

# FR-LISA IgM

REF

HM 028

2 X



## DÉFINITION

Le coffret **FR-LISA IgM** constitue une méthode de détection immunoenzymatique quantitative en microplaques. Il permet la recherche simultanée des facteurs rhumatoïdes de classe IgM dirigés contre les déterminants Fc d'immunoglobulines G humaines ou animales.

## VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les facteurs rhumatoïdes constituent une population d'autoanticorps réagissant avec différents sites antigéniques situés sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe G. Ces déterminants antigéniques peuvent être spécifiques des IgG humaines ou communs aux IgG de diverses espèces animales. Les facteurs rhumatoïdes peuvent appartenir à toutes les classes d'immunoglobulines, cependant les FR de classe IgM sont majoritaires.

Les facteurs rhumatoïdes sont essentiellement associés à des pathologies rhumatismales inflammatoires. Ils sont présents avec une fréquence élevée dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. La spécificité des FR pour la polyarthrite rhumatoïde est augmentée par la constatation d'une positivité associée pour les immunoglobulines G d'origine humaine et pour les immunoglobulines G de lapin.

Les méthodes de diagnostic communément utilisées sont les tests d'agglutination au latex qui identifient les FR de classe IgM dirigés contre les déterminants antigéniques humains et la réaction d'hémagglutination de Waaler-Rose qui identifie les FR de classe IgM dirigés contre les déterminants antigéniques du lapin.

Cependant les techniques immunoenzymatiques, plus sensibles et plus spécifiques, présentent l'avantage de pouvoir effectuer une détermination simultanée des deux types de spécificité.

En dehors des pathologies rhumatismales, les FR peuvent apparaître au cours de certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne ou virale ou au cours de pathologies inflammatoires. Leur prévalence est alors de 2% environ. Leur taux est faible et leur réactivité est dirigée uniquement vers les IgG d'origine humaine. Dans la population normale la prévalence des FR est de 2 à 5%.

## STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs et les barrettes de puits sensibilisées doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C

## PRINCIPE DU TEST

Chaque antigène (fragment Fc humain ou animal) est adsorbé sur un support solide constitué de 12 barrettes de 8 micropuits en plastique.

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits pour chaque spécificité antigénique. S'il contient les autoanticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer à l'antigène. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.
- On ajoute ensuite un conjugué (anti-IgM humaine couplé à la phosphatase alcaline) qui se fixe au complexe Antigène-Anticorps précédemment formé. Après incubation, l'excès de conjugué est éliminé par un second lavage.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme (Para Nitro Phenyl Phosphate). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité de facteurs rhumatoïdes présents dans l'échantillon.
- L'addition de NaOH 1N permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 405 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Un système de calibration, en unités internationales (First British Standard for Rheumatoid Arthritis 64/2) permet, par interpolation, de définir le titre de l'échantillon pour chaque spécificité.

## ÉCHANTILLONS

- Le test est à effectuer sur sérum.
- Éviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 7 jours maximum, sinon congelé s.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Agitateur
- Étuve à +37°C
- Sérum physiologique (NaCl 0,9 %)
- Lecteur muni d'un filtre 405 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

## COMPOSITION DU COFFRET

1 microplaque de 12 barrettes amovibles, sécables puits par puits, sensibilisés par le fragment Fc humain : <b>puits incolores</b> <b>MP</b>	12 barrettes
1 microplaque de 12 barrettes amovibles, sécables puits par puits, sensibilisés par le fragment Fc animal : <b>puits rouges</b> <b>MP</b>	12 barrettes
4 flacons d'Étalons pour la spécificité humaine titrés en unités internationales <u>Prêt à l'emploi</u> <b>CAL</b> <b>n</b> <i>Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.</i>	4 x 1,5ml
4 flacons d'Étalons pour la spécificité animale titrés en unités internationales <u>Prêt à l'emploi</u> <b>CAL</b> <b>n</b> <i>Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.</i>	4 x 1,5ml
1 flacon de Contrôle positif pour la spécificité humaine titré en unités internationales. <u>A diluer</u> <b>CONTROL</b> <b>+</b> <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i>	1 x 350µl
1 flacon de Contrôle positif pour la spécificité animale titré en unités internationales. <u>A diluer</u> <b>CONTROL</b> <b>+</b> <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i>	1 x 350µl
1 flacon de Contrôle négatif commun aux 2 spécificités <u>A diluer</u> <b>CONTROL</b> <b>-</b>	1 x 350µl
1 flacon de Conjugué pour la spécificité humaine <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>CONJ</b> <b>IgM</b>	1 x 15ml
1 flacon de Conjugué pour la spécificité animale <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>CONJ</b> <b>IgM</b>	1 x 15ml
1 flacon de Substrat contenant 12 comprimés de 5 mg de PNPP <u>A dissoudre</u> <b>SUBS</b> <b>PNPP</b>	1
1 flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) <u>A reconstituer en eau distillé</u> <b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>10x</b>	1 x 100ml
1 flacon de Tampon de dilution substrat <u>Prêt à l'emploi</u> <b>BUF</b> <b>SUBS</b>	1 x 62ml
1 flacon de Solution d'arrêt NaOH 1N <u>Prêt à l'emploi</u> <b>SOLN</b> <b>STOP</b>	1 x 15ml

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

### 1. Tampon de dilution et de lavage (TDL)

- Diluer le PBS-Tween concentré au 1/10 en eau distillée.
- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C.

*Remarque : En présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15 min à +37°C avant utilisation.*

### 2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons au 1/200 dans le tampon TDL (10µl d'échantillon qsp 2ml de TDL).
- Agiter vigoureusement au vortex.

### 3. Utilisation des conjugués prêts à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

### 4. Préparation du substrat

- Dissoudre les comprimés de PNPP dans le tampon de dilution substrat à raison de 1 comprimé pour 5 ml.  
Conserver à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

## PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Ramener tous les réactifs à température ambiante (+18°C / +25°C) avant la manipulation.

S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.

Éviter de superposer les plaques lors de l'incubation à +37°C en chambre humide.

S'assurer qu'il ne reste pas d'eau de condensation à la base des puits avant lecture au spectrophotomètre.

*L'étalon et les contrôles sont d'origine humaine. Les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.*

Les réactifs en solution (excepté le tampon substrat et la solution d'arrêt) contiennent de l'azide de sodium comme agent de conservation, à une concentration <0.1% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Le coffret **FR-LISA IgM** a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

**FR-LISA IgM** a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

## MODE OPÉRATOIRE

### 1. Préparation du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

- Pour la recherche de chaque spécificité, prévoir :
  - 1 puits « blanc réactif » (constitué par du TDL)
  - 2 x 4 puits standards ou 2 x 1 puits « standard 4 » (**dépôts en double**) selon le mode de calcul choisi (cf. « Interprétation des résultats »)
  - 2 x 1 puits pour chaque contrôle (**dépôts en double**)
  - Pour une meilleure précision des résultats, il est recommandé de déposer également les échantillons en double.
- Extraire ensuite le nombre exact de puits nécessaires et les disposer sur le support plastique.

### 2. Incubation des échantillons

Déposer 100µl de standard(s), contrôles ou échantillons dilués.

Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon TDL (200 µl/puits).

### 3. Incubation des Conjugués

Déposer 100µl de chaque conjugué.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Laver 3 fois avec le tampon TDL (200µl par puits).

Laver 1 fois avec du NaCl 0.9% (200µl par puits).

### 4. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans chaque puits.

Incuber 15 minutes à +37°C en chambre humide.

### 5. Fixateur

Rajouter 50µl de NaOH (1 mol/l) dans chaque puits.

### 6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 405nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

Faire le zéro de l'appareil sur le puits "blanc réactif" pour chaque spécificité.

## RÉSULTATS

Pour chaque spécificité, les résultats peuvent être calculés par l'une de ces deux méthodes :

### Étalonnage en 4 points

- Tracer la courbe d'étalonnage sur papier logarithmique en portant en abscisses (axe des X) les unités des 4 points standards et en ordonnées (axe des Y) les densités optiques (DO) correspondantes.

### Calibration en un seul point

- Calculer la DO moyenne pour le standard 4.
- Calculer le facteur de conversion égal à : titre du standard 4 / DO du standard 4.
- Multiplier la DO de chaque puits échantillon par ce facteur. En déduire le titre en facteur rhumatoïde.

### Exemple de calcul :

Pour un calibrateur titré à 250 UI/ml, et donnant une DO moyenne de 2.5, le facteur de conversion est égal à 250 /2.5, soit 100.

A un échantillon de DO 1.5, correspond un titre de 1.5 x 100, soit 150 UI/ml.

### Exemples de résultats obtenus en utilisant les deux modes de calcul

	Gamme d'étalonnage	Calibration un point
Échantillon fortement positif :	238UI/ml	260UI/ml
Échantillon positif :	93UI/ml	109UI/ml
Échantillon faiblement positif :	32UI/ml	39UI/ml

### Remarques :

- La DO moyenne du standard 4 doit être au moins égale à 0.8

- Les échantillons présentant des valeurs supérieures à celle du standard 4 peuvent être dilués au 1/400 afin d'obtenir une meilleure précision. Le nombre d'unités est à multiplier par 2.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Spécificité	négatif	limite	positif
humaine	<15UI/ml	15-20UI/ml	>20UI/ml
animale	<25UI/ml	25-30UI/ml	>30UI/ml

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le coffret contient un contrôle positif et un contrôle négatif. Il est conseillé de les doser dans chaque série réalisée. Les valeurs obtenues pour le contrôle positif doivent être comprises dans l'intervalle des valeurs précisées sur l'étiquette du flacon. Si les résultats des contrôles ne sont pas conformes aux résultats attendus, les essais doivent être répétés.

bmd propose, en complément, un contrôle multiparamétrique externe (Immuno-Trol III, réf : HM050) pour la recherche des autoanticorps anti-Facteurs Rhumatoïdes d'isotype IgM de spécificité humaine et animale. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

## CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

### 1. SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ, CONCORDANCE PAR RAPPORT À UNE AUTRE MÉTHODE

Le test **FR-LISA IgM** a été comparé à deux méthodes selon la spécificité recherchée :

- *spécificité humaine* : méthode ELISA quantitative en microplaques : EUROGENETICS RF (EUROGENETICS France - 45072 Orléans La Source)
- *spécificité animale* : méthode d'hémagglutination quantitative en microplaques basée sur le principe de la réaction de WAALER-ROSE : POLYARTITRE (FUMOUCHE - 92600 Asnières).

L'étude a porté sur 245 échantillons provenant :

- ⇒ de patients pour lesquels un diagnostic clinique de polyarthrite rhumatoïde avait été établi,
- ⇒ d'individus sains ou atteints d'autres pathologies autoimmunes.

Dans le cas de la spécificité humaine, tout résultat discordant entre les deux méthodes a été contrôlé par une méthode d'agglutination utilisant des particules de latex et commercialisée par la société BEHRING.

Spécificité humaine		Méthode de référence	
		Positifs	Négatifs
FR-LISA	Positifs	80	1
	Négatifs	3	161

Spécificité animale		Méthode de référence	
		Positifs	Négatifs
FR-LISA	Positifs	53	0
	Négatifs	3	189

### Valeur diagnostique du test

#### Spécificité humaine

Sensibilité relative : 96,3%

Spécificité relative : 99,4%

Concordance : 98,4%

Les 4 échantillons discordants ont été contrôlés par la méthode d'hémagglutination :

- sur les 3 échantillons négatifs par FR-LISA et positifs par la méthode de référence, 2 sont retrouvés négatifs et 1 à la limite du seuil de positivité (1/160).
- l'échantillon positif par FR-LISA et négatif par la méthode de référence est retrouvé négatif.

#### Spécificité animale

Sensibilité relative : 94,6%

Spécificité relative : 100%

Concordance : 98,8%

Les trois échantillons discordants donnent des valeurs proches du seuil de positivité dans les deux techniques.

## 2. EXACTITUDE

(Estimée par un test de recouvrement)

Principe: échantillon négatif surchargé par des quantités croissantes d'un échantillon positif

Le pourcentage de recouvrement est égal à : (titre obtenu / titre théorique) x 100.

Le titre théorique a été calculé à partir des valeurs obtenues pour ces deux échantillons testés séparément.

		SPÉCIFICITÉ HUMAINE		
		échantillon négatif (7UI/ml) et échantillon positif (181UI/ml).		
% sérum négatif	% sérum positif	Titre obtenu	Titre théorique	Recouvrement (%)
100	0	7	7	100
80	20	39	42	93
60	40	73	76	96
40	60	117	112	104
20	80	153	146	105
0	100	181	181	100

recouvrement moyen : 99,6%.

		SPÉCIFICITÉ ANIMALE		
		échantillon négatif (8UI/ml) et échantillon positif (117UI/ml).		
% sérum négatif	% sérum positif	Titre obtenu	Titre théorique	Recouvrement (%)
100	0	8	8	100
80	20	31	29	107
60	40	54	52	104

40	60	76	73	104
20	80	98	95	103
0	100	117	117	100

recouvrement moyen : 103%.

## 3. REPRODUCTIBILITÉ

(Estimée sur 3 échantillons: fortement positif, faiblement positif et négatif)

	INTRA-ESSAI		INTER-ESSAIS		
	Titre	n	CV (%)	n	CV (%)
Spécificité humaine	219 UI/ml	5	2.5	5	3.5
	44 UI/ml	5	3.7	5	4.4
	14 UI/ml	5	5.6	5	6.5
Spécificité animale	117 UI/ml	5	3.9	5	4.5
	38 UI/ml	5	4.8	5	6.4
	22 UI/ml	5	4.5	5	4.9

## 4. MODE DE DÉTERMINATION DU SEUIL DE POSITIVITÉ PAR RAPPORT AU STANDARD 64/2

Population sélectionnée : 100 sérums provenant d'individus sains, préalablement testés dans la méthode de référence. Ceux trouvés positifs ont été exclus des calculs ci-après.

Les sérums (93 pour la spécificité humaine, 99 pour la spécificité animale) et le standard 64/2 ont été testés au cours du même essai.

Ont été estimés par rapport au standard :

- le **seuil de négativité** correspondant à la moyenne des DO + 3 déviations standard obtenue pour la population testée: respectivement 15 et 25UI/ml pour les spécificités humaine et animale.
- le **seuil de positivité** correspondant à la moyenne des DO + 5 déviations standard: respectivement 20 et 30UI/ml pour les spécificités humaine et animale.
- Entre ces valeurs les titres des échantillons sont considérés **limites**.

## BIBLIOGRAPHIE

WILLIAMS DG.

Rheumatoid arthritis : autoimmunity in rheumatoid arthritis. In : Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*, 1<sup>st</sup> edition. St louis 1994 ; 91 : 9-11.

SHMERLING RH, DELBANCO TL.

The rheumatoid factor : an analysis of clinical utility. *Am J Med* 1991 ; 91 : 528-534.

BORRETZEN M et al.

Rheumatoid Factors. In : *Autoantibodies*. JB Peter and Y. Schoenfeld Eds. Elsevier Sciences B.V. 1996 ; 706-715.

ARNETT FC et al.

The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988 ; 31 : 315-324.

MOORE TT et al.

Rheumatoid Factors. *Clin Biochem* 1993 ; 26 : 75-84.

MEYER O., ROUQUETTE A-M et YOUINOU P.

Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes. *BMD Editions* (1999).













GLOUD-PAQUET M et al.

IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1987 ; 46 : 65-71.

## SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	SPÉCIFICITÉ HUMAINE	SPÉCIFICITÉ ANIMALE	CONDITIONS D'INCUBATION
<b>INCUBATION ÉCHANTILLONS</b>	100µl	Tampon TDL: blanc réactif	Tampon TDL: blanc réactif	30 mn à température ambiante
	100µl	Standard (s) et contrôles dilués (en double)	Standard (s) et contrôles dilués (en double)	
	100µl	Echantillons dilués	Echantillons dilués	
<b>LAVAGE</b>	Laver 3 fois en tampon de lavage (200µl/puits)			
<b>INCUBATION CONJUGUÉS</b>	100µl	Conjugué anti-IgM PAL	Conjugué anti-IgM PAL	30 mn à température ambiante
<b>LAVAGE</b>	Laver 3 fois en tampon de lavage (200µl/puits) Laver 1 fois en NaCl 0,9% (200µl/puits)			
<b>RÉACTION ENZYMATIQUE</b>	100µl	Solution substrat (PNPP)		15min à +37°C Chambre humide
<b>ARRÊT DE LA RÉACTION</b>	50µl	Solution d'arrêt (NaOH 1N)		

## INDEX DES SYMBOLES

	Déclaration de conformité CE		Nombre de tests
	Test ELISA		Consulter les instructions d'utilisation
	Dispositif de Diagnostic <i>In Vitro</i>		Limites de température
	Référence produit		Risque biologique
	Numéro de Lot		Contient de l'azide de sodium
	Date d'expiration		A reconstituer

**BioMédical Diagnostics SA**

**Siège social**  
Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tél : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)





# FR-LISA IgM

**REF** HM 028

2 X 

## DEFINITION

**FR-LISA IgM** is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of IgM class rheumatoid factors directed against Fc determinants from human or animal G immunoglobulins in human serum samples.

## DIAGNOSTIC VALUE

The rheumatoid factors (RF) constitute a population of autoantibodies which react with different antigen sites located on the Fc fragment of class G immunoglobulins. These antigen determinants may be specific to human IgG or common to the IgG of various animal species. The rheumatoid factors may belong to all the immunoglobulin classes, but the majority is IgM.

The rheumatoid factors are essentially associated with inflammatory rheumatic pathologies. They occur with increased frequency in the serum of patients suffering from rheumatoid polyarthritis. The specific affinity of the RF for rheumatoid polyarthritis is increased by the finding that there is an associated positivity for human origin G immunoglobulin and for rabbit immunoglobulin G.

Widely used diagnostic methods are latex agglutination tests which identify the IgM class RF directed against the human antigen determinants and the Waaler-Rose haemagglutination reaction which identifies IgM class RF directed against rabbit antigen determinants.

However, immunoenzymatic methods, which are more sensitive and more specific, have the advantage of being able to measure the two types of specific affinity simultaneously.

Apart from rheumatic pathologies, RF may appear in the course of some infectious diseases of bacterial or viral origin or during inflammatory pathologies. Their prevalence then is in the region of 2%. They are small in number and their reactivity is directed solely against human origin IgG. In the normal population, RF prevalence is between 2 and 5%.

## STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and assay strips at +2°C/+8°C in the ir own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

## ASSAY PRINCIPLE

Each antigen (human or animal Fc fragment) is coated onto a polystyrene microtiter plate (12 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antigen coated well for each specific affinity, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Binding of rheumatoid factors is detected using an anti-human IgM alkaline phosphatase labeled conjugate. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate (Para Nitro Phenyl Phosphate, producing a yellow color. The color intensity is proportional to rheumatoid factors level in the sample.
- After stopping the reaction by 1N sodium hydroxide, the optical density is red by a spectrophotometer at 405nm
- Rheumatoid factors levels of sample patients are expressed in international units (First British Standard for Rheumatoid Arthritis 64/2) for each specificity, using a standard curve or a calibrator.

## SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If determination is not performed immediately, samples should be stored at +2°C/+8°C for no longer than a week or frozen.
- To avoid any non-specific fixation, samples which have been frozen for more than 6 months or which are cloudy, should be centrifuged and filtered.

## MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- timer
- incubator adjusted at +37°C
- physiological serum (NaCl 0.9%)
- microplate spectrophotometer with 405nm filter
- 8 channel pipettes

## REAGENTS

Microplate coated with Human Fc fragment (12x8 individual breakaway wells with holder): <b>colorless wells</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MP</span>	12 strips
Microplate coated with Animal Fc fragment (12x8 individual breakaway wells with holder): <b>red wells</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MP</span>	12 strips
4 Standards for the human specificity tittered in international units <u>Ready to use</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">n</span> <i>The values are shown on the vial label.</i>	4 x 1.5mL
4 Standards for the animal specificity tittered in international units <u>Ready to use</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">n</span> <i>The values are shown on the vial label.</i>	4 x 1.5mL
1 vial Positive control for the human specificity tittered in international units <u>To dilute</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">+</span> <i>The values expected are shown on the vial label.</i>	1 x 350µL
1 vial Positive control for the animal specificity tittered in international units <u>To dilute</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">+</span> <i>The values expected are shown on the vial label.</i>	1 x 350µL
1 vial of Negative control common to both specificities <u>To dilute</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">-</span>	1 x 350µL
1 vial Goat anti-human IgM conjugate for the human specificity <u>Ready to use</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONJ</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">IgM</span>	1 x 15mL
1 vial of Goat anti-human IgM conjugate for the animal specificity <u>Ready to use</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONJ</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">IgM</span>	1 x 15mL
1 vial of Substrate containing 12x5mg PNPP tablets <u>To dilute</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SUBS</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PNPP</span>	1
1 vial of Phosphate-Tween buffer pH 7,2 (concentrated 10x) <u>To dilute in distilled water</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BUF</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">WASH</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">10x</span>	1 x 100mL
1 vial of Substrate dilution buffer <u>Ready to use</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BUF</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SUBS</span>	1 x 62mL
1 vial of Stop solution (Sodium hydroxide 1N) <u>Ready to use</u> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SOLN</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">STOP</span>	1 x 15mL

## SETUP

All the reagents should be prepared as required:

### 1. Dilution and washing buffer.

- Dilute concentrated Phosphate-Tween Buffer 1/10 in distilled water.
- Storage period: 3 month at +2°C/+8°C.  
*NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle to+ 37°C for 15 minutes before use.*

### 2. Preparation of samples and controls

- Dilute to 1/201 in dilution buffer (10µL sample + 2 mL dilution buffer).
- Vortex vigorously.

### 3. Preparation of ready-to-use conjugate.

- Estimate amount required for handling and transfer to a tube.

### 4. Preparation of the substrate.

- Dissolve the PNPP tablets in the substrate dilution buffer at a ratio of 1 tablet per 5 mL. Protect from light until use.

## PRECAUTIONS

Allow all reagents and samples to come to room temperature (+18°C/+25°C) before handling.

Check that all plates are well drained after each wash.

Do not put plates on top of each other during incubation at +37°C.

Check that no condensed water is left at the bottom of the wells before reading.

*Human sources for the preparation of standards and controls have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.*

Reagents in solution (except for substrate buffer and stop solution) contain less of 0.1% (w/v) sodium azide. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. This substance can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

**FR-LISA IgM** has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

**FR-LISA IgM** has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute reagents from other manufacturers. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

## METHOD

### 1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

- For each specific affinity test, set out:
  - one blank reagent well (made up with dilution buffer)
  - 4 standard wells or 1 "standard 4" well, depending on the chosen method of calibration (**in duplicate**) (cf. "Interpretation of results")
  - 1 well for each control (**in duplicate**)
  - to obtain more precise results, it is also advisable to run samples in duplicate.
- then detach the exact number of wells needed and return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

### 2. Sample incubation

Add 100 µl of standard(s), diluted controls or samples.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

*Wash step:*

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 200µL of washing buffer (200µL/wells)

### 3. Incubation of conjugate

Add 100µL of each conjugate.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

*Wash step:*

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 200µL of washing buffer (200µL/wells).

Make a last wash with 200µL of 0,9% sodium chloride.

### 4. Incubation of substrate

Add 100µL substrate into each well.

Incubate for 15 minutes in the dark at +37°C

### 5. Stop solution

Add 50µL of 1N sodium hydroxide to each well.

### 6. Reading

Read the optical density of each well at 405 nm against the reagent blank set at zero absorbance within 30 minutes.

## RESULTS

For each specificity, the results can be calculated by one of the following two methods:

### Standard curve

- Determine the mean optical density for all duplicate readings.
- Trace the standard curve on log-log paper, plotting the units of the 4 standard points along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).

### One point calibration

- Calculate the mean OD for standard 4.
- Calculate the conversion factor equal to: titre at standard 4/ OD for standard 4.
- Multiply the OD of each sample well by this factor. Deduce the titre in rheumatoid factor.

### Sample calculation:

- For a calibrator equal to 250 UI/ml, giving a mean OD of 2.5, the conversion factor is equal to 250/2.5, or 100.

A sample with OD 1.5, corresponds to a titre of 1.5 x 100, or 150 UI/ml.

*Examples of results obtained using the two methods of calculation*

	Standard curve	One point calibration
<b>Strongly positive sample</b>	238UI/mL	260UI/mL
<b>Positive sample</b>	93UI/mL	109UI/mL
<b>Weakly positive sample</b>	32UI/mL	39UI/mL

### Comments:

- The mean OD of the standard 4 should be at least 0.8.
- The samples with values greater than that of standard 4 may be diluted to 1/400 to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by 2.

## INTERPRETATION OF RESULTS

Specific affinity	negative	limit	positive
human	<15 UI/ml	15-20 UI/ml	> 20 UI/ml
animal	<25 UI/ml	25-30 UI/ml	> 30 UI/ml

## QUALITY CONTROL

The kit contains positive and negative controls. Both positive and negative control should be included with each run of the test. Positive control concentration should fall within the range printed on the positive control label. If either reagent control is invalid, the test should be repeated.

bmd offers an external multiparameter quality control (Immunotrol III, Cat: HM050) for determination of human and animal anti-Rheumatoid Factors (IgM isotype) autoantibodies. This control should be handled as samples.

## CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

### 1. SENSITIVITY, SPECIFIC AFFINITY AND AGREEMENT WITH ANOTHER METHOD

The "**FR-LISA IgM**" test was compared with two methods, depending on the specific affinity investigated:

- *human specific affinity*: quantitative ELISA microplate method: EUROGENETICS RF (EUROGENETICS FRANCE -45072 Orléans La Source)
- *animal specific affinity*: quantitative haemagglutination microplate method based on the principle of the WAALER-ROSE reaction: POLYARTITRE (FUMOUCHE - 92600 Asnières).

The study involved 245 samples, taken from:

- ⇒ patients for whom the clinical diagnosis of rheumatoid polyarthritis had already been established
- ⇒ healthy individuals, or patients with other autoimmune diseases.

In the case of human specific affinity, any discordant result obtained from the two methods was verified by an agglutination method using latex particles and marketed by BEHRING.

Mean recovery: 103%.

<b>Human specific affinity</b>		Method of reference	
		Positives	Negatives
FR-LISA	Positives	80	1
	Negatives	3	161

<b>Animal specific affinity</b>		Method of reference	
		Positives	Negatives
FR-LISA	Positives	53	0
	Negatives	3	189

### Diagnostic value

#### Human specificity

Relative sensitivity: 96.3%

Relative specificity: 99.4%

Agreement: 98.4%

The 4 discordant samples were verified by the haemagglutination method:

- of the 3 results negative by FR-LISA and positive by the reference method, 2 were found negative and one at the threshold limit of positive (1/160).
- the result positive by FR-LISA and negative by the reference method, was found negative.

#### Animal specificity

Relative sensitivity: 94.6%

Relative specificity: 100 %

Agreement: 98.8%

The 3 discordant samples yielded values close to the threshold limit for the two techniques.

### 2. ACCURACY

(Estimated by recovery test)

*Principle:* negative sample is supercharged with increasing quantities of a positive sample.

The overlap percentage equals (titre obtained / theoretical titre) x 100.

The theoretical titre was calculated on the basis of the values obtained for the two samples tested separately.

% negative serum	% positive serum	HUMAN SPECIFICITY		
		negative sample (7 IU/ml) and positive sample (181 IU/ml)		
		Titre obtained	Theoretical titre	Overlap (%)
100	0	7	7	100
80	20	39	42	93
60	40	73	76	96
40	60	117	112	104
20	80	153	146	105
0	100	181	181	100

Mean recovery: 99.6%.

% negative serum	% positive serum	HUMAN SPECIFICITY		
		negative sample (7 IU/ml) and positive sample (181 IU/ml)		
		Titre obtained	Titre obtained	Titre obtained
100	0	8	8	100
80	20	31	29	107
60	40	54	52	104
40	60	76	73	104
20	80	98	95	103
0	100	117	117	100

### 3. REPRODUCIBILITY

(Estimated on the basis of 3 samples, strongly positive, weakly positive and negative)

	INTRA-ASSAY			INTER-ASSAYS		
	Titre	n	CV (%)	n	CV (%)	
Human specificity	219 UI/ml	5	2.5	5	3.5	
	44 UI/ml	5	3.7	5	4.4	
	14 UI/ml	5	5.6	5	6.5	
Animal specificity	117 UI/ml	5	3.9	5	4.5	
	38 UI/ml	5	4.8	5	6.4	
	22 UI/ml	5	4.5	5	4.9	

### 4. METHOD FOR DETERMINING THE THRESHOLD VALUES ACCORDING TO STANDARD 64/2

Selected population: 100 sera from healthy individuals previously tested by the method of reference. Those found positive were excluded from the calculations below.

The sera (93 for human specificity, 99 for animal specificity) and standard 64/2 were tested in the same run.

- the **negative threshold** corresponds to the mean of the OD + 3 standard deviations, obtained for the population tested: 15 and 25 IU/ml respectively for human and animal specificity.
- the **positive threshold** corresponds to the mean of the OD + 5 standard deviations, obtained for the population tested: 20 and 30 IU/ml respectively for human and animal specificity.
- Between these values, sample titres are considered **borderline**.

### REFERENCES

WILLIAMS DG.

Rheumatoid arthritis : autoimmunity in rheumatoid arthritis. *In : Klippel JH, Dieppe PA, eds. Rheumatology, 1<sup>st</sup> edition. St louis 1994 ; 91 : 9-11.*

SHMERLING RH, DELBANCO TL.

The rheumatoid factor : an analysis of clinical utility. *Am J Med 1991 ; 91 : 528-534.*

BORRETZEN M et al.

Rheumatoid Factors. *In : Autoantibodies. JB Peter and Y. Schoenfeld Eds. Elsevier Sciences B.V. 1996 ; 706-715.*

ARNETT FC et al.

The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum 1988 ; 31 : 315-324.*

MOORE TT et al.

Rheumatoid Factors. *Clin Biochem 1993 ; 26 : 75-84.*

MEYER O., ROUQUETTE A-M et YOUINOU P.

Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes. *BMD Editions (1999).*













GIOUD-PAQUET M et al.

IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis 1987 ; 46 : 65-71.*

## SUMMARY OF METHOD

	<i>VOLUME TO BE DISTRIBUTED</i>	<i>HUMAN SPECIFICITY</i>	<i>ANIMAL SPECIFICITY</i>	<i>INCUBATION TIME</i>
<i>INCUBATION OF SAMPLES</i>	100µL	dilution buffer	dilution buffer	30 min at Room Temperature
	100µL	blank reagent standard(s)	blank reagent standard(s)	
	100µL	diluted controls and samples	diluted controls and samples	
<i>WASHING</i>	Wash 3 times with washing buffer (200µL/ well)			
<i>INCUBATION OF CONJUGATES</i>	100µL	Anti-IgM PAL conjugate	Anti-IgM PAL conjugate	30 min at Room Temperature
<i>WASHING</i>	Wash 3 times with washing buffer (200µL/ well) Wash once with NaCl 0.9% (200µL/ well)			
<i>ENZYME REACTION</i>	100µL	Substrate solution (PNPP)		15 min at 37°C
<i>STOP REACTION</i>	50µL	NaOH 1N		

## SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity		Number of test
	ELISA Test		Consult Instructions
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Device		Manufactured by
	Catalogue number		Temperature limitation
	Lot Number		Biological risk
	Expiry Date		Reconstitute with

***BioMédical Diagnostics SA***

**Office**  
Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tel : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)

