

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА IgM

## 2550-1, Rheumatoid factor (RF)

Каталог. № : 2550-1 Методика от 12-05-2006  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Твердофазовый иммуноферментный анализ (ELISA/ИФА) ревматоидного фактора (РФ) компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» предназначен для определения IgM антител к антигену РФ в образцах человеческой сыворотки и как средство диагностики ревматоидного артрита. Только для диагностического использования *in vitro*.

### ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) - хроническая воспалительная болезнь неизвестной этиологии. Ревматоидный артрит - системная болезнь, характеризующаяся хроническим быстрым увеличением и воспалением связки хряща и опорной системы. РА главным образом определен в соответствии с клиническими критериями, в которых систематические патогенетические изучения были затруднены сомнениями относительно присутствия общих патогенетических механизмов и относительным отсутствием определенных лабораторных результатов. Было зафиксировано, что ревматоидный фактор IgG присутствует в сыворотках пациентов с ревматоидным артритом, с и без активности ревматоидного фактора IgM.

РФ(ы) - иммуноглобулины любого изотипа с действием антитела, направленного против антигенных областей на Fc части IgG молекул. Из-за его пентавалентной структуры и способности к сшивке антигена иммуноглобулина G, IgM-РФ - главный изотип, идентифицированный клинически распадаемой диагностикой для обнаружения РФ. Ревматоидные факторы могут существовать как мю, гамма, альфа, и эпсилон изотипы.

Ревматоидные факторы обнаруживаются от 1 до 4 % общей совокупности. РФ присутствуют в 75 % совершеннолетних пациентов с самой высокой случайностью ревматоидных факторов в людях после 65 лет и почти во всех пациентах с синдромами Фелти и Сйогрена. Клиническая взаимосвязь повышенного ревматоидного фактора должна интерпретироваться с осторожностью. Увеличенные титры могут сопровождать ряд острых иммунных реакций, особенно вирусные инфекционные болезни и ряд других болезней (например, инфекционный мононуклеоз, туберкулез, лепру, различные паразитозы, болезнь печени, саркоидоз, и лимфопролиферативные синдромы).

Самые ранние испытания и те, которые наиболее широко используются, полагаются на агглютинативные свойства IgM класса ревматоидных факторов. Были разработаны и ежедневно использовались тесты сентизированного эритроцита овцы и латексной агглютинации. Эти анализы наиболее чувствительны к обнаружению РФ, то есть IgM изотипа из-за его поливалентной структуры. Эти анализы предусматривают разбавление, которое является трудным для стандартизации и имеет трудную обработку и неполную воспроизводимость. Иммуноферментные анализы более чувствительны чем агглютинация и очень специфические при использовании очищенного антигена.

### ПРИНЦИП ТЕСТА

Методика твердофазового иммуноферментного анализа компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» предназначена для определения IgM к IgG антигену. Очищенный антиген фиксируется в твердой фазе микролунок. Разбавленные анализируемые сыворотки добавляются в каждую лунку. Если в сыворотке пациента присутствует антитело, формируются комплексы антиген-антитело. После промывки для удаления несвязанной сыворотки в лунки добавляется анти-человеческий IgM, конъюгированный пероксидазой хрена. Если присутствует антитело, конъюгат связывается с ним. После промывки несвязанного конъюгата из лунок, добавляется и инкубируется раствор субстрата ТМВ. Присутствующий ферментный конъюгат реагирует с субстратом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и хромогеном тетраметилбензидаина (ТМВ), приводя к образованию синего цвета.

Добавление 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> останавливает ферментную реакцию и превращает синий цвет в желтый. Абсорбция раствора, измеряемая при 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgM антитела, зафиксированного на лунке.

### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Каждый набор в достаточном количестве содержит компоненты для проведения определенного количества анализов, указанных на этикетке упаковок.

1. **Микропланшет**, покрытый антигеном ревматоидного фактора: 96 лунок, снабжаемых рамкой для полосок и хранящихся в мешочке из фольги с высушивающим средством/индикатором влажности.
2. **Положительный контроль**: сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).
3. **Калибратор**: человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Специфический фактор набора напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).
4. **Отрицательный контроль**: человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).
5. **Конъюгат пероксидазы хрена**: готовый к использованию. Козлиный анти-человеческий IgM, очищенный по сродству, содержащий проклин (0,1%) в качестве консерванта (1 бутылка, 16 мл).
6. **Разбавитель сыворотки тип II**: готовый к использованию. Содержит проклин (0,1%) в качестве консерванта (1 бутылка, 30 мл).
7. **Промывочный буфер (20x концентрат)**: Содержит TBS, твин-20 и проклин (0,1%) в качестве консервантов. Разбавить буфер 1+19, перелив содержимое бутылки в емкость и добавив дистиллированной воды до конечного объема 1200 мл. Тщательно перемешать (одна бутылка, 50 мл).
8. **Раствор хромогена/субстрата**: тетраметилбензидин (ТМВ). Готовый к использованию (1 бутылка, 15 мл).
9. **Стоп раствор**: Содержит раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, готовый к использованию (1 бутылка, 15 мл).

### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

1. Все компоненты набора, которые хранятся при их рекомендуемых условиях хранения, устойчивы до даты истечения срока годности на их этикетке. Не использовать после истечения их срока годности.
2. Лунки покрытые антигеном. Неиспользованные полоски должны быть немедленно вторично запечатаны в мешочках из фольги с высушивающим средством и индикатором влажности и возвращены на хранение при 2-8 °C.
3. Все другие реагенты хранятся при 2-8 °C в их оригинальных упаковках.
4. Хранить 1X (разбавленный) промывочный буфер при комнатной температуре (21–25 °C) до 5 дней, или 1 неделю между 2–8 °C.

### ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Пробирки для анализа (12x75 мм) и подставка для разбавления образца.
2. Дистиллированная или деионизированная вода.
3. Микропипетки высокой точности или наконечники для микропипеток для внесения 10, 100 и 200 мкл.
4. Микропланшетный считыватель с одной или двойной длиной волны измерения с фильтром 450 нм. При использовании двойной длины волны настройте референтный фильтр на 600-650 нм. Прочтите руководство пользователя или свяжитесь с производителем аппарата, чтобы установить спецификации работоспособности линейности считывателя.
5. Промывочная бутылка, ручной промыватель для ИФА или автоматизированное промывочное устройство.
6. Таймер (миню на 30 минут).
7. Мерный цилиндр на 1200 мл.
8. Бумажные промокательные полотенца.
9. Дезинфицирующий раствор (напр., бытовая отбеливатель 1:10 с дистиллированной водой) или ванночка для утилизации отходов. Не используйте отбеливатель во время процедуры анализа, так как он может повлиять на активность конъюгата.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Только для диагностического использования *in vitro*.
2. Образцы пациентов могут содержать возбудители инфекций и должны применяться и уничтожаться как потенциально биоопасные. Не пипетировать ртом (использовать точные дозаторы). При обращении с образцами и при проведении процедуры анализа надевать одноразовые перчатки.

3. **ВНИМАНИЕ:** Исходный материал, использованная в приготовлении калибратора и контролей была протестирована на поверхностный антиген вируса гепатита В и ВИЧ-1 дали отрицательный результат. Однако, не один их методов анализа не дает полной гарантии, что человеческая кровь не является переносчиком ВИЧ, гепатита В или других потенциальных возбудителей инфекций, с этими реагентами необходимо обращаться с соблюдением 2 уровня биобезопасности, как рекомендуется в инструкции CDC/NIH «Биобезопасность в микробиологии и биомедицинских лабораториях», 1993 г.или последних изданиях.
4. Во время проведения анализа курение, прием пищи и жидкости запрещен.
5. Осторожно обращаться со стоп раствором. Поскольку он может вызвать ожоги или раздражение кожи.
6. Положительный и отрицательный контроли, также как и калибратор должны использоваться в каждом анализе.
7. После изъятия необходимого количества полосок для анализа, снова запечатайте неиспользованные лунки в оригинальном мешочке. Верните для хранения их вместе с другими реагентами при 2-8°C сразу после изъятия лунок, которые нужно использовать. Рекомендуется нумерация каждой полоски с использованием несмываемого маркера.
8. Не использовать реагенты после истечения их срока годности.
9. Не смешивать конъюгаты и реагенты из других наборов. Реактивы были оптимизированы для их соответствующей работы и выдачи правильных результатов.
10. Время инкубаций и температуры, отличающиеся от уже определенного может дать ошибочные результаты.
11. Использовать отдельные наконечники пипеток для каждого образца, контроля и реагента. Перекрестное загрязнение образцов может привести к ошибочным результатам.
12. Не использовать микролунки повторно.
13. Никакой гарантии не предоставляется на то, что эти реагенты не загрязнены микробиологически или грибок.
14. Некоторые компоненты этого набора содержат азид натрия (в качестве консерванта), который при взаимодействии со свинцовой или медной водоканализационной системой может приводить к образованию высоковзрывчатых металлических солей азотистоводородной кислоты. Как предосторожность, при утилизации в лабораторных раковинах смывайте большими объемами воды, чтобы предотвратить нагромождение азидов.
2. Для каждой анализируемой сыворотки провести разбавление сыворотки 1:21. Добавьте 10 мкл каждого образца сыворотки к 200 мкл разбавителя образца. Хорошо перемешать.
3. Достаньте требуемое количество лунок из мешочка и закрепите в держателе для полосок. Оставшиеся полоски необходимо герметично закрыть с осушителем/индикатором влажности. Мешочер необходимо закрыть под влиянием тепла или скрутить и конец запечатать лентой. Если цвет индикатора изменяется на из синего на розовый, полоски не должны использоваться.
4. Перенесите 100 мкл предварительно разбавленных образцов в реакционные лунки, используя многоканальную пипетку. Извлеките и удалите каждый образец, по крайней мере, 3 раза, чтобы гарантировать соответствующее смешивание образца перед переносом в реакционную лунку. Используйте новые наконечники пипеток для каждого образца. Добавьте 100 мкл разбавителя сыворотки к бланк реагенту.
5. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25 °C) **30 минут ± 1 минута**.
6. Промыть реакционный планшет 3 раза 1х промывочным буфером. Вытряхнуть жидкость из лунок. При использовании промывочной бутылки, полуавтоматического или автоматизированного промывочного оборудования добавьте в каждую лунку промывочный буфер, убедившись в отсутствии воздушных пузырьков в лунках. Вытряхните весь промывочный буфер из лунок. Повторите промывку еще 2 раза. Для автоматизированного оборудования может потребоваться до 5 промывок. После конечной промывки вытряхните промывочный буфер и удалите остатки промывочного буфера, постучав резко планшетом по бумажному полотенце. Промывочный буфер можно собирать в ванночку и обрабатывать 0,5% гипохлоритом натрия (отбеливателем) в конце дня.
7. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку бланк реагента. При добавлении избегайте пузырьков, поскольку они могут выдавать ошибочные результаты.
8. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25°C) в течении **30 минут ± 1 минута**.
9. Повторите промывку как описано в этапе 6.
10. Добавить в каждую лунку 100 мкл раствора хромогена/субстрата (ТМВ), включая лунку бланк реагента, сохраняя постоянный темп добавления вдоль планшета.
11. Инкубировать каждую лунку реакционного планшета при комнатной температуре (21-25°C) в течении **5 минут ± 1 минута**.
12. Добавить 100 мкл стоп раствора следуя способу добавления раствора хромогена/субстрата (ТМВ), включив лунку бланк реагента. Положительные образцы должны превратиться из синего в желтый. Осторожно постучите планшет, чтобы смешать содержимое лунок.
13. Считать планшет на спектрофотометре при длине волны 450 нм. При использовании двойной длины волны, установите референтный фильтр на 600 - 650 нм. Измерять каждую оптическую плотность (ОП) ссылаясь на бланк реагент. Планшет необходимо считать в течении 30 минут после завершения анализа.

#### СБОР ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови асептически венепункцией, используя приемлемую медицинскую технологию. Образцы сыворотки, содержащие видимые частицы вещества должны быть отцентрифугированы на низкой скорости. Образцы могут храниться при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении заморозить образцы до -20 до -70°C в неразмораживающейся камере. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов пациентов. Избегайте использования гемолизированных, липемических или бактериологически зараженных образцов.

#### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты перед использованием должны быть извлечены из места охлаждения и приведены к комнатной температуре (21 - 25°C). Возвратите все реагенты в холодильник сразу после использования.
2. Все образцы и контроли должны быть смешаны перед использованием.
3. Разбавить 60 мл 20X промывочного буфера до 1200 мл дистиллированной и/или деионизированной водой. Хорошо перемешать.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Определить число пациентов, которые нужно проанализировать. Для каждого анализа калибратор должен использоваться в двойном экземпляре. Также высоко положительный контроль, отрицательный контроль и бланк реагент (БР) должны использоваться в каждом анализе. Проверьте программное обеспечение и требования к планшету для правильных постановок калибратора/контроля.

Пример постановки:

1A	БР	2A	Пациент #4
1B	Отриц. контроль	2B	Пациент #5
1C	Калибратор	2C	Пациент #6
1D	Калибратор	2D	Пациент #7
1E	Полож. контроль	2E	Пациент #8
1F	Пациент #1	2F	Пациент #9
1G	Пациент #2	2G	Пациент #10
1H	Пациент #3	2H	Пациент #11

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Калибратор и контроли должны использоваться в каждой процедуре анализа.
2. Бланк реагент должен быть < 0.15 ОП при 450 нм.
3. Среднее значение ОП для калибратора должно быть ≥ 0.30 при 450 нм.
4. Заданные значения для высокого, низкого и отрицательного контроля должны быть в их соответствующих диапазонах, напечатанных на флаконах. Если значения контролей вне пределов их соответствующих диапазонов, анализ должен считаться недействительным, и он должен быть повторен.
5. Если вышеуказанные критерии не выполнены после повторного анализа, свяжитесь с технической службой производителя.

#### ВЫЧИСЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мера поглощения света (абсорбция) должна быть преобразована в заданные значения при использовании следующей формулы:

Абсорбция образца (450 нм)

Значение =

Средняя абсорбция калибратора (450 нм) X коэффициент\*

\*Коэффициент получен изготовителем эмпирически путем анализа пороговых данных. Коэффициенты не должны взаимозаменяться между номерами партий наборов.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Заданные значения образца\_0.90 рассматриваются как **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ**.
2. Заданные значения образца между 0.91 - 1.09 рассматриваются как **СОМНИТЕЛЬНЫЕ** и должны быть повторно

проанализированы в этом анализе или проанализированны другой методикой анализа.

3. Заданные значения образца 1.10 рассматриваются как **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ**.

### ПРЕОБРАЗОВАНИЕ МЕЖДУНАРОДНЫХ ЕДИНИЦ

Реактивность международной единицы (МЕд) определяется относительно стандарта МЕд. Преобразование заданных значений в международные единицы выполнено с использованием анализа экспоненциальной регрессии. Каждая партия изделия стандартизирована согласно международных единиц и снабжается таблицей преобразования определенной партии (Преобразование международных единиц (МЕд) в мл для РФ IgM.

НаприМЕдр:

Заданное значение	МЕд	Заданное значение	МЕд
1.0	7.7	3.0	189.8
1.5	16.6	3.5	368.7
2.0	36.0	4.0	800.5
2.5	78.2	4.5	1738.0

(См. Приложение в таблице преобразования по определенной партии в конце этой инструкции).

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Калибратор и контроли должны использоваться в каждой процедуре анализа.
- Заданное значение отрицательного контроля должно быть 0.90.
- Заданное значение положительного контроля должно быть 1.10.
- Абсорбция калибратора должна быть между 0,250 – 1,200 А.
- Если вышеуказанные критерии не выполнены после повторного анализа, свяжитесь с технической службой производителя.

### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Оптимальные результаты будут достигнуты только при строгом соблюдении указаний по анализу.
- Воспроизводимые результаты зависят от осторожного пипетирования, соблюдения инкубационных периодов и температуры, также от промывки полосок для анализа и тщательного перемешивания всех подготовленных растворов.
- Если требуются сравнения с другими методами, всегда проводите оба анализа одновременно.
- Не царапайте покрытые лунки в течение промывки и аспирации. Промывайте и заполняйте всеми реагентами без прерывания. Во время промывки проверяйте, чтобы все лунки были заполнены равномерно промывочным раствором и в них не было остатков жидкости.
- Должны соблюдаться указания по использованию соответствующих фотометров; проверьте настройку на соответствующую длину волны (450 нм) и и референтную длину волны (620 нм, необязательно) соответственно.
- Значения, полученные в данном анализе, служат только средством для диагностики. Каждый врач должен интерпретировать результаты в сочетании с историей болезни пациента, полученными результатами и другими диагностическими процедурами.

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Ревматоидный артрит - хроническая воспалительная болезнь, поражающая приблизительно 1-4% совокупности. Самое высокое количество случаев ревматоидных факторов происходит в людях старше 65 лет, достигая приблизительно 20% при использовании фиксации латекса. Клиническая корреляция повышенного ревматоидного фактора должна интерпретироваться с осторожностью. Увеличенные титры могут сопровождать ряд острых иммунных реакций, особенно вирусных инфекций и ряд других болезней (например, инфекционный мононуклеоз, туберкулез, лепру, различные паразитозы, болезнь печени, саркоидоз, и лимфопролиферативные синдромы).

### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### Воспроизводимость

Были проведены исследования, чтобы установить точность теста с использованием в 1 анализе 5 сывороток пациентов, каждой в 10 лунках. В пределах анализа были получены следующие результаты.

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3	Сыворотка 4	Сыворотка 5
Среднее	0.23	0.57	1.53	2.46	2.85
СО	0.02	0.03	0.06	0.05	0.08
КВ%	10.4%	6.4%	4.2%	2.1%	2.8%

Другая процедура была проведена для оценки точности межуанализами в течении 5 дней с использованием 5 сывороток пациентов. Были получены следующие результаты:

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3	Сыворотка 4	Сыворотка 5
Среднее	0.11	0.64	1.47	2.25	2.68
СО	0.01	0.03	0.09	0.08	0.11
КВ%	14.2%	4.6%	6.1%	3.6%	4.2%

### ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Были проведено исследование с использованием 204 сывороток пациентов, полученных от других клинических лабораторий. Эти образцы были проверены с использованием набора ИФА РФ «Диагностик Аутомейшн Инк.» и имеющегося в продаже набора ИФА РФ, следуя инструкциям производителей. 45 образцов были положительными по результатам набора ИФА и 157 образцов были отрицательными по результатам референтного набора ИФА. В сравнении с референтным методом ИФА 2 образца оказались ошибочно положительными и ни один ошибочно отрицательным при использовании набора «Диагностик Аутомейшн Инк.». Используя вышеупомянутые критерии данных, набор ИФА РФ «Диагностик Аутомейшн Инк.» имеет чувствительность 100% и специфичность 98.7 % в сравнении с результатами, полученными от референтного метода ИФА. Были получены следующие данные:

	Референтный +	ИФА -	Относительная чувствительность	Относительная специфичность
Ревматоидный фактор «Диагностик Аутомейшн Инк.»	45	2	100% (45/45)	98.7% (157/159)

Совпадение = 99.0%

### ПРЕОБРАЗОВАНИЕ МЕЖДУНАРОДНЫХ ЕДИНИЦ

Данные в Таблице 1 иллюстрируют заданные значения для последовательно разбавленного международного стандарта. Заданные значения РФ сравниваются с последовательными разбавлениями сыворотки стандарта международных единиц путем линейной регрессии (анализом экспоненциальной регрессии). Данные указывают, что международные единицы могут быть определены от заданного значения.

Таблица 1  
Преобразование в международные единицы

Стандарт международных единиц (Единицы/мл)	Заданное значение
25	1,8
12,5	1,2
6,30	0,8
3,25	0,5

Линейная регрессия сравнения Заданного Значения против международных Единиц

$$r^2 = 0.979 \quad a = 0.633 \quad b = 0.311$$

$$Y = \text{Заданное Значение} \quad X = \text{МЕД/мл}$$

Вычисление уравнения экспоненциальной регрессии

$$X = \frac{(Y + b)}{a} \quad e^x = \text{полученная МЕД/мл}$$

Приложение  
Преобразование международных единиц (МЕД) в мл для ревматоидного фактора IgM  
Номер партии набора: **образец**

Коэффициент	МЕд
1.0	7.9
1.2	10.9
1.4	14.9
1.6	20.5
1.8	28.1
2.0	38.5
2.2	52.8
2.4	72.4
2.6	99.4
2.8	136.3
3.0	186.9
3.2	256.4
3.4	351.6
3.6	482.3

3.8	661.5
4.0	907.3
4.2	1244.4
4.4	1706.7



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)