

# ELI.H.A RF

## Determinazione quantitativa del fattore reumatoide in campioni di siero tramite emagglutinazione indiretta

220 Tests  
(Ref. 04115)

8000180-IT-2011-11

Per uso diagnostico *in vitro*, solo per uso professionale.



### 1 - SCOPO

ELI.H.A RF è un test di emagglutinazione indiretta (10, 11) per la determinazione quantitativa del Fattore Reumatoide IgM in campioni di siero (4, 5).  
Il kit consente di eseguire 220 test o 20 reazioni di 11 diluizioni.

### 2 - INTRODUZIONE

Il fattore reumatoide è un marker biologico di grande interesse diagnostico nell'artrite reumatoide negli adulti (5).

### 3 - PRINCIPIO

ELI.H.A RF si basa sulle proprietà di emagglutinazione specifiche del Fattore Reumatoide, usate in reazioni del tipo Waaler-Rose (1, 2, 8). Il reagente attivo R1 è composto da globuli rossi di pecora sensibilizzati da una frazione di gammaglobuline IgG di siero di coniglio sensibilizzato contro i globuli rossi di pecora.

La presenza del Fattore Reumatoide nei campioni di siero è rivelata da un'emagglutinazione del reagente attivo R1: si può notare una pellicola rossiccia-marrone nel pozzetto. In assenza del Fattore Reumatoide, questi globuli rossi si depositano e formano un bottone sul fondo del pozzetto.

Il reagente di controllo R2, composto da globuli rossi di pecora non sensibilizzati, assicura la specificità della reazione e permette l'eliminazione di interferenze dovute alle agglutinine anti-pecora naturali (eteroanticorpi di Forssman, anticorpi della mononucleosi infettiva ed altre macroglobuline).  
La reazione viene effettuata in micropiastre a V.

L'esecuzione del test è semplice e rapida. I risultati si ottengono in due ore.

### 4 - CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

Descrizione	Quantità
R1: Fiala di 4,4 mL di reagente attivo	1
R2: Fiala di 1 mL di reagente di controllo	1
BUF: Fiala di 55 mL di soluzione tampone fosfato pH 7,2	1
R3: Fiala di 2 mL di sostanza assorbente	1
CONTROL +: Fiala di 0,5 mL di controllo positivo titolato	1
CONTROL -: Fiala di 0,5 mL di controllo negativo	1
MICROPLATE: Micropiastre a V	3
DROPPER: Contagocce speciali	2

### 5 - AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI

- Solo per uso diagnostico in vitro, solo per uso professionale
- I test sono intesi per uso singolo.
- Tutti i reagenti, eccetto di reagente BUF, contengono materiale di origine animale. Conseguentemente, devono essere manipolati come componenti pericolosi.
- I campioni sono potenzialmente infettivi. Devono essere maneggiati con le consuete precauzioni, nel rispetto delle norme igieniche e le normative vigenti nel paese di utilizzo.
- Il reagente R1 contiene materiale di origine umana, che è stato testato e riscontrato esente da anticorpi a HIV, HCV e negativo ai HBsAg. Tuttavia
  - a, deve essere manipolato con cautela come i componenti pericolosi.
  - Le fiale CONTROL contengono sodio azide (con una contrazione inferiore allo 0,1% p/p).
  - Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
  - Non scambiare reagenti e controlli provenienti da lotti diversi.
  - Lasciare tornare a temperatura ambiente i reagenti e i campioni prima di effettuare il test.
  - Agitare con cautela i reagenti R1 e R2 prima dell'uso.
  - Quando si versano i reagenti R1 e R2, accertarsi che l'ago del contagocce sia perfettamente verticale. Verificare che non vi siano bolle d'aria nelle gocce per assicurare volumi di erogazione costanti.

### 6 - PRELIEVO/PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Utilizzare sieri freschi o sieri conservati a -20°C. Non usare siero emolizzato, torbido o contaminato. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti.  
Non decompilare il siero.

### 7 - MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti sono pronti per l'uso. Conservare a +2...+8°C, fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.

### 8 - MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Pipetta/e automatica/e con volume di pipettaggio adattato alla quantità da misurare
- Contenitore per rifiuti contaminate
- Centrifuga
- Tubi per emolisi

### 9 - ESECUZIONE DEL TEST

Prima dell'uso, lasciare che i reagenti e i campioni tornino a temperatura ambiente.

#### 9.1 - Preparazione di diluizione stock 1/20 di siero test

Diluire il siero da testare a 1/20:

- 50 µL di siero;
- 950 µL di reagente BUF.

#### 9.2 - Esecuzione del test su micropiastre

- Tramite una micropipetta multicanale, versare 50 µL di reagente BUF in 12 pozzetti della micropiastre.

- Tramite una micropipetta, aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nel primo pozzetto. Mescolare con il reagente BUF e trasferire, preferibilmente tramite un microdiluitore, 50 µL dal primo pozzetto nel secondo pozzetto, dal secondo pozzetto al terzo, e così via fino al decimo pozzetto. Scartare 50 µL dal decimo pozzetto. Otteniamo così le diluizioni da 1/40 fino a 1/20480.

- Aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nell'undicesimo pozzetto. Miscelare con il reagente BUF e scartare 50 µL. Questa diluizione 1/40 costituisce il controllo del siero e serve per il rilevamento di agglutinine anti-pecora naturali, che possono verificarsi in alcuni sieri.

- Agitare con cautela le reagenti R1 e R2.

- Distribuire una goccia di reagente R1 nei primi dieci pozzetti.
- Distribuire una goccia di reagente R2 nell'undicesimo pozzetto (controllo del siero).
- Distribuire una goccia di reagente R1 nel dodicesimo pozzetto (controllo del reagente). La sua funzione è quella di controllare la validità del reagente BUF e del reagente R1.

**Nota:** Predisporre solo un controllo del reagente per serie di saggi.

- Con molta cautela, omogeneizzare manualmente il contenuto del pozzetto dando leggeri colpi ai lati della micropiastre, posizionata di piatto.

- Poi lasciare ferma la piastra, lontano da vibrazioni.

- Leggere la reazione due ore dopo.

#### 9.3 - Assorbimento delle agglutinine anti-pecora naturali in caso di agglutinazione del controllo del siero

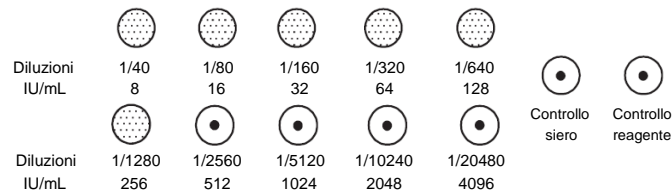
- Agitare con cautela il reagente R3.
- Introdurre in un tubo e mescolare:
  - 0,1 mL di siero test;
  - 0,3 mL di reagente R3.
- Incubare per 60 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 2000 giri/min per 15 min.
- Raccogliere il fluido supernatante; il siero quindi è diluito 1/4.
- Diluire il fluido supernatante 1/5 con il reagente BUF per ottenere una soluzione stock adsorbita (1/20).
- Seguire il protocollo di "Esecuzione del test su micropiastre" sostituendo la diluizione stock con la soluzione stock adsorbita.

### 10 - LETTURA DEI RISULTATI

**Reazione negativa:** No emagglutinazione  
Presenza di un bottone sul fondo del pozzetto.

**Reazione positiva:** Emagglutinazione  
Presenza di una pellicola rossiccia-marrone nel pozzetto.

**Esempio:** Per una soglia di sensibilità di 0,2 IU/mL si ottiene:



↳ Siero positivo a 1/1280

Il titolo viene dato dall'ultima diluizione che mostra emagglutinazione.  
Il titolo IU/mL è pari all'inverso di questa diluizione limite moltiplicato per la soglia di sensibilità stampata sulla confezione.

**Esempio:** Se un siero è positivo fino alla diluizione 1/1280, e se la soglia di sensibilità è 0,2 IU/mL, il titolo del siero sarà: 1280 x 0,2 = 256 IU/mL.

### 11 - CONTROLLO DELLA QUALITÀ INTERNO

Ogni kit include CONTROL - e CONTROL + titolati, pronti all'uso e da eseguire come i campioni. Questi controlli convalidano il test. Il titolo del CONTROL + deve essere pari a ± una diluizione rispetto a quella indicata sull'etichetta della fiala. Non deve essere riscontrata emagglutinazione con il CONTROL -. Altrimenti il test non è valido.

### 12 - CAUSE DI ERRORE E LIMITAZIONI DEL TEST

- Cattiva conservazione del siero.
- Cattiva conservazione dei reagenti dopo l'apertura.
- Utilizzare esclusivamente i contagocce forniti nel kit.
- Non scambiare i contagocce tra reagenti R1 e R2.
- In caso di reazione positiva nei primi dieci pozzetti, effettuare diluizioni più elevate per determinare il titolo di emagglutinazione limite.
- Il controllo del siero deve dare una reazione negativa (bottoni di globuli rossi). In caso di emagglutinazione di questo controllo, è necessario ripetere il test dopo l'eliminazione delle agglutinine anti-pecora naturali tramite assorbimento.
- Il controllo del reagente deve dare una reazione negativa (bottoni di globuli rossi). In caso di emagglutinazione di questo controllo, il reagente ELI.H.A RF non potrebbe essere usato.
- Alcuni sieri, con un titolo anticorpale molto elevato, possono causare un fenomeno di zona (con retrazione della pellicola) alle prime diluizioni, che scompare con diluizioni crescenti.
- Il Fattore Reumatoide è un marker biologico di elevato interesse diagnostico per l'artrite reumatoide dell'adulto. Tuttavia il Fattore Reumatoide non è artrite reumatoide specifico e può essere presente, a bassi livelli, in persone sane (di oltre 70 anni d'età) o in caso di connettiviti (sindrome di Gougerot Sjögren, lupus eritematoso disseminato, connettiviti miste...).
- D'altra parte, bassi titoli possono essere riscontrati all'inizio della malattia o in pazienti in terapia.
- Come prassi si ammette che il livello di Fattore Reumatoide è significativo quando è superiore a circa 12 IU/mL (6), sebbene la probabilità sia più elevata per un titolo più elevato (generalmente 30 IU/mL o oltre) (7). Ciascuna soglia di sensibilità del lotto, espressa in IU/mL, (determinata da Standard O.M.S.) è stampata sulla confezione (6). Inoltre si consiglia di utilizzare il WAALER-ROSE Bicolor che permette di effettuare in 2 minuti di screening per il fattore reumatoide mediante una reazione di Waaler-Rose su un vetrino
- La qualità dei reagenti permette l'effettuazione della reazione di sera, con lettura la mattina successiva, purché la micropiastre rimanga immobile e protetta da vibrazioni.
- In qualsiasi caso, la diagnosi dovrebbe essere avanzata usando i risultati di questo test insieme agli altri riscontri clinici, epidemiologici e di laboratorio.

### 13 - PRESTAZIONI DEL KIT

I risultati delle valutazioni di ELI.H.A RF mostrano una sensibilità del 97,6 % ed una specificità del 97,4 %.

### 14 - SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I campioni, i reagenti e i materiali e i prodotti contaminati devono essere smaltiti in un contenitore apposito per i rifiuti contaminati, in conformità alle raccomandazioni e norme vigenti per questa tipologia di prodotto nel paese di utilizzo.

In caso di versamento accidentale di reagente BUF, pulire la superficie con carta assorbente e acqua. In caso di versamento di siero o di un altro reagente, pulire la superficie con carta assorbente, acqua e candeggina.

### 15 - REFERENZE

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, L. PODLIACHOUK - Diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques et des collagénoses - *Collection "Techniques de base"*, 1959, Ed. de la Tourelle, 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. DUQUESNOY - Intérêt d'une nouvelle méthode originale, d'hémagglutination pour le titrage des facteurs rhumatoïdes - *Feuil. Biol.*, 1981, XXII, n° 123, 43-46.
8. Y. RAUTLIN 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 sérum - *Revue du Rhumatisme*, 1983, 50 (3), 181-185.
10. A. MARCELLI-BARGE, P. PREVOST, E. CHAPUIS, M.-C. SIMARD - Diagnostic immunologique de la polyarthrite rhumatoïde à l'aide d'une nouvelle microméthode d'hémagglutination quantitative du facteur rhumatoïde : le Polyartrite - *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 Polyartrite - J.S.B.*, 1983, 9, n° 5, 262-267.
12. A. GUYARD, S. ALBAREDE - Facteurs Rhumatoïdes 00AT11. Echantillon 00G8 - AFSSaPS, 2000.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziati in grigio.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau  
allée d'Athènes  
83870 SIGNES  
FRANCE

Tel: +33 (0) 4 94 88 55 00  
Fax: +33 (0) 4 94 32 82 61  
http://www.elitechgroup.com

