

ELI.H.A RF

Determinação quantitativa do fator sérico reumatoide por hemaglutinação indirecta

220 TESTES
(Ref. 04115)

8000180-PT-2011-11

Apenas para uso diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional.

Testes para uso único.



1 - OBJETIVO

ELI.H.A RF permite a determinação quantitativa do fator sérico reumatoide do tipo IgM (4, 5) por hemaglutinação indirecta (10, 11).

Com o kit, 220 testes ou 20 reações de 11 diluições podem ser realizadas.

2 - INTRODUÇÃO

O fator reumatoide é um marcador biológico de grande importância diagnóstica no curso da poliartrite reumatoide adulta (5).

3 - PRINCÍPIO

ELI.H.A RF baseia-se nas propriedades hemaglutinantes específicas do fator reumatoide utilizado nas reações do tipo Waaler-Rose (1, 2, 8). O reagente R1 consiste em glóbulos vermelhos de ovelhas, sensibilizados por uma fração de gama globulina de um soro de coelho anti glóbulos vermelhos de ovelhas. A presença do fator sérico reumatoide causa hemaglutinação do reagente R1 resultando em um véu vermelho/marrom cobrindo a cúpula. Na ausência do fator reumatoide, esses glóbulos vermelhos se estabelecem no fundo da cúpula na forma de um botão puntiforme.

O reagente R2, constituído por uma suspensão de hemácias não sensibilizadas de ovinos, garante a especificidade da reação e elimina a interferência por aglutininas naturais anti-shea (heteroanticorpos de Frossman, anticorpos de mononucleose infecciosa e outras macroglobulinas).

A reação ocorre numa placa de microtitulação em forma de V.

O manuseio é rápido e fácil. Os resultados são obtidos em 2 horas.

4 - REAGENTES E MATERIAL

Descrição	Total
R1 : Frasco de 4,4 mL do reagente indicativo	1
R2 : Frasco de 1 mL do reagente de controle	1
TAMPÃO: Frasco de 55 mL de tampão fosfato pH 7,2	1
R3 : Frasco de 2 mL de adsorvente	1
CONTROLE +: Frasco de 0,5 mL de controle positivo titulado	1
CONTROLE -: Frasco de 0,5 mL de controle negativo.	1
Microplaca: Placa DE microtitulação EM forma DE V	3
CONTA-GOTAS: Conta-gotas especial	2

5 - PRECAUÇÕES PARA USO

- Os reagentes destinam-se apenas ao diagnóstico *in vitro* e devem ser manuseados por pessoal autorizado.
- Os testes são de uso único.
- Todos os reagentes, exceto o BUF, contêm substâncias de origem animal e devem ser manuseados com cuidado.
- A amostragem é potencialmente contagiosa. Eles devem ser usados com as precauções usuais e em conformidade com os regulamentos de higiene em vigor no país de uso.
- O reagente R1 contém substâncias de origem humana que foram testadas negativas para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e Ag Hbs, mas que devem ser tratadas como um produto potencialmente contagioso.
- Os frascos para injetáveis de CONTROLO contêm azida de sódio (< 0, 1%).
- Não use reagentes por mais tempo do que a data de validade.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Aguarde até que o soro e os reagentes atinjam a temperatura ambiente.
- Agite suavemente os reagentes R1 e R2 antes de usar.
- Ao administrar os reagentes R1 e R2, deve-se tomar cuidado para garantir que o conta-gotas esteja perfeitamente vertical. Verifique se não há bolhas de ar nas gotículas, para que os volumes fornecidos sejam constantes.

6 - COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Use soros frescos ou soros que são armazenados a -20 ° C e que não apresentam hemólise turva ou contaminação.

Evite o congelamento e descongelamento repetidos.

Nunca descomplementar o soro.

7 - ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Os reagentes estão prontos para uso.

Todos os reagentes armazenados a 2-8 ° C são estáveis até o prazo de validade indicado na embalagem. Não devem ser congelados.

8 - MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Pipeta(s) automática (s) com volume de pipetagem adaptado (s) à quantidade a ser medida;
- Recipientes para resíduos contaminados;
- Uma centrífuga;
- Tubos de hemólise.

9 - MÉTODO

Deixe os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de usar.

9.1 - Preparação da amostra

Diluir o soro a ser testado para 1/20:

- 50 µL de soro;
- 950 µL de reagente BUF.

9.2 - Execução do ensaio em placa de microtitulação

- Usando uma micropipeta multicanal, transfira 50 µl de reagente BUF em 12 poços da placa de microtitulação.
- Usando uma micropipeta, coloque 50 µl do soro diluído no primeiro poço. Misture com o BUF reagente e aplique, de preferência usando um micro-diluinte ("tulipa"), os 50 µL do primeiro poço para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente até a décima cúpula, rejeitando 50 µL do décimo poço. Isso resulta em diluições de 1/40 a 1/20480.
- Transferir 50 µL do soro diluído para no decimo primeiro poço. Misturar com o reagente BUF e descartar 50 µL. Esta diluição (1/40) é o controle do soro encarregado de detectar as aglutininas naturais anti-shea que podem conter certos soros.

9.3 - Adorção de aglutininas naturais anti-shea em caso de aglutinação do controle sérico

- Agitar suavemente os reagentes R1 e R2.
 - Adicione 1 gota de reagente R1 aos primeiros 10 poços.
 - Coloque 1 gota do reagente R2 no décimo primeiro poço (controle do soro).
 - Coloque 1 gota do reagente R1 no décimo segundo poço (controle do reagente) para verificar a validade do reagente BUF e do reagente R1.

Nota: Realize apenas uma verificação de reagente por sequência de teste.

- Homogeneize o conteúdo dos poços com muito cuidado à mão, batendo nas laterais da placa de microtitulação posicionada plana.
- Em seguida, deixe a placa imóvel e completamente livre de vibrações.
- Leia a resposta 2 horas depois.

9.3 - Adorção de aglutininas naturais anti-shea em caso de aglutinação do controle sérico

- Agitar suavemente o reagente R3.
- Coloque-o num tubo e misture:
 - 0,1 mL de soro;
 - 0,3 mL de reagente R3.
- Deixe incubar à temperatura ambiente por 60 min.
- Centrifugue a 2000 rpm por 15 min.
- Recolher o sobrenadante; o soro é então diluído para 1/4.
- Diluir o sobrenadante a 1/5 em reagente BUF para obter uma diluição mãe adsorvida (1/20).
- Repita o protocolo de "Execução do ensaio em placa de microtitulação" e substitua a diluição mãe pela diluição mãe adsorvida.

10 - LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

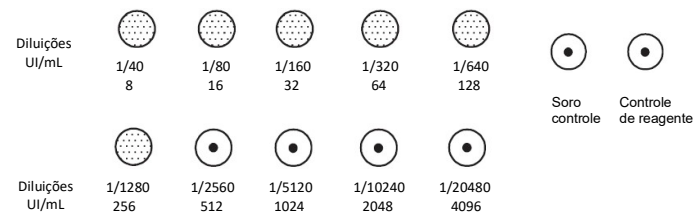
Reação negativa: Ausência de hemaglutinação.

Presença de um botão puntiforme na parte inferior da cúpula.

Reação positiva: Presença de hemaglutinação.

Presença de véu vermelho/marrom cobrindo a cúpula.

Exemplo: para um limiar de sensibilidade de 0,2 IU/mL obtemos:



→ Soro positivo em 1/1280

O título é dado pela última diluição mostrando hemaglutinação.

O título em UI/mL é igual ao inverso desta diluição limite multiplicada pelo limiar de sensibilidade do reagente no kit.

Exemplo : se um soro for positivo até que a diluição seja 1/1280 e o limiar de sensibilidade seja 0,2 UI/mL, o título deste soro é 1280 x 0,2 = 256 UI/mL.

11 - CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

Os reagentes CONTROLE + e CONTROLE - devem ser tratados como soros durante a análise. O título do reagente CONTROLE + deve ser igual ao título indicado no rótulo do frasco para injetáveis a ± uma diluição. O reagente CONTROLE - deve apresentar ausência de hemaglutinação. Caso contrário, o teste não é válido.

12 - CAUSAS DOS ERROS E LIMITAÇÕES DO TESTE

- Armazenamento deficiente do soro.
- Armazenamento deficiente de reagentes após a abertura.
- Use apenas os gotejadores incluídos no kit.
- Não substitua os conta-gotas entre os reagentes R1 e R2.
- Se houver uma reação positiva nos primeiros 10 poços, continue com as diluições para procurar o limite do título de aglutinação.
- O controle sérico deve dar uma resposta negativa (botão puntiforme). Em caso de hemaglutinação deste controle, o teste deve ser repetido após a remoção das anti-shagglutininas naturais do soro por adsorção.
- O controle do reagente deve dar uma reação negativa (botão puntiforme). Em caso de hemaglutinação deste controle, o reagente ELI.H.A RF não é utilizável.
- Alguns soros, dos quais a concentração de anticorpos é muito alta, podem causar um fenômeno de zona (com retração do véu) nas primeiras diluições, que desaparece nas próximas diluições.
- O fator reumatoide é um marcador biológico de grande importância diagnóstica no curso da poliartrite reumatoide adulta. No entanto, o fator reumatoide não é específico para a poliartrite reumatoide e geralmente pode ser encontrado em níveis baixos em indivíduos saudáveis (indivíduos com mais de 70 anos) ou em conectividade (síndrome de Gougerot Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, conectividade mista...).
- Por outro lado, títulos fracos podem ser observados no início da doença ou em pacientes tratados.
- Os níveis de fator reumatoide são geralmente considerados significativos quando são superiores a cerca de 12 UI/mL (6), embora a probabilidade seja maior quando o título é maior (geralmente de 30 UI/mL) (7). O limiar de sensibilidade, expresso em UI/mL (determinado em relação ao padrão da WHO), é indicado no kit para cada lote (6).
- Além disso, recomenda-se o uso do WAALER-ROSE Bicolor, que possibilita a triagem do fator reumatoide em 2 minutos por meio de uma reação de Waaler-Rose na lâmina.
- A qualidade dos reagentes torna possível realizar a reação à noite e a leitura na manhã seguinte, desde que a placa de microtitulação não seja deslocada e protegida da vibração.
- Em todos os casos, e antes do diagnóstico final ser feito, a interpretação do teste deve ser obtida com a integração de todos os dados clínicos, epidemiológicos e biológicos e os resultados de outros testes.

13 - DESEMPENHO

Os resultados das avaliações do teste ELI.H.A RF mostram sensibilidade de 97,6% e especificidade de 97,4%.

14 - ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Os resíduos devem ser descartados de acordo com os regulamentos de higiene e legislação em vigor no país de uso para este tipo de produto.

Em caso de derramamento acidental de reagente BUF: limpar a superfície de trabalho com papel absorvente e enxaguar com água. Se o soro ou outro reagente for derramado: limpe com alvejante e papel absorvente.

15 - BIBLIOGRAFIA

- 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.
- H.M. ROSE, C. RAGAN, E. FEARCE, M.-O. LIPMAN - Aglutinação diferencial de eritrócitos ovinos normais e sensibilizados por soros de pacientes com artrite reumatoide - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, 68, 1.
- A. EYQUEM, L. PODLIACHOUK - Diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques et des collagénoses - *Collection "Techniques de base"*, 1959, Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé.
- N. SVARTZ - Tests sérologiques pour le diagnostic différentiel des affections rhumatismales - *Triangle*, 1959, 4, n° 1, 24.
- K. SIMONS, K. Aho, P. SEPPÄLÄ, O. WÄGER - Purification of the Rheumatoid Factor - *Clinica Chimica Acta*, 9, 1964, 519-525.
- 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.
- P. WATTRE, B. DUQUESNOY - Intérêt d'une microméthode originale, d'hemagglutination pour le titrage des facteurs rhumatoïdes - *Feuil. Biol.*, 1981, XXII, n° 123, 43-48.
- Y. RAUTLIN de la ROY, G. GROLLIER, D. BONTOUX, M. ALCALAY, C. MATUCHANSKY - Recherche et dosage des facteurs rhumatoïdes. Comparaison de seis réactifs - *Feuil. Biol.*, 1982, XXII, n° 129, 45-51.
- J. CLOT, J. SANY, A. CLOT - Dosagem des facteurs rhumatoïdes par Néphélométrie Laser. Etude de 1000 sérums - *Revue du Rhumatisme*, 1983, 50 (3), 181-185.
- A. MARCELLI-BARGE, P. PREVOST, E. CHAPIUS, M.-C. SIMARD - Diagnostic immunologique de la polyarthrite rhumatoïde à l'aide d'une nouvelle microméthode d'hemagglutination quantitative du facteur rhumatoïde: le Polyarthrite - *Path. Biol.*, 1983, 31, No. 3, 217-220.
- O. MEYER, O. BORDA-IRIARTE - Détection des facteurs rhumatoïdes par hémagglutination passive. Intérêt d'une microméthode quantitative: le Polyarthrite - *J.S.B.*, 1983, 9, n° 5, 262-267.
- A. GUYARD, S. ALBAREDE - Factors Rhumatoïdes 00AT11. Echantillon 00G8 - AFSSaPS, 2000.

As alterações em comparação com a versão anterior são marcadas em cinza.

ELITECH MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19 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

