

REF : 208007

EDMA CODE : 12 11 01 10 00

SERODIA[®]-RA

(Pro *In Vitro* Diagnostiku)

**Částicový aglutinační test
pro detekci revmatoidního faktoru**

OBSAH

1. Princip testu a výhody	3
2. Součásti soupravy	3
3. Použití	4
4. Procesní opatření	4
5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	5
6. Pracovní postupy	5
7. Interpretace	7
8. Absorpční procedura	8
9. Chování testu	8
10. Korelace	9
11. Upozornění	9
12. Skladování	11
13. Doba použitelnosti	11
14. Balení	11
15. Literatura	11

1. Princip testu a výhody

In vitro diagnostická souprava SERODIA-RA (RAPA) je založena na principu pasivní aglutinace nosných želatinových částic, které jsou senzitivované denaturovanými králičími IgG protilátkami. Tato souprava se využívá pro sérodiagnostiku revmatoidní artritidy na základě detekce revmatoidního faktoru (RF) v lidském séru. Princip, který využívá souprava SERODIA-RA, je v souladu s principem Waaler-Rosova testu či jeho modifikace (Hellerova modifikace), které byly tradičně používány pro detekci RF.

Souprava SERODIA-RA je založena na mikrotitračních technikách a má následující výhody:

1. Senzitivita, specificita a detekční rozmezí testu SERODIA-RA odpovídají konvenčnímu RAHA testu, který byl původně založen na makrotitrační technice.
2. Ve snaze eliminovat co nejvíce nespecifických reakcí, které jsou zapříčiněny použitím erytrocytů jako nosných částic, používá souprava SERODIA-RA jako nosiče uměle vyrobené želatinové částice.
3. Jelikož souprava SERODIA-RA využívá barvené, uměle vyrobené, želatinové částice, umožňuje dosažení jasnějších a lépe čitelných aglutinačních nálezů v porovnání s nálezy hemaglutinačními.
4. Výsledky testu SERODIA-RA jsou odečítány po 3 hodinové inkubaci. Výsledky je též možné odečítat po inkubaci, která probíhá přes noc, bez jakýchkoliv změn, které by negativně ovlivňovaly odečítání výsledků.

2. Součásti soupravy

Souprava SERODIA-RA obsahuje následující reagentie a příslušenství.

Reagentie Balení	Ředící roztok (kapalný)	Roztok k ředění vzorků (kapalný)	Senzitivované částice (lyofilizované)	Nesenzitivované Částice (lyofilizované)	Pozitivní kontrola (lyofilizovaná)
5 testů x 5	12 mL x 1 vialka	12 mL x 1 vialka	1,5 mL* x 5 vialek	0,5 mL* x 3 vialky	0.5 mL* x 1 vialka
20 testů x 5	44 mL x 1 vialka	50 mL x 1 vialka	6,0 mL* x 5 vialek	1,5 mL* x 3 vialky	0.5 mL* x 1 vialka

* Po naředění

A: Ředící roztok (Kapalný)

Pro naředění senzitivovaných, nesenzitivovaných částic a pozitivní kontroly.

B: Roztok k ředění vzorků (Kapalný)

Pro naředění vzorků.

C: Senzitivované částice (Lyofilizované)

Lyofilizovaný přípravek s obsahem želatinových částic senzitivovaných denaturovanými králičími IgG protilátkami. Při jeho použití přidejte předepsané množství ředícího roztoku. Rekonstituovaná reagentie obsahuje 0,9% želatinových částic senzitivovaných denaturovanými králičími IgG protilátkami.

D: Nesenzitivované částice (Lyofilizované)

Lyofilizovaný přípravek tepelně upravených želatinových částic. Zředte přidáním předepsaného množství ředícího roztoku.

E: Pozitivní kontrola (Lyofilizovaná)

Lyofilizovaný přípravek kozích, anti-králičích IgG protilátek. Při použití přidejte předepsané množství ředícího roztoku. Kontrola poskytuje end point titr 1:160 při finálním ředění, pokud je testována podle postupu pro testování pozitivních kontrol (viz tabulka 2).

Příslušenství

Kapátka (25 μ L): 2 kusy

Kapátka jsou používána výhradně za účelem dávkování naředěných senzitivovaných a nesenzitivovaných částic.

3. Použití

Souprava SERODIA-RA je určena pro detekci revmatoidních faktorů (RF). Test musí být prováděn u vzorků sér.

4. Procesní opatření

1. Erytrocyty a jiné viditelné komponenty, přítomné ve vzorcích séra, by měly být před testováním preventivně odstraněny centrifugací z důvodu eliminace možné interference. Ujistěte se, že je před testováním provedena inaktivace vzorků.
2. Rekonstituované senzitivované a nesenzitivované částice před použitím důkladně promíchejte.
3. Po přidání senzitivovaných a nesenzitivovaných částic do jamek mikrotitrační destičky tuto destičku i s obsahem důkladně promíchejte.

- Po dobu inkubace destičku přikryjte a nevystavujte ji vlivu vibrací

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

Před provedením testu si připravte následující laboratorní vybavení:

- Vybavení vyžadované pro mikrotitrační techniku:

- 1) Mikrotitrační destičky Fastec s „U“ jamkami
- 2) Rozředovače (pro ředění vzorků) 25 μ L (0,025 mL)
- 3) Kalibrovaná pipetovací kapátka* 25 μ L (0,025 mL)

* Kapátka dodávaná v soupravě jsou používána výhradně k dávkování senzitivovaných a nesenzitivovaných částic. Použijte jiná kalibrovaná kapátka pro roztok k ředění vzorků.

- 4) Zařízení na promíchání destiček (automatický vibrační třepač)*-volitelně
- 5) Zařízení na vyhodnocování destiček – volitelně

2. Pipety

- 1) 25 μ L a 50 μ L mikropipety se špičkami pro dávkování a ředění vzorků.
- 2) 1,0 ml a 5,0 ml pipety pro absorpční postupy a rekonstituování lyofilizovaných reagensů.

3. Zkumavky

6. Pracovní postupy

1. Příprava reagensů

30 minut před testováním rekonstruuje senzitivované částice, nesenzitivované částice a pozitivní kontrolu předepsaným množstvím ředícího roztoku.

2. Kvantitativní test (viz tabulka 1)

- 1) Připravte si mikrotitrační destičku s „U“ jamkami (8 x 12 jamek). Používejte jednu řadu (12 jamek) pro každý vzorek.
- 2) Za využití mikropipety nebo kalibrovaného kapátka kápněte 4 kapky (100 μ L) roztoku k ředění vzorků do jamky č. 1 a 1 kapku (25 μ L) do jamek č. 2 až 12.
- 3) Za použití mikropipety* přidejte 25 μ L vzorku do jamky č. 1.
- 4) Za využití mikropipety připravte dvojkové ředění od jamky č. 1 k jamce č. 12.

***Postup bez mikropipety**

Za použití rozředovače nadávkujte přesně 25 µL vzorku do jamky č. 1 a proveďte ředění od jamky č. 1 k jamce č. 12. Alternativně za využití rozředovače nadávkujte 25 µL předem připraveného a naředěného vzorku v poměru 1:5 (např. směs 0,2 ml roztoku k ředění vzorků a 50 µL vzorku séra pipetované do malé zkumavky) do jamky č. 2. Poté proveďte ředění za využití rozředovače. Vždy je nutné důkladně promíchat obsah jamky (jamka č. 1 nebo jamka č. 2), a poté přenést požadovaný objem směsi do jamky následující (viz tab. 1). Tento postup opakujte až k jamce č. 12.

- 5) Kápněte 1 kapku (25 µL) roztoku nesenzitizovaných částic do jamky č. 2 a 1 kapku (25 µL) roztoku senzitivovaných částic do jamky č. 3 až 12 za použití kapátek dodávaných v soupravě.
- 6) Důkladně promíchejte obsah jamek (po dobu cca 30 sekund) intenzivním mícháním za použití zařízení na promíchání destiček (dejte pozor, aby nedošlo k vylištění obsahu jamek). Destičku přikryjte a ponechte ji v klidu stát při pokojové teplotě (15 – 30 °C) po dobu 3 hodin, a poté odečítejte výsledky.

3. Kontrolní test

- 1) Ověřte, zda každý vzorek reaguje negativně (při finálním ředění 1:20) s nesenzitizovanými částicemi.
- 2) Ověřte, zda roztok k ředění vzorků reaguje negativně jak se senzitivovanými, tak s nesenzitizovanými částicemi při každém testování (reagenční kontrola).
- 3) Podle postupu, který je uveden v tabulce č. 2 ověřte, že je pro každou soupravu titr pozitivní kontroly 1:160 při finálním ředění.

Pozitivní kontrola je předředěná v poměru 1:10. Pipetujte 25 µL roztoku k ředění vzorků do jamek č. 3 až č. 12. Poté přidejte 50 µL pozitivní kontroly do jamky č. 2 a proveďte test za využití stejného pracovního postupu, který je platný pro kvantitativní analýzu.

Tabulka č. 1 Kvantitativní analýza

Jamka číslo	1	2	3	4	5	6		12	
Roztok k řed. vzorků (µL)	100 <i>nebo</i>	25	25	25	25	25		25	(odstranit)
Vzorek (µL)	25 (1:5)	25 z jamky 1	25 z jamky 2	25 z jamky 3	25 z jamky 4	25 z jamky 5		25 z jamky 11	25 µL
Ředění vzorku	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160		1:10240	
Nesenzitizované částice (µL)		25							
Senzitizované částice (µL)			25	25	25	25		25	
Finální ředění		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		1:20480	
Promíchejte obsah za využití zařízení na promíchání destiček, destičku přikryjte a inkubujte 3 hodiny									
Interpretace									

Tabulka č. 2 Kontrolní test s pozitivní kontrolou

Jamka číslo	1	2	3	4	5	6		12	
Roztok k řed. vzorků (μL)			25	25	25	25		25	(odstranit)
Pozitivní kontrola (μL)		50	25 z jamky 2	25 z jamky 3	25 z jamky 4	25 z jamky 5		25 z jamky 11	25 μL
Ředění vzorku		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160		1:10240	
Nesenzitizované částice (μL)		25							
Senzitizované částice (μL)			25	25	25	25		25	
Finální ředění		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		1:20480	
Promíchejte obsah za využití zařízení na promíchání destiček, destičku přikryjte a inkubujte 3 hodiny									
Interpretace									

7. Interpretace

1. Vyhodnocení výsledků

Opatrně umístěte mikrotitrační destičku do zařízení na vyhodnocování destiček a porovnejte aglutinační nálezy s reagenčními kontrolami a výsledky interpretujte podle kritérií uvedených v tabulce č. 3.

Možné nálezy	Hodnocení
Částice koncentrované ve tvaru tečky s hladkým, kulatým, vnějším okrajem ve středu jamky	(-)
Částice koncentrované ve tvaru malého kompaktního prstence s hladkým, kulatým, vnějším okrajem	(±)
Rozlehlý prsteneček s aglutinovanými částicemi rozšířenými v celém jeho prostoru	(+)
Aglutinované částice uniformně rozprostřeny na celém dně jamky	(++)

2. Kritéria pro interpretaci

Pozitivní

Pokud vzorek vykazuje negativitu (-) s nesenzitizovanými částicemi (finální ředění 1:20) a zároveň vykazuje pozitivitu (+) se senzitivovanými částicemi (finální ředění 1:40 nebo více), je hodnocen jako POZITIVNÍ. End point titr je určen jako finální ředění, které ještě vykazuje viditelný pozitivní (+) nález.

Negativní

Vzorek je hodnocen jako NEGATIVNÍ, pokud vykazuje negativitu (-) s nesenzitizovanými částicemi a zároveň vykazuje negativitu (-) se senzitivovanými částicemi (finální ředění 1:40).

Hraniční

Vzorek, který vykazuje negativitu (-) s nesenzitizovanými částicemi (finální ředění 1:20) a zároveň vykazuje výsledky hraniční (±) se senzitivizovanými částicemi (finální ředění 1:40), je hodnocen jako HRANIČNÍ. Vzorky, které vykazují hraniční výsledky, by měly být confirmovány dalšími metodami (např. EIA atd.).

8. Absorpční procedura

Vzácně může docházet ke vzniku aglutinace vzorku s nesenzitizovanými částicemi. Pokud vzorek vykazuje aglutinaci jak s nesenzitizovanými částicemi, tak i s částicemi senzitivizovanými nebo pokud vykazuje hraniční výsledky, měl by být znovu analyzován po následující absorpční proceduře:

- 1) Pipetujte 450 μL naředěných nesenzitizovaných částic do zkumavky.
- 2) Poté do zkumavky přidejte 50 μL vzorku a důkladně promíchejte. Následně inkubujte při pokojové teplotě (15 – 30 °C) po dobu 30 minut.
- 3) Proveďte centrifugaci při 2000 rpm po dobu 5 minut. Poté opatrně odeberte supernatant (absorbovaný vzorek naředěný 1:10) a následně pipetujte 50 μL do jamky č. 2 v mikrotitrační destičce. Kápněte 1 kapku (25 μL) roztoku k ředění vzorků do jamek č. 3 až 12. Za použití mikropipety připravte sériové dvojité ředění od jamky č. 2 až k jamce č. 12.
- 4) Kápněte 1 kapku (25 μL) roztoku nesenzitizovaných částic do jamky č. 2 a 1 kapku (25 μL) roztoku senzitivizovaných částic do jamky č. 3 až 12 za použití kapátek dodávaných v soupravě.
- 5) Důkladně promíchejte obsah jamek (po dobu cca 30 sekund) za použití zařízení na promíchání destiček (dejte pozor, aby nedošlo k vylití obsahu jamek). Destičku přikryjte a ponechte ji v klidu stát při pokojové teplotě (15 – 30 °C) po dobu 3 hodin, a poté odečítejte výsledky.

9. Chování testu

1. Specificita

Při testování in-house referenčních vzorků dle předepsaných postupů vykazovaly negativní referenční vzorky NEGATIVNÍ výsledky a pozitivní referenční vzorky vykazovaly POZITIVNÍ výsledky.

2. Senzitivita

Při testování pozitivní kontroly, která je dodávána v soupravě, dle předepsaných postupů, byl indikován titr 1:160 při finálním ředění (± 1 ředění).

3. Reprodukovatelnost

Pokud jsou vzorky analyzovány podle předepsaného pracovního postupu 5x za sebou, jsou všechny výsledky v rozmezí ± 1 dvojitého ředění.

10. Korelace

Při testování 88 vzorků soupravou SERODIA-RA a jinou latexovou aglutinační soupravou byly získány následující výsledky:

		Latexový aglutinační test			Celkem
		Pozitivní	Hraniční	Negativní	
SERODIA-RA	Pozitivní	100% (61)	100% (16)	0% (0)	77
	Hraniční	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0
	Negativní	0% (0)	0% (0)	100% (11)	11
Celkem		100% (61)	100% (16)	100% (11)	88

Počet testovaných vzorků	n = 88
Pozitivní shoda	100% (61/61)
Negativní shoda	100% (11/11)
Celková shoda	81.8% [(61 + 11)/88]

11. Upozornění

1. U pacientů, jejichž vzorky vykazují pozitivní výsledky v testu SERODIA-RA, by mělo být provedeno komplexní posouzení jejich stavu, které zahrnuje důkladnou analýzu klinických symptomů a interpretaci výsledků jiných dostupných testů vztahujících se k danému onemocnění.
2. Vzorky pacientů trpících revmatoidní artritidou mohou vykazovat v testu SERODIA-RA negativní výsledky. Pokud je u pacienta podezření na toto onemocnění a jeho vzorek vykazuje negativní výsledky v testu SERODIA-RA, je doporučeno vzorek opětovně testovat v různých časových intervalech a mělo by být provedeno komplexní posouzení jeho stavu, které zahrnuje důkladnou analýzu klinických symptomů a interpretaci výsledků jiných dostupných testů vztahujících se k tomuto onemocnění.
3. Je nutné si uvědomit, že některé vzorky s velmi vysokým titrem protilátek mohou poskytovat tzv. prozónový efekt při nižších ředěních.

4. Se všemi vzorky by mělo být zacházeno jako s potenciálně biologicky nebezpečným materiálem, který může obsahovat infekční agens, jako například HBV, HCV, HIV nebo jiné nebezpečné mikroorganismy. S komponenty a příslušenstvím (např. pipety, zkumavky, vodné roztoky, špičky, papír atd.) by mělo být manipulováno s velkou opatrností a po použití by měly být řádně zlikvidovány. Dekontaminace může být provedena chlornanem sodným (efektivní koncentrace chlóru 1,000 ppm po dobu delší než 60 minut), 2% roztokem glutaraldehydu (po dobu delší než 60 minut), autoklávováním při 121 °C po dobu delší než 60 minut nebo spálením.
5. Jako konzervant je použit azid sodný. Azid sodný může vytvářet výbušné sloučeniny s olovem a mědí v odpadním potrubí. Při odstraňování roztoků s obsahem azidu sodného do výlevky je třeba tyto roztoky naředit velkým množstvím vody, aby bylo zabráněno vzniku azidových výbušných sloučenin. Množství azidu sodného v jednotlivých reagentech:

Ředící roztok: 0.10%

Roztok k ředění vzorků: 0.10%

Senzitizované částice: 0.12% (po naředění)

Nesenzitizované částice: 0.12% (po naředění)

Pozitivní kontrola: 0.20% (po naředění)
6. Zabezpečení kvality je dáno pro každou výrobní šarži. Nepoužívejte reagentie v kombinaci se soupravami s jinou výrobní šarží.
7. Souprava SERODIA-RA je určena pro použití s destičkami Fastec s „U“ jamkami.
8. Pokud společně se soupravou SERODIA-RA používáte jakékoliv přístroje či zařízení, řiďte se při jejich používání příloženými návody.
9. Při likvidaci reagentie je nutné je oddělit od ostatního odpadu v souladu s lékařskými nebo průmyslovými předpisy o odpadech.
10. V případě, že se reagentie dostanou do kontaktu s očima nebo s ústy, proveďte důkladné propláchnutí vodou a vyhledejte lékařskou pomoc nebo ošetření v případě potřeby.
11. Lyofilizované reagentie by měly být použity v den, kdy byly rekonstituovány. Pokud jsou rekonstituované reagentie skladovány při teplotě 2 – 10 °C, mohou být senzitivované částice používány do 5 dnů od rekonstituování a nesenzitivované částice do 14 dnů od rekonstituování. V tomto případě je doporučeno před jejich použitím provést kontrolní analýzu pro ověření jejich kvality. Rekonstituované senzitivované a nesenzitivované částice v nádobkách

by měly být při skladování z důvodu zabránění kontaminace překryty ochrannou fólií.

12. Reagencie obsažené v kitu nezmrazujte.

12. Skladování

Reagencie SERODIA-RA skladujte při teplotě 2 – 10 °C.

13. Doba použitelnosti

Doba použitelnosti je vyznačena jako datum expirace na obalu soupravy nebo na štítcích umístěných na lahvičkách.

14. Balení

5 testů x 5

20 testů x 5

15. Literatura

- 1) Arnett, F.C. et al.: The 1987 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis: Arthritis Rheum. 30: 4-S17, 1987
- 2) Ropes, M.W. et al.: The 1958 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis: Bull. Rheum. Dis. 9: 175, 1958

Dodává: GALI spol. s r. o.

Ke Stadionu 179

513 01 Semily

tel. 481 689 050, fax. 481 689 051

e-mail: info@gali.cz, www.gali.cz

Výrobce: FUJIREBIO INC.

62-5, Nihonbashi-Hamacho 2-chome,

Chuo-ku, Tokyo, 103-0007, Japan

TEL:81-3-5695-9217