. Voorkom herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Het serum nooit decomplexeren.

7 - OPSLAG EN BEREIDING VAN REAGENTIA

De reagentia zijn klaar voor gebruik.

Alle reagentia die bij 2-8 °C worden bewaard, zijn stabiel tot de op de verpakking vermelde uiterste gebruiksdatum. Zij mogen niet worden bevroren.

8 - BENODIGD, MAAR NIET MEEGELEVERD MATERIAAL

- Automatische pipet(ten) met een aan de te meten hoeveelheid aangepast pipetteringsvolume;
- Containers voor verontreinigd afvalmateriaal;
- een centrifuge;
- Hemolysebuisjes.

9 - WERKWIJZE

Laat reagentia vóór gebruik op kamertemperatuur komen.

9.1 - Voorbereiding van het monster

Verdun het te testen serum tot 1/20:

- 50 µL serum;
- 950 µL reagens BUF.

9.2 - Uitvoering van de test op microtiterplaat

- Breng met behulp van een meerkanaalse micropipet 50 µL reagens BUF in 12 putjes van de microtiterplaat.

- Breng met behulp van een micropipet 50 µL van het verdunde serum in het 1^o putje. Meng met het reagens BUF en breng, bij voorkeur met behulp van een microverdunner ("tulp"), 50 µL van het 1^o putje in het 2^o putje, van het 2^o putje in het 3^o, en ga zo maar door tot het 10^o putje, waarbij 50 µL van het 10^o putje wordt weggegooid. Dat resulteert in verdunningen van 1/40 tot 1/20480.

- Breng 50 µL van het verdunde serum over in het 11^o putje. Meng met het reagens BUF en gooi 50 µL weg. Deze verdunning (1/40) vormt de serumcontrole die tot taak heeft de natuurlijke antischaapagglutinininen die bepaalde serums kunnen bevatten, op te sporen.

- Schud de reagentia R1 en R2 voorzichtig.
 - Breng 1 druppel reagens R1 in de eerste 10 putjes.
 - Plaats 1 druppel reagens R2 in het 11^o putje (serumcontrole).
 - Breng 1 druppel reagens R1 in het 12^o putje (reagentiacontrole) die tot taak heeft de validiteit van het reagens BUF en het reagens R1 te controleren.

Opmerking: voer slechts één reagentiacontrole uit per testreeks.

- Homogeniseer de inhoud van de putjes zeer zorgvuldig met de hand, door te tikken op de zijkanten van de plaat geïmponeerde microtiterplaat.
- Laat de plaat vervolgens onbeweeglijk en volledig trillingsvrij liggen.
- Lees de reactie 2 uur later.

9.3 - Adsorptie van natuurlijke antischaapagglutinininen in geval van agglutinatie van de serumcontrole

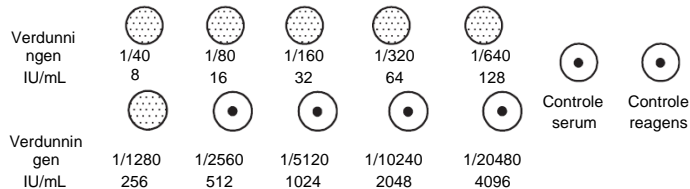
- Schud het reagens R3 voorzichtig.
- Plaats het in een buisje en meng het:
 - 0,1 mL serum;
 - 0,3 mL reagens R3.
- Laat 60 min incuberen bij kamertemperatuur.
- Centrifugeer bij 2000 omw/min gedurende 15 min.
- Verzamel het supernatant; het serum wordt vervolgens verdund tot 1/4.
- Verdun het supernatant tot 1/5 in reagens BUF om een geadsorbeerde moederverdunning (1/20) te verkrijgen.
- Herhaal het protocol van "Uitvoering van de test op microtiterplaat" en vervang de moederverdunning door de geadsorbeerde moederverdunning.

10 - AFLEZING EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Negatieve reactie: Afwezigheid van hemagglutinatie.
Aanwezigheid van een punctiforme knop aan de onderkant van de cupula.

Positieve reactie: Aanwezigheid van hemagglutinatie.
Aanwezigheid van een rood/bruine sluis die de cupula bedekt.

Voorbeeld: voor een gevoeligheidsdrempel van 0,2 IU/mL verkrijgen we:



De titer wordt gegeven door de laatste verdunning die hemagglutinatie vertoont.

De titer in IU/mL is gelijk aan het omgekeerde van deze grensverdunning vermenigvuldigd met de gevoeligheidsdrempel van het reagens in de kit.

Voorbeeld : als een serum positief is tot de verdunning 1/1280 en de gevoeligheidsdrempelwaarde 0,2 IU/mL is, is de titer van dit serum $1280 \times 0,2 = 256$ IU/mL.

11 - INTERNE KWALITEITSCONTROLE

De reagentia CONTROL+ en CONTROL- moeten tijdens de analyse als serums worden behandeld. De titer van het reagens CONTROL+ moet gelijk zijn aan de titer vermeld op het etiket van de flacon bij ± een verdunning. Het reagens CONTROL- moet een afwezigheid van hemagglutinatie vertonen. Als dat niet het geval is, is de test niet geldig.

12 - OORZAKEN VAN FOUTEN EN BEPERKINGEN VAN DE TEST

- Slechte opslag van het serum.
- Slechte opslag van reagentia na opening.
- Gebruik alleen de meegeleverde druppelaars in de kit.
- Wissel de druppelaars niet uit tussen de reagentia R1 en R2.
- Bij een positieve reactie in de eerste 10 putjes, dient u verder te gaan met de verdunningen om te zoeken naar de limiethemagglutinatie titer.
- De serumcontrole moet een negatieve reactie geven (punctiforme knop). In geval van hemagglutinatie van deze controle moet de test worden herhaald nadat de natuurlijke antischaapagglutinininen door adsorptie uit het serum zijn verwijderd.
- De reagentiacontrole moet een negatieve reactie geven (punctiforme knop). In geval van hemagglutinatie van deze controle, is het reagens ELI.H.A RF niet bruikbaar.
- Sommige serums, waarvan de concentratie van antilichamen zeer hoog is, kunnen bij de eerste verdunningen een zonefenomeen (met retractie van de sluis) veroorzaken, dat bij de volgende verdunningen verdwijnt.
- De reumatoïde factor is een biologische marker van groot diagnostisch belang in het verloop van volwassen reumatoïde polyarthritis. Nochtans is de reumatoïde factor niet specifiek voor reumatoïde polyarthritis en kan over het algemeen worden teruggevonden op lage niveaus bij gezonde proefpersonen (proefpersonen van meer dan 70 jaar oud), of in connectiviteits (syndroom van Gougerot Sjögren, systemische lupus erythematoses, gemengde connectiviteits...). Aan de andere kant kunnen zwakke titers worden waargenomen aan het begin van de ziekte of bij behandelde patiënten.
- Algemeen wordt aangenomen dat het niveau van de reumatoïde factor significant is wanneer het hoger is dan ongeveer 12 IE/mL (6), hoewel de waarschijnlijkheid hoger is wanneer de titer hoger is (over het algemeen vanaf 30 IE/mL) (7). De drempelwaarde voor de gevoeligheid, uitgedrukt in IU/mL (bepaald ten opzichte van de WHO-standaard), wordt voor elke batch in de kit vermeld (6).
- Daarnaast wordt aanbevolen om de WAALER-ROSE Bicolor te gebruiken, die het mogelijk maakt om de reumatoïde factor in 2 minuten te screenen door middel van een Waaler-Rose-reactie op het objectglaasje.
- De kwaliteit van de reagentia maakt het mogelijk om de reactie 's avonds uit te voeren en de aflezing de volgende ochtend, op voorwaarde dat de microtiterplaat niet wordt verplaatst en tegen trillingen wordt beschermd.
- In alle gevallen, en voordat de definitieve diagnose wordt gesteld, moet de interpretatie van de test worden gerealiseerd met de integratie van alle klinische, epidemiologische en biologische gegevens en de resultaten van andere tests.

13 - PRESTATIES

De resultaten van de evaluaties van de test ELI.H.A RF tonen een gevoeligheid van 97,6% en een specificiteit van 97,4%.

14 - AFVALVERWIJDERING

Afval dient te worden afgevoerd in overeenstemming met de in het land van gebruik voor dit type product geldende hygiënevoorschriften en wetgeving. In geval van accidentele morsen van reagens BUF: het werkpervlak reinigen met absorberend papier en spoelen met water. Als er serum of een ander reagens gemorst wordt: reinigen met bleekmiddel en absorberend papier.

15 - BIBLIOGRAFIE

1. E. WAALER - On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles - *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1940, 17,172.
2. H.-M. ROSE, C. RAGAN, E. PEARCE, M.-O. LIPMAN - Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, 681.
3. A. EYQUEM - FODJACHOUK - Diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques et des collagénoses - *Collection "Techniques de base"*, 1959, Ed. de la Touraille, Saint-Mandé.
4. N. SVARTZ - Tests sérologiques pour le diagnostic différentiel des affections rhumatismales - *Triangle*, 1959, 4, n° 1, 24.
5. K. SIMONS, K. AHO, P. SEPPÄLÄ, O. WAGER - Purification of the Rheumatoid Factor - *Clinica Chimica Acta*, 9, 1964, 519-525.
6. S.-G. ANDERSON, M.-W. BENTZON, V. HOUBA, P. KRAG - International Reference Preparation of Rheumatoid Arthritis Serum - *Bull. W.H.O.*, 1970, 42, 311-318.
7. P. WATTRE, B. D. DUBESNOY - Intérêt d'une microméthode originale, d'hémagglutination pour le titrage des facteurs rhumatoïdes - *Feuil. Biol.*, 1981, XXII, n° 123, 43-46.
8. Y. RAUTIN de la ROY, G. GROLLIER, D. BONTOUX, M. ALCALAY, C. MATUCHANSKY - Recherche et dosage des facteurs rhumatoïdes. Comparaison de six réactifs - *Feuil. Biol.*, 1982, XXIII, n° 129, 45-51.
9. J. CLOT, J. SANY, A. CLOT - Dosage des facteurs rhumatoïdes par Néphélométrie Laser. Etude de 1000 sérums - *Revue du Rhumatisme*, 1983, 50 (3), 181-185.
10. A. MARCELLI-BARGE, P. PREVOST, E. CHAPIUS, M.-C. SIMARD - Diagnostic immunologique de la polyarthrite rhumatoïde à l'aide d'une nouvelle microméthode d'hémagglutination quantitative du facteur rhumatoïde: le Polyartre - *Path. Biol.*, 1983, 31, n° 3, 217-220.
11. O. MEYER, O. BORDA-IRIARTE - Détection des facteurs rhumatoïdes par hémagglutination passive. Intérêt d'une microméthode quantitative: le Polyartre - *I.S.B.*, 1983, 9, n° 5, 262-267.
12. A. GUYARD, S. ALBAREDE - Facteurs Rhumatoïdes 00AT11. Echantillon 00G8 - AFSSaPS, 2000.

De wijzigingen ten opzichte van de vorige versie zijn grijs gemarkeerd.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61
http://www.elitechgroup.com

