ELI.H.A RF

Determinação quantitativa do fator sérico reumatoide por hemaglutinação indirecta

220 TESTES
(Ref. 04115)

8000180-PT-2025-07
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 indireta (10, 11).
Com o kit, 220 testes ou 20 reações de 11 diluições podem ser realizados.

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**
BUF: Frasco de 55 mL de tampão fosfato pH 7,2	**1**
R3 : Frasco de 2 mL de adsorvente	**1**
CONTROL +: Frasco de 0,5 mL de controle positivo titulado	**1**
CONTROL -: Frasco de 0,5 mL de controle negativo.	**1**
MICROPLATE: Placa DE microtitulação EM forma DE V	**3**
DROPPER: 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 reagentes contêm azida de sódio (concentração < 0.1%). A azida de sódio contida nos reagentes pode reagir com os metais pesados nos canos e formar compostos explosivos. Assim, recomenda-se não deitar os reagentes para o lavatório e seguir as recomendações e normas vigentes para a deposição de resíduos.
- 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.
As amostras de soro podem ser armazenadas durante 72 horas a +2-8°C. Se o teste nao e realizado no prazo de 72 horas apos a colheita, elas deverao ser congelados a -20°C.
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-diluente ("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 dilído 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.

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

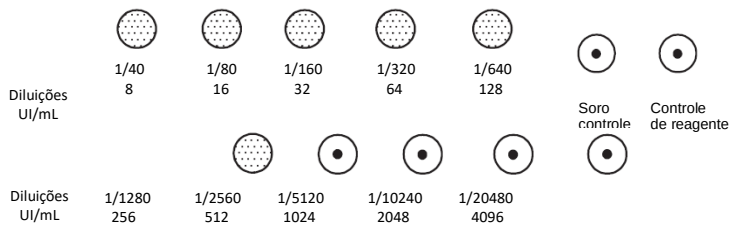
- Agitar suavemente o reagente **R3**.
- Coloque-o num tubo e misture:
  - 0,1 mL de soro;
  - 0,3 mL de reagente **R3**.
- Deixe incubar à temperatura ambiente por 60 min.
- Centrifugue a 2000 rpm por 15 min.
- Recolher o sobrenadante; o soro é então diluído para 1/4.
- Diluir o sobrenadante a 1/5 em 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 controlo, o teste deve ser repetido após a remoção das anti- shaaglutininas naturais do soro por adsorção.
- O controle do reagente deve dar uma reação negativa (botão puntiforme). Em caso de hemaglutinação deste controlo, 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 reumatóide 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

1. E. WAALER - On the occurrence of a factor in human serum activating the specific aglutination of sheep blood corpuscules - *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1940, 17.172.
2. H.-M. ROSE, C. RAGAN, E. PEARCE, M.-O. LIPMAN - Aglutinação diferencial de eritrócitos ovinos normais e sensibilizados por soros de pacientes com artrite reumatoide - *Proc. Soc. EXP Biol Med.*, 1948, 681.
3. A. EYQUEM, L. PODLIACHOUK - Diagnostic biologique des rhumatismes inflammationatoires 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 microméthode originale, d'hemagglutination 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. Comparaçio de seis réactifs - *Feuil. Biol.*, 1982, XXIII, n° 129, 45-51.
9. 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.
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'hemagglutination quantitative du facteur rhumatoïde: le Polyartitre - *Path. Biol.*, 1983, 31, No. 3, 217-220.
11. O. MEYER, O. BORDA-IRIARTE - Détection des facteurs rhumatoïdes par hémagglutination passive. Intérêt d'une microméthode quantitative: le Polyartitre - *I.S.B.*, 1983, 9, n° 5, 262-267.
12. A. GUYARD, S. ALBAREDE - Factors Rhumatoïdes 00ATI1. Echantillon 00G8 - AFSSaPS, 2000.

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

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