

Prueba de Factor Reumatoide IgM (RF IgM) ELISA

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas para la medición cuantitativa de RF IgM en suero humano.

GRUPO
MEXLAB

ALTA CALIDAD EN PRUEBAS PARA SU LABORATORIO

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Paso	Temperatura (20-25°C)	Volumen	Tiempo de Incubación
1	Dilución de la muestra 1:40 = 5 µl / 200 µl		
2	Muestras, controles y calibradores diluidos	100 µl	30 minutos
3	Búfer de lavado (3 veces)	350 µl	
4	Conjugado de Enzimas	100 µl	30 minutos
5	Búfer de lavado (3 veces)	350 µl	
6	Sustrato cromogénico TMB	100 µl	15 minutos
7	Solución de parada	100 µl	
8	Lectura OD 450 nm		

USO DE LA PRUEBA

El kit de prueba RF IgM ELISA está diseñado para su uso en la medición cuantitativa de RF IgM en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los factores reumatoides representan un grupo de inmunoglobulinas que se caracterizan por su capacidad para reaccionar con determinantes antigénicos presentes en la porción Fc de las moléculas de IgG. Son autoanticuerpos que se encuentran en la sangre y el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide. El nivel de RF también puede estar elevado en pacientes con ciertas enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES). A veces, también se encuentra que la actividad de RF está asociada con enfermedades no reumáticas tales como infecciones bacterianas, parasitarias y virales.

Muchas pruebas de diagnóstico de uso común miden la RF de IgM en virtud de su capacidad para aglutinar partículas que están recubiertas con IgG. Tales pruebas requieren la preparación de diluciones seriadas de cada muestra de prueba y la estandarización es difícil. Se ha demostrado que el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) mide el RF IgM con mayor sensibilidad y es capaz de medir RF ocultas y RF de bajo peso molecular. El RF IgM es una prueba de EIA que utiliza un pozo de gammaglobulina inmovilizada para proporcionar una medición cuantitativa de los niveles de RF IgM.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La IgG purificada se recubre sobre la superficie de los micropocillos. Se añade suero diluido del paciente a los pocillos y el RF, si está presente, se une al pocillo. Todos los materiales no unidos se eliminan por lavado. Después de agregar el conjugado de enzima, se une al complejo anticuerpo-antígeno. Se lava el exceso de conjugado enzimático y se añade el sustrato cromógeno TMB. La reacción catalítica de la enzima conjugada se detiene en un momento específico. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de RF IgM en la muestra. Los resultados son leídos por un lector de micropocillos comparados de forma paralela con el calibrador y los controles.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Tiras de micropocillos: pocillos recubiertos de IgG purificada. 12 x 8 pozos
2. Diluyente de muestra: Solución azul. 1 vial (22 ml)
3. Calibrador: 100.0 IU / ml
4. Control Negativo: Rango indicado en la etiqueta 1 vial (150 µl)
5. Control Positivo: Rango indicado en la etiqueta (150 µl)
6. Concentrado de lavado (H) 20x. 1 botella (50 ml)
7. Conjugado enzimático: Solución de color rojo. 12 ml / botella
8. Sustrato Cromogénico TMB: Frasco ámbar. 12 ml / botella
9. Solución de parada: 12 ml / botella

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga siempre los micropocillos bien sellados en una bolsa con desecantes. Se recomienda utilizar todos los pocillos dentro de las 4 semanas posteriores a la apertura inicial de la bolsa.
3. Los reactivos son estables hasta la expiración del kit.
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, el sol o luz intensa durante el almacenamiento o el uso.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales biopeligrosos potenciales:
El calibrador y los controles contienen componentes de origen humano, que han sido probados y no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como el anticuerpo del VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, como no existe un método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de la ausencia del VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben manipularse en el nivel de bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Manual de salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos". 1984
2. No pipetear con la boca. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
3. Los componentes de este kit están diseñados para usarse como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
4. Este producto contiene componentes conservados con azida de sodio. La azida de sodio puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar una azida metálica explosiva. Al desechar, enjuague con una gran cantidad de agua.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

1. Recoja muestras de sangre y separe el suero.
2. Las muestras pueden refrigerarse a 2 - 8 ° C hasta por siete días o congelarse hasta por seis meses. Evite la congelación y descongelación repetidas de la muestra de suero.

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

1. Prepare búfer de lavado 1x.
Prepare el tampón de lavado agregando agua destilada o desionizada a un concentrado de lavado 20x hasta un volumen final de 1 litro.
2. Lleve todas las muestras y los reactivos del kit a temperatura ambiente (20-25 oC) y mezcle suavemente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Coloque la cantidad deseada de tiras recubiertas en el soporte.
2. Prepare una dilución 1: 40 de las muestras de prueba, control negativo, control positivo y calibrador agregando 5 µl de la muestra a 200 µl de diluyente de muestra. Mezclar bien.

3. Dispense 100 µl de sueros diluidos y calibradores y controles prediluidos en los pocillos correspondientes Para el blanco de reactivo, dispense 100 µl de diluyente de muestra en la posición del pocillo 1A. Toque el soporte para eliminar las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Retire el líquido de todos los pozos. Repita el lavado tres veces con búfer de lavado.

5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Retire el conjugado enzimático de todos los pocillos. Repita el lavado tres veces con búfer de lavado.

7. Dispense 100 µl de sustrato cromogénico TMB en cada pocillo e incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.

8. Agregue 100 µl de solución de parada para detener la reacción.

Asegúrese de que no haya burbujas de aire en cada pozo antes de cada lectura.

9. Leer O.D. a 450 nm con un filtro de referencia de 450 nm.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule la media del valor del calibrador duplicado x_c .

2. Calcule la media del control positivo duplicado, el control negativo y las muestras de pacientes.

3. Calcule el RF UI / ml de cada determinación dividiendo los valores medios de cada muestra por el valor medio del calibrador x_c y multiplique por 100 el calibrador UI / ml.

Un ejemplo típico:

Calibrador RF UI / ml = 100,0

Calibrador O.D. = 1.884, 1.876 $x_c = 1.880$

Control Negativo O.D. = 0.110, 0.121 $x_n = 0.116$

RF IU / ml = $(0.116 / 1.880) \times 100 = 6.1$ IU / ml

Control Positivo O.D. = 1.250, 1.278 $x_p = 1.264$

RF IU / ml = $(1.264 / 1.880) \times 100 = 67.2$ IU / ml

Muestra de paciente O.D. = 2.220, 2.208 $x_s = 2.214$

RF IU / ml = $(2.214 / 1.880) \times 100 = 117.7$ IU / ml

CONTROL DE CALIDAD

La ejecución de prueba puede considerarse válida siempre que se cumplan los siguientes criterios:

1. El El valor del blanco D.O. de reactivo frente al aire de un lector de micropocillos debe ser inferior a 0,250.

2. Si el valor O.D. del calibrador es inferior a 0,250, la prueba no es válida y debe repetirse.

3. El RF UI / ml para control negativo y positivo debe estar en el rango indicado en las etiquetas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Negativo:	RF < 25 IU/ml
Positivo:	RF > 25 IU/ml
Indicación de Artritis Reumatoide:	RF > 70 IU/ml

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio determine su propio rango normal y anormal.

Las IgM de RF se encuentran en aproximadamente el 2-10% de los adultos caucásicos aparentemente sanos y en aproximadamente el 50-70% de los adultos con artritis reumatoide clásica.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión

El coeficiente de variación intraensayo e interensayo se evaluó en tres muestras de suero combinadas diferentes:

Intra Ensayo	A	B	C
N	10	10	10
Media	116.5	53.3	24.6
D.E.	8.4	3.2	1.4
C.V.	7.3	5.9	5.6
Inter Ensayo	A	B	C
N	10	10	10
Media	123.5	56.3	26.2
D.E.	12.4	4.1	2.3
C.V.	10.0	7.2	8.8

Un estudio de comparación:

Aglutinación de látex comercial				
		N	P	Total
RF IgM	N	24	2	26
ELISA	P	0	43	43
	Total	24	45	69

ELISA Comercial				
		N	P	Total
RF IgM	N	26	0	26
ELISA	P	3	40	43
	Total	29	40	69

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Para fines de diagnóstico, los valores de RF IgM deben usarse como complemento de otros datos disponibles para el médico.

REFERENCIAS

- Bartfield, H. Distribution of rheumatoid factor activity in non-rheumatoid states. Annual N.Y. Acad. Sci., 168:30, 1969.
- Del Puente, A., et al. Arthritis Rheum. 31: 1239, 1988.
- Johnson, P.M. and W.P Faulk. Rheumatoid arthritis. Arthritis. Clin. Immunol. Immunopathol. 6:414, 1976.
- Karsh, J. and S.P. Halbert, et al. Quantitative determination of RF by an enzyme-labeled immunoassay. J. of Immunological methods, 32: 115, 1980.
- Moore, T.L. and J. Zuckner, et al. Complement-fixing hidden RF in juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism, 21: 935, 1978.
- Seymour, P., et al. A quantitative enzyme immunoassay for IgM rheumatoid factor using human immunoglobulin G as substrate. Am. Soc. Clin. Pathol. 74: 776, 1980.
- Ziff, A. Autoimmune aspects of rheumatoid arthritis, Chapter 3 (pp. 59-79) in The Autoimmune Disease (Rose, N.R. & I.R. Mackay, eds) Acad. Press., N.Y., 1985.

