



DIASSTAT™

Anti-CCP

Anti-CCP

Anti-PCC

Anti-CCP

Anti-CCP

IVD



REF FCCP200

For professional use only

Usage reserve aux professionnels

Sólo para uso profesional

Nur für den fachgebrauch

Solo per uso professionale



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

Tel: +44 (0) 1382 422000, *Fax:* +44 (0) 1382 422088.

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

The DIASTAT™ Anti-CCP test is a semi-quantitative/qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of the IgG class of autoantibodies specific to cyclic citrullinated peptide (CCP) in human serum or plasma (EDTA, lithium heparin or sodium citrate). It is intended to aid in the diagnosis of Rheumatoid Arthritis (RA) and is not definitive in isolation. Autoantibody levels represent one parameter in a multicriterion diagnostic process, encompassing both clinical and laboratory-based assessments.

INTRODUCTION




Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease that is multi-functional in origin and is characterised by the inflammation of the membrane lining joints. The disease spreads from small to large joints, with the greatest damage in the early phase¹. The diagnosis of RA is primarily based on clinical, radiological and immunological features. The most frequent serological test is the measurement of rheumatoid factor (RF). The presence of RF is one of the American College of Rheumatology’s criteria for the classification of RA. The IgM class is the most common and is found in 60-80% of RA patients. RF is not specific for RA, as it is often present in healthy individuals and patients with other autoimmune diseases and chronic infections². It is reported that up to 30% of SLE patients with no evidence of RA are RF positive³. Despite its low specificity, a positive RF is considered an important predictor of outcome in RA. For several years, it has been recognised that antibodies to anti-perinuclear factor (APF) and keratin (AKA) are highly specific for RA. Antibodies to APF and AKA have been detected by indirect immunofluorescence using buccal epithelium or rat oesophagus⁴. The lack of availability of suitable buccal cell donors has limited the use of APF as a routine laboratory test. Recently the antigen of both these antibodies has been identified as epidermal filaggrin, an intermediate filament-associated protein involved in the cornification of the epidermis^{5,6}. Profilaggrin, which is present in the keratohyaline granules of human buccal mucosa cells, is proteolytically cleaved into filaggrin subunits during cell differentiation. At this stage, the protein is dephosphorylated and some arginine residues are converted to citrulline by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD)⁷. In 1998, Schellekens and colleagues reported that autoantibodies reactive with linear synthetic peptides containing the unusual amino acid citrulline were present in 76% of RA sera with a specificity for RA of 96%. The antibodies in patients with RA that recognised the citrulline containing epitopes were predominantly of the IgG class and of relatively high affinity⁸. In a subsequent paper, Schellekens and colleagues reported that an ELISA test based on cyclic citrullinated peptide (CCP) showed superior performance characteristics to one based on the linear version in the detection of antibodies to RA⁹. Very recently, it has been reported that, in principle, most citrullinated proteins/peptides are recognised by autoantibodies in RA sera although with differing sensitivities and specificities¹⁰. These findings suggest an important role for citrullinated antigens in the diagnosis of RA.


The DIASTAT™ Anti-CCP assay is an ELISA based on the detection of autoantibodies in human serum or plasma towards a synthetic cyclic peptide containing modified arginine residues. The test provides an additional tool in the diagnosis of patients with RA.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with a highly purified synthetic cyclic peptide containing modified arginine residues. During the first incubation, specific autoantibodies in diluted serum or plasma bind to the antigen-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, an enzyme-labelled monoclonal antibody to human IgG, binds any surface-bound autoantibodies. After further washing, specific autoantibodies are traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units. In the qualitative protocol, the amount of Conjugate bound by the sample is compared with that bound by the Reference Control. In the semi-quantitative protocol, the concentration of anti-CCP autoantibody can be estimated by interpolation from a dose-response curve based on Standards.

KIT COMPONENTS

| | | | | |
|----------|-------------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Conjugate | 1 _ 15ml | Alkaline phosphatase-labelled murine monoclonal antibody to human IgG, Tris buffer, protein stabiliser, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use. | |
| B | Substrate | 1 _ 15ml | Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage. N.B. IRRITANT. |  |
| C | Stop Solution | 1 _ 15ml | Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). Ready-to-use. N.B. IRRITANT. |  |
| D | Wash Buffer Concentrate (16X) | 2 _ 25ml | Borate buffer, 0.8% (w/v) sodium azide. Dilute before use. N.B. HARMFUL. |  |

| | | | |
|------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| E | CCP-Coated Wells and Strip Holder | 12 _ 8 well microtitre strips | Coated with synthetic citrullinated peptide, in a resealable foil pack with desiccant. |
| F | Sample Diluent Concentrate (5X) | 1 _ 25ml | Phosphate buffer, protein stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use. N.B. HARMFUL.  |
| 1-5 | Anti-CCP Standards | 5 _ 1.0ml | Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. 0, 2, 8, 30, 100U/ml. Ready-to-use. |
| 6 | Anti-CCP Reference Control | 1 _ 1.5ml | Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use. |
| +/- | Positive and Negative Controls | 1 _ 0.2ml 1 x 0.1ml | Human plasma, <0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:100 with diluted Sample Diluent before use, as for samples. |
| | Pack Leaflet | | |

STORAGE OF REAGENTS

Opened Kit Stability

A kit was opened and reused on three occasions over a three month period with no adverse effect on kit performance.

Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2-8°C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. Do not freeze kits.
4. Wash Buffer Concentrate, Sample Diluent Concentrate and Positive and Negative Controls must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
5. Diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent are stable at 2-8°C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
6. Replace surplus microtitre strips in the foil pack with the desiccant at 2-8°C, until required.
7. Do not expose Substrate to light during storage.
8. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.

Indications of Deterioration

The Substrate should be pale yellow in colour. Pink colouring indicates contamination and the reagent must be discarded. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded.

Sample Collection and Storage

The assay is recommended for serum or plasma (EDTA, lithium heparin, sodium citrate) samples; do not use grossly haemolysed or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Do not heat-inactivate samples, this may yield false positive results.

Samples may be stored undiluted at 2-8°C for four weeks; for longer storage store at -20°C. Samples diluted at 1:100 in diluted Sample Diluent must be used within the same day of dilution.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. Standards and Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for HBsAg, HIV-1 RNA or HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, and anti-HCV and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Standards and Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4th edition, May 1999, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Standards, Controls, Conjugate, Sample Diluent Concentrate and Wash Buffer Concentrate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.

- The Stop Solution contains sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped up with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.
- Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Axis-Shield Diagnostics.



C STOP SOLUTION
Irritant

R36/38: Irritating to eyes and skin.
 S23: Do not breathe fumes.
 S25: Avoid contact with eyes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.



D WASH BUFFER CONCENTRATE (16X)
Harmful

R22: Harmful if swallowed.
 R32: Contact with acids liberates very toxic gas.
 R52/53: Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
 S23: Do not breathe fumes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S28: After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
 S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.
 S60: This material and its container must be disposed of as hazardous waste.
 S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions / safety data sheets.

B SUBSTRATE
Irritant

R36: Irritating to eyes.
 S23: Do not breathe fumes.
 S25: Avoid contact with eyes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

F SAMPLE DILUENT CONCENTRATE (5X)
Harmful

R22: Harmful if swallowed.
 R32: Contact with acids liberates very toxic gas.
 R36: Irritating to eyes.
 R52/53: Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
 S23: Do not breathe fumes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S28: After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
 S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.
 S60: This material and its container must be disposed of as hazardous waste.
 S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions / safety data sheets.

P R E P A R A T I O N

Materials/Equipment Required but not Provided

- 96 well plate/strip reader with 550nm filter (540-565nm is acceptable).
- Precision pipettes to dispense 10µl, 100µl, 1ml. Automatic pipette to dispense 100µl. Automatic pipette to dispense 200µl for manual washing, automatic plate washer optional.
- Glass/plastic measuring cylinders: 1_100ml, 1_400ml.
- 1ml volume containers.
- Distilled/deionised water.
- Paper towels.
- Timer for 30 and 60 minute intervals.

Preparation for the Assay

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18-25°C for 30-60 minutes before use. Mix reagents by gentle inversion.

Do not dilute the Reference Control.

Dilute the following reagents and mix thoroughly.

| Reagent | Volume | Add |
|----------------------------------------|--------|---------------------------------|
| Wash Buffer Concentrate | 1 vial | 375ml distilled/deionised water |
| Sample Diluent Concentrate | 1 vial | 100ml distilled/deionised water |
| Positive and Negative Controls/samples | 10µl | 1ml diluted Sample Diluent |

Calculate the number of microtitre strips required for the current assay, and retain these in the microtitre strip holder. Return surplus strips to the resealable foil pack with the desiccant and store at 2-8°C until required. Ensure that all strips are securely held within the microtitre strip holder. Users may wish to number each strip along the top edge to aid identification. Retain the microtitre strip holder for further use.

ASSAY PROTOCOL

Qualitative protocol: run Reference Control, Positive and Negative Controls, and samples.

Semi-Quantitative protocol: run Standards (1-5), Positive and Negative Controls, and samples.

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100µl Reference Control/Standards in duplicate, pre-diluted (1:100) Positive and Negative Controls, and pre-diluted (1:100) patient samples into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed 15 minutes for any one set of Standards/Controls/samples.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25°C.
4. Decant strip contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted strips well with paper towels.
5. Wash wells **three times** with a minimum of 200µl diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100µl Conjugate to each well.
7. Incubate 30±5 minutes at 18-25°C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100µl Substrate to each well.
10. Incubate 30±5 minutes at 18-25°C. **Do not decant.**
11. Add 100µl Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
12. Read strips within 24 hours at 550nm (540-565nm).

CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

Consider each assay separately when calculating and interpreting results.

Qualitative Protocol

Calculate the absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample.

$$\text{Absorbance Ratio} = \frac{\text{Sample or Control Absorbance Value}}{\text{mean Reference Control Absorbance Value}}$$

Users should calculate a cut-off between positive and negative samples that is specific to their patient populations. Results from the patient populations used in the Axis-Shield clinical trial suggest the following cut-off:

| <u>Absorbance Ratio</u> | <u>Result Interpretation</u> |
|-------------------------|----------------------------------------------|
| <0.95 | Negative |
| ≥0.95 to ≤1.0 | Borderline - recommend repeat testing |
| >1.0 | Positive |

Semi-Quantitative Protocol

Plot the mean absorbance value of each Standard against log₁₀ Standard concentration (see following table) on suitable graph paper. Concentrations of Controls and samples can then be read from the standard curve; a typical plot is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results. Weighted 4-parameter logistic (4PL), weighted 5-parameter logistic (5PL), smoothed spline, log/logit and lin/lnit curve fits are also satisfactory.

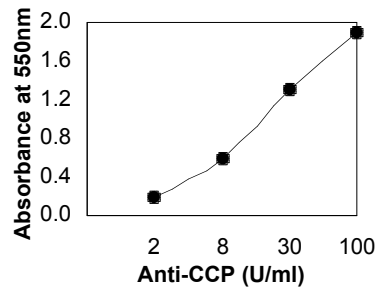
Samples with absorbances above Standard 5 (100U/ml) are outside the range of the assay, and should be reported as >100U/ml, diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

NB: As in any assay measuring antibodies, this assay determines the activity of the antibody present in the sample, rather than the concentration. Activity can be affected by a number of parameters, such as antibody avidity.

Standard Concentrations

| Standard Number | Concentration U/ml |
|-----------------|--------------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 2 |
| 3 | 8 |
| 4 | 30 |
| 5 | 100 |

Typical Standard Curve



QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes. Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. It is recommended that the pre-diluted Positive and Negative Controls are run in duplicate in all assays to monitor the quality of the test procedure. Run the ready-to-use Reference Control in duplicate in all qualitative assays.

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of any Control to meet the Control ratio specifications below renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and sample. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below -20°C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Preservatives such as sodium azide at 0.1% (w/v) will not affect sample results.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature. Incidence levels, their relationship to specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

Control Ratio Specifications

| Protocol | Specifications |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Qualitative (ratios) | $\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$ see Positive Control label |
| | $\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}} < 0.95$ |
| Semi-Quantitative | See Positive Control label for acceptable expected range (U/ml) |
| | Negative Control concentration <2U/ml |

EXPECTED VALUES

200 serum samples from asymptomatic apparently healthy donors with an age range of 18-72 years, comprising approximately equal numbers of males [n=105] and females [n=95], were tested with the DIASTAT™ Anti-CCP ELISA test.

No differences attributable to gender or age were observed (calculated comparing age ranges of ≤40 years [n=115] and >40 years [n=85]).

The overall mean anti-CCP concentration for this population was 0.63 ± 0.419U/ml (range 0.05-3.8U/ml).

On the basis of this reference population data and that of a clinical population, the suggested assay cut-off is:-

Reference Range
 ≤5U/ml = Negative
 >5U/ml = Positive

This reference range is suggested as a guideline only and each laboratory should establish a reference range appropriate to their patient populations and clinical practice. Please note that rheumatoid arthritis is twice as prevalent in females as in males.

P E R F O R M A N C E D A T A

Clinical Sensitivity in Clinically Confirmed RA

Clinical sensitivity data for the DIASTAT™ Anti-CCP ELISA was calculated as the percentage of clinically confirmed RA sera positive in the anti-CCP assay. Clinically confirmed RA was diagnosed according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria. The collated data from four sites is shown below. The corresponding clinical sensitivity of RF IgM using a commercially available test at two of the sites is also given below.

| Site | Confirmed RA (n) | Anti-CCP Positive (n) | Clinical Sensitivity | Confirmed RA (n) | RF IgM Positive (n) | Clinical Sensitivity |
|--------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| UK | 283 | 220 | 78% | 283 | 208 | 74% |
| UK | 100 | 75 | 75% | 100 | 95 | 95% |
| Europe | 100 | 78 | 78% | - | - | - |
| USA | 92 | 81 | 88% | - | - | - |
| Total | 575 | 454 | 79% | 383 | 303 | 79% |

- Not tested

Clinical Specificity in Non-RA Disease States and Asymptomatics

Clinical specificity for the DIASTAT™ Anti-CCP ELISA was obtained by calculating the percentage of non-RA disease state sera negative in the anti-CCP assay. The collated data from five sites for non-RA disease and from four sites for asymptomatics is shown below.

| Non-RA Disease States | n | Anti-CCP Negative (n) | Clinical Specificity |
|---------------------------------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| Systemic Lupus Erythematosus | 227 | 209 | 92% |
| Scleroderma | 92 | 86 | 93% |
| Polymyositis | 21 | 21 | 100% |
| Sjögren's Syndrome | 86 | 85 | 99% |
| Osteoarthritis | 66 | 59 | 89% |
| Psoriatic Arthritis | 49 | 48 | 98% |
| Reactive RA | 40 | 38 | 95% |
| Polymyalgia Rheumatica | 38 | 36 | 95% |
| Fibromyalgia | 21 | 21 | 100% |
| Early Sinovitis | 6 | 5 | 83% |
| Reiters' Syndrome | 18 | 18 | 100% |
| Sarcoidosis | 4 | 4 | 100% |
| Seronegative Inflammatory Arthropathy | 13 | 10 | 77% |
| Ulcerative Colitis | 40 | 39 | 98% |
| Crohn's Disease | 43 | 43 | 100% |
| Autoimmune Thyroiditis | 50 | 50 | 100% |
| Lyme Disease | 45 | 44 | 98% |
| CREST | 22 | 22 | 100% |
| Juvenile RA | 9 | 8 | 89% |
| Infectious Mononucleosis | 118 | 116 | 98% |
| Parvovirus | 11 | 11 | 100% |
| Vasculitis | 23 | 22 | 96% |
| Gout | 11 | 11 | 100% |
| Dermatomyositis | 10 | 10 | 100% |
| Ankylosing Spondylitis | 30 | 30 | 100% |
| Totals | 1,093 | 1,043 | 95.4% |

| Asymptomatics | n | Anti-CCP Negative (n) | Clinical Specificity |
|---------------|------------|-----------------------|----------------------|
| Totals | 334 | 334 | 100% |

Clinical Specificity of Anti-CCP and RF IgM

RF IgM and anti-CCP were measured in non-RA groups at three sites. The data from all sites has been collated below. All equivocal RF IgM results are excluded.

| Disease | n | Anti-CCP | | RF IgM | |
|------------------------------|------------|------------|----------------------|------------|----------------------|
| | | Negative n | Clinical Specificity | Negative n | Clinical Specificity |
| Systemic Lupus Erythematosus | 147 | 128 | 87% | 79 | 54% |
| Sjögren's Syndrome | 50 | 49 | 98% | 11 | 22% |
| Scleroderma | 53 | 48 | 91% | 14 | 26% |
| Polymyositis | 15 | 15 | 100% | 11 | 73% |
| Osteoarthritis | 31 | 26 | 84% | 20 | 65% |
| Autoimmune Thyroiditis | 35 | 35 | 100% | 25 | 71% |
| Lyme Disease | 36 | 36 | 100% | 26 | 72% |
| Infectious Mononucleosis | 39 | 38 | 97% | 11 | 28% |
| Totals | 406 | 375 | 92% | 197 | 49% |

| Asymptomatics | n | Anti-CCP | | RF IgM | |
|---------------|------------|------------|----------------------|------------|----------------------|
| | | Negative n | Clinical Specificity | Negative n | Clinical Specificity |
| Totals | 196 | 196 | 100% | 158 | 81% |

Agreement With Rheumatoid Factor IgM

The performance of the DIASTAT™ Anti-CCP ELISA was compared with that of a commercially available ELISA test for the measurement of Rheumatoid Factor IgM in an asymptomatic population [n=196] and in a population of clinically confirmed RAs [n=504].

Asymptomatic Population

| | | RF IgM ELISA | |
|----------|------------------|--------------|-----|
| | | + | - |
| DIASTAT™ | + | 0 | 0 |
| | Anti-CCP ELISA - | 37 | 159 |

Overall Agreement = 81%

n = 196

Clinically Confirmed RA

| | | RF IgM ELISA | |
|----------|------------------|--------------|----|
| | | + | - |
| DIASTAT™ | + | 365 | 33 |
| | Anti-CCP ELISA - | 48 | 58 |

Overall Agreement = 84%

n = 504

Dilution Characteristics

Five dilutions of three patient samples were assayed using two kit batches. The following table shows the mean values obtained and the dilution-corrected recovery.

| Sample | Dilution | Mean Value U/ml | Dilution Corrected % Recovery |
|--------|----------|-----------------|-------------------------------|
| 1 | 1/100 | 66.6 | 100 |
| | 1/200 | 33.9 | 104 |
| | 1/400 | 17.9 | 113 |
| | 1/800 | 9.4 | 118 |
| | 1/1600 | 4.0 | 101 |
| 2 | 1/100 | 62.9 | 100 |
| | 1/200 | 31.1 | 101 |
| | 1/400 | 14.4 | 94 |
| | 1/800 | 7.4 | 97 |
| | 1/1600 | 3.2 | 84 |
| 3 | 1/100 | 77.8 | 100 |
| | 1/200 | 35.0 | 88 |
| | 1/400 | 16.0 | 82 |
| | 1/800 | 9.0 | 94 |
| | 1/1600 | 4.2 | 88 |

Imprecision

- Intra-assay imprecision** determined by testing four controls [n=4], in twenty-five assays, using five operators and three kit batches.

| Control | Mean Value U/ml | Root Mean Square %CV |
|---------|-----------------|----------------------|
| 1 | 5.4 | 7.6 |
| 2 | 15.5 | 10.5 |
| 3 | 22.4 | 8.7 |
| 4 | 34.1 | 9.7 |

The range of %CV for each control was 1.8 – 16.3% (QC1), 1.2 – 20.3 (QC2), 1.4 – 15.5% (QC3) and 3.2 – 14.9% (QC4). This spread is a reflection of the number of operators [n=5] and kit batches [n=3] used for this study.

- Inter-assay imprecision** determined by testing four controls [n=4], in twenty-five assays, using five operators and three kit batches.

| Control | Mean Value U/ml | SD | %CV |
|---------|-----------------|------|------|
| 1 | 5.4 | 0.74 | 13.6 |
| 2 | 15.5 | 1.71 | 11.0 |
| 3 | 22.4 | 2.76 | 12.4 |
| 4 | 34.1 | 2.56 | 7.6 |

Lower Limit of Detection

The lower limit of detection, calculated as the mean of the zero standard plus two standard deviations, run in triplicate in 12 assays from three kit batches was 0.05U/ml.

Interferences

Haemoglobin up to 400mg/dl, bilirubin up to 0.2mg/ml, intralipid up to 15mg/ml and rheumatoid factor up to 200IU/ml do not interfere with anti-CCP antibody results.

LIMITATIONS OF USE

1. Although the presence of antibodies to CCP is associated with Rheumatoid Arthritis, a positive result is not in itself diagnostic, the data must be considered in light of other clinical and laboratory findings.
2. Some individuals may have high levels of anti-CCP antibodies with little or no evidence of clinical disease. By contrast, some patients with active disease may have undetectable levels of these antibodies. The clinical significance of this information is currently unclear.
3. As the result of an anti-CCP assay is not diagnostic proof of the presence or absence of clinical disease, therapy should not be started on the basis of an anti-CCP positive result alone.
4. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in anti-CCP autoantibody concentration but rather on clinical observation(s).
5. The clinical effectiveness of monitoring CCP autoantibody levels as an indication of progression/remission of Rheumatoid Arthritis has not been defined.
6. The value of anti-CCP in juvenile arthritis has not been determined.
7. Due to the specific characteristics of antigen/antibody interactions, it is not the concentration of antibody which is determined, but the activity. Since patient sera contain heterogeneous antibody populations, some samples may exhibit non-linearity, especially at very high sample dilutions.

REFERENCES

1. Gough AKS, et al. *Lancet*, **344**, 23-27, 1994.
2. Smolen JS. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis (Section C). In *Manual of Biological Markers of Disease* (Eds. van Venrooij WJ, Maini RN), Kluwer Academic Publishers, 1996.
3. Barland P and Lipstein E. *Am J Med*, **100 (Suppl 2A)**, 16S-23S, 1996.
4. Nakamura RM. *J Clin Lab Anal*, **14**, 305-313, 2000.
5. Simon M, et al. *J Clin Invest*, **92**, 1387-1393, 1993.
6. Sebbag M, et al. *J Clin Invest*, **95**, 2672-2679, 1995.
7. Girbal-Neuhauser E, et al. *J Immunol*, **162**, 585-594, 1999.
8. Schellekens GA, et al. *J Clin Invest*, **101**, 273-281, 1998.
9. Schellekens GA, et al. *Arthritis Rheum*, **43(1)**, 155-163, 2000.
10. van Boekel MAM, et al. *Arthritis Res*, **4**, 87-93, 2002.

SUMMARY OF PROTOCOL

1. Dilute samples and Positive and Negative Controls 1:100. Do not dilute Standards or Reference Control.
2. Add 100µl of Reference Control/Standards in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls and samples into referenced wells of the microtitre strip.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25°C.
4. Wash strips 3 times.
5. Add 100µl of Conjugate to each well.
6. Incubate 30±5 minutes at 18-25°C.
7. Wash strips 3 times.
8. Add 100µl of Substrate to each well.
9. Incubate 30±5 minutes at 18-25°C.
10. Add 100µl of Stop Solution to each well.
11. Read absorbance at 550nm.

Le test anti-CCP DIASTAT™ est un dosage immunoenzymatique (méthode ELISA) semi-quantitatif/qualitatif pour la détection des auto-anticorps spécifiques des peptides citrullinés cycliques (CCP) dans le sérum humain ou le plasma (à l'EDTA, l'héparine au lithium ou au citrate de sodium). Il est destiné à aider à prononcer le pronostic de polyarthrite rhumatoïde (PR), bien que son résultat à lui seul ne permette pas de poser un tel diagnostic de manière définitive. Les taux d'auto-anticorps représentent un paramètre dans un procédé diagnostiques à plusieurs critères, qui englobe des évaluations cliniques ainsi que biologiques.

INTRODUCTION


La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une affection auto-immune systémique d'étiologie multi-fonctionnelle qui se caractérise par l'inflammation de la membrane tapissant les articulations. L'affection se propage des petites articulations aux grandes, et elle provoque les lésions les plus graves durant la phase précoce¹. Le diagnostic de PR repose en premier lieu sur les caractéristiques cliniques, radiologiques et immunologiques. Le test sérologique le plus fréquent consiste à mesurer le facteur rhumatoïde (FR). La présence du FR est l'un des critères du Collège de Rhumatologie américain pour la classification de la PR. La classe IgM est la plus courante et on la trouve chez 60 à 80 % des patients avec PR. Le FR n'est pas spécifique de la PR car il est souvent présent chez les individus en bonne santé et les patients avec d'autres affections auto-immunes et des infections chroniques². Il a été signalé que jusqu'à 30 % des patients avec un LEAD sans aucun signe de PR possèdent le FR³. En dépit de sa faible spécificité, un FR positif est considéré un prédicteur important du dénouement dans la PR. Pendant plusieurs années, il a été reconnu que les anticorps dirigés contre le facteur anti-périnucléaire (FAP) et la kératine (AKA) sont très spécifiques de la PR. Des anticorps dirigés contre le FAP et l'AKA ont été détectés par immunofluorescence indirecte en utilisant de l'épithélium buccal ou de l'oesophage de rat⁴. Le manque de disponibilité de donneurs de cellules buccales adéquates a limité l'usage du FAP en tant que test biologique routinier. Tout récemment, l'antigène de ces deux anticorps a été identifié comme étant la filaggrine épidermique, une protéine associée au filament intermédiaire impliquée dans la kératinisation de l'épiderme^{5,6}. La profilaggrine, qui est présente dans les granules de kératohyaline des cellules de la muqueuse buccale de l'être humain, est segmentée de manière protéolytique en sous-unités de filaggrine durant la différenciation cellulaire. A ce stade, la protéine est déphosphorylée et certains des résidus d'arginine sont convertis en citrulline par l'enzyme appelée peptidylarginine-désaminase (PAD)⁷. En 1998, Schellekens et ses collègues ont rapporté qu'il y avait des auto-anticorps réagissant aux peptides de synthèse linéaires contenant l'acide aminé inhabituel appelé citrulline dans 76 % des sérums de patients avec PR, avec une spécificité de 96 % pour la PR. Les anticorps chez les patients avec PR qui reconnaissent les épitopes contenant de la citrulline appartenaient principalement à la classe IgG et leur affinité était relativement élevée⁸. Dans un article ultérieur, Schellekens et ses collègues ont rapporté qu'un test ELISA ayant pour base le peptide citrulliné cyclique (CCP) donnait de meilleurs résultats que ceux de la version linéaire en ce qui concerne les anticorps de détection dirigés contre la PR⁹. Tout récemment, on a aussi rapporté que, en principe, les auto-anticorps reconnaissent presque toutes(tous) les protéines/peptides citrulliné(e)s dans le sérum de patients avec PR, bien que la sensibilité et la spécificité soient variables¹⁰. Ces résultats suggèrent que les antigènes citrullinés jouent un rôle important au niveau du diagnostic et du pronostic de la PR.




Le dosage pour anticorps anti-CCP DIASTAT™ est un test ELISA ayant pour base la détection d'auto-anticorps dirigés contre le peptide de synthèse cyclique contenant des résidus d'arginine modifiée dans le sérum ou le plasma humain. Le test constitue un outil supplémentaire pour diagnostiquer la PR chez les patients et pour les traiter.

PRINCIPE DU DOSAGE

Les cupules des bandes de microtitrage sont enduites avec un peptide cyclique de synthèse hautement purifié contenant des résidus d'arginine modifiée. Durant la première incubation, les auto-anticorps qui se trouvent dans le sérum ou plasma dilué se fixent à la surface enduite d'antigène. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les constituants non fixés. Durant la seconde incubation, le Conjugué, des anticorps monoclonaux marqués aux enzymes dirigés contre l'IgG humaine, se fixent aux auto-anticorps quelconques liés à la surface. Après un autre lavage, les auto-anticorps spécifiques sont dépistés par incubation avec le Substrat. L'addition de la Solution d'arrêt met fin à la réaction, et on obtient alors un produit final coloré. La quantité de Conjugué fixé est mesurée en unités d'absorption. Dans le protocole qualitatif, la quantité de Conjugué qui a été fixée par l'échantillon est comparée à celle qui a été fixée par le Témoin de référence. Dans le protocole semi-quantitatif, la concentration des auto-anticorps anti-CCP peut être estimée par interpolation à partir d'une courbe dose-effet basée sur les Etalons.

CONSTITUANTS DU NECESSAIRE

| | | | |
|----------|----------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Conjugué | 1 _ 15ml | Anticorps monoclonaux murins marqués à la phosphatase alcaline, et dirigés contre l'IgG humaine, Tampon Tris, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi. |
| B | Substrat | 1 _ 15ml | Mg ²⁺ , monophosphate de phénolphtaléine (MPP), solution tampon. Prêt à l'emploi. Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation. N.B. IRRITANT.  |

| | | | | |
|------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| C | Solution d'Arrêt | 1 _ 15ml | Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH >10). Prêt à l'emploi. N.B. IRRITANT. |  |
| D | Concentré tampon de lavage (16X) | 2 _ 25ml | Tampon borate, azoture de sodium à 0,8 % (p/v). Diluer avant l'emploi. N.B. NOCIF. |  |
| E | Cupules enduites de CCP et Porte-bandes | 12 bandes de microtitrage à 8 cupules | Enduites de peptide citrulliné de synthèse, dans une poche en aluminium refermable contenant un desséchant. | |
| F | Concentré de diluant pour échantillons (5X) | 1 _ 25ml | Tampon phosphate, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à 0,5 % (p/v). Diluer avant l'emploi. N.B. NOCIF. |  |
| 1-5 | Etalons anti-CCP | 5 _ 1,0ml | Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). 0, 2, 8, 30, 100U/ml. Prêt à l'emploi. | |
| 6 | Témoin de référence anti-CCP | 1 _ 1,5ml | Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi. | |
| +/- | Témoins positifs et négatifs | 1 _ 0,2ml 1 x 0,1ml | Plasma humain, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Diluer à 1 :100 avec le diluant pour échantillons dilué avant l'usage, comme pour les échantillons. | |
| | Notice incluse dans le conditionnement | | | |

CONSERVATION DES REACTIFS

Stabilité du Nécessaire déjà ouvert

Un nécessaire a été ouvert et réutilisé en trois occasions sur une période de trois mois, et cela n'a pas affecté sa performance.

Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2-8°C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les nécessaires.
4. Diluer le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant pour échantillons et les Témoins négatifs et positifs avant l'emploi. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le tampon de lavage dilué et le Diluant dilué pour échantillons restent stables pendant un maximum de 6 mois à 2-8°C si toute contamination microbienne est évitée.
6. Remettre les bandes de microtitrage inutilisées dans la poche en aluminium avec le desséchant et les conserver à 2-8°C jusqu'au moment où on en aura besoin.
7. Ne pas exposer le Substrat à la lumière durant la conservation.
8. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.

Indications d'une détérioration

Le Substrat doit être d'une couleur jaune pâle. Une couleur rose indique qu'il y a eu contamination et le réactif doit alors être jeté. Un trouble ou une précipitation dans n'importe quel constituant indique qu'il y a eu détérioration et le constituant doit être jeté.

Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage est recommandé pour des échantillons de sérum ou de plasma (à l'EDTA, l'héparine au lithium ou au citrate de sodium); ne pas utiliser d'échantillons très hémolysés ou troubles. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons peuvent être conservés non dilués à 2-8°C pendant quatre semaines ; pour les garder plus longtemps, les conserver à -20°C. Les échantillons dilués à raison de 1:100 dans du diluant dilué pour échantillons doivent être utilisés le jour où ils ont été dilués.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Réservé à l'usage diagnostique in vitro.

Précautions de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. Les Etalons et les Témoins contiennent du plasma humain testé avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'AgHBs, l'ARN VIH-1 ou l'Ag VIH-1 et pour les anticorps anti-VHC et anti-VIH-1/VIH-2, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Etant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si les Etalons et les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance pouvant être biologiquement dangereuse. Le Manuel de Santé du Centre épidémiologique/des Instituts nationaux de la santé (CDC/NIH), intitulé "Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux", quatrième édition, mai 1999, décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux Etats-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toute éruption cutanée, coupure, abrasion et autre lésion cutanée de manière adéquate.
6. Les Etalons, Témoins, Conjugué, Concentré diluant pour échantillons et Concentré tampon de lavage contiennent tous de l'azoture de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.
7. La Solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Eviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Disperser tout déversement avec de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, irriguer avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès d'Axis-Shield Diagnostics.

**C SOLUTION D'ARRET**

Irritant

R36/38: Irritant pour les yeux et la peau.

S23: Ne pas respirer les vapeurs.

S25: Eviter le contact avec les yeux.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

**D TAMPON DE LAVAGE (16X)**

Nocif

R22: Nocif en cas d'ingestion.

R32: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

R52/53: Nocif pour les organismes aquatiques ; peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

S23: Ne pas respirer les vapeurs.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S28:Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec eau.

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S46: En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

S60: Éliminer le produit et son récipient comme un *déchet dangereux*.

S61: Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité

B SUBSTRAT

Irritant

R36: Irritant pour les yeux.

S23: Ne pas respirer les vapeurs.

S25: Eviter le contact avec les yeux.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

F CONCENTRE DILUANT POUR ECHANTILLONS (5X)

Nocif

R22: Nocif en cas d'ingestion.

R32: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

R36: Irritant pour les yeux.

R52/53 : Nocif pour les organismes aquatiques ; peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

S23: Ne pas respirer les vapeurs.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S28:Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec eau.

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S46: En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

S60: Éliminer le produit et son récipient comme un *déchet dangereux*.

S61: Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité

P R E P A R A T I O N**Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire**

1. Lecteur de plaque/bande à 96 cupules, avec filtre de 550nm (540-565nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10µl, 100µl, 1ml. Pipette automatique pour distribuer 100µl. Pipette automatique pour distribuer 200µl pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Epprouvettes graduées en verre/matière plastique : 1_100ml, 1_400ml.
4. Récipients contenant 1ml.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation pour le dosage

Attendre 30 à 60 minutes pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18-25°C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

Ne pas diluer le Témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

| Réactif | Volume | Ajouter |
|-------------------------------------------|----------|----------------------------------------|
| Concentré tampon de lavage | 1 flacon | 375ml d'eau distillée/désionisée |
| Concentré de diluant pour échantillons | 1 flacon | 100ml d'eau distillée/désionisée |
| Témoins positifs et négatifs/échantillons | 10µl | 1ml de diluant dilué pour échantillons |

Calculer le nombre de bandes de microtitrage requises pour le dosage en cours, et les placer dans le porte-bandes de microtitrage. Remettre les bandes inutilisées dans la poche en aluminium refermable avec le desséchant et conserver à 2-8°C jusqu'à ce que l'on en ait besoin. S'assurer que toutes les bandes soient bien installées dans le support de bandes de microtitrage. Il se peut que les utilisateurs veuillent numéroter chaque bande le long de la bordure supérieure pour aider à les identifier. Garder le support de bandes de microtitrage pour le réutiliser par la suite.

PROTOCOLE DU DOSAGE

Protocole qualitatif : analyser le Témoin de référence, les Témoins positifs et négatifs et les échantillons.

Protocole semi-quantitatif : analyser les Etalons (1-5), les Témoins positifs et négatifs, et les échantillons.

1. Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
2. Avec une pipette, prélever 100µl du Témoin de référence/des Etalons, en double exemplaire, des témoins positifs et négatifs et des échantillons du patient prédilué, puis déposer dans les cupules appropriées. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette pour chaque addition. Cette étape ne doit pas prendre plus de 15 minutes pour n'importe quel groupe d'Etalons/Témoins/échantillons.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25°C.
4. Décanter le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
5. Laver les cupules **trois fois** avec un minimum de 200µl de Tampon de lavage dilué. **Décanter et éponger après chaque étape du lavage.**
6. Ajouter 100µl de conjugué dans chaque cupule.
7. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter 100µl de Substrat dans chaque cupule.
10. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C. **Ne pas décanter.**
11. Ajouter 100µl de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
12. Lire les résultats indiqués sur les bandes d'ici 24 heures à 550nm (540-565nm).

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.

Protocole qualitatif

Calculer le coefficient d'absorption (densité optique) pour les Témoins positifs et négatifs, et pour chaque échantillon.

$$\text{Coefficient d'absorption} = \frac{\text{Valeur d'absorption de l'échantillon ou du Témoin}}{\text{Valeur d'absorption moyenne du Témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer une valeur seuil entre les échantillons positifs et négatifs qui est spécifique de leurs populations de patients. Les résultats obtenus des populations de patients utilisées dans l'essai clinique Axis-Shield suggèrent la valeur seuil suivante :

| <u>Coefficient d'absorption</u> | <u>Interprétation des résultats</u> |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| <0,95 | Négatif |
| ≥0,95 à ≤1,0 | Valeur limite - il est recommandé de refaire le test |
| >1,0 | Positif |

Protocole semi-quantitatif

Sur du papier millimétré, tracer la valeur d'absorption de chaque Etalon en fonction de la concentration Etalon log₁₀ (voir tableau ci-dessous). Les concentrations des Témoins et des échantillons peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage ; à titre de référence, une courbe type est illustrée ci-dessous, mais elle ne doit pas être utilisée pour interpréter les résultats. Des ajustements de courbe par logistique pondérée à 4 paramètres (4PL), parlogistique pondérée à 5 paramètres (5PL), spline, log/logit et lin/linit sont aussi satisfaisants.

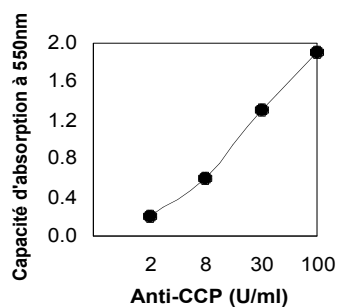
Les échantillons dont l'absorption est supérieure à l'Etalon 5 (100U/ml) dépassent les limites du dosage, et ils doivent être considérés comme >100U/ml, être dilués et re-analysés, en apportant la rectification nécessaire pour cet autre facteur de dilution.

NB: Comme avec tout dosage mesurant des anticorps, ce dosage détermine l'activité de l'anticorps présent dans l'échantillon, et non la concentration. L'activité peut être affectée par plusieurs paramètres, parmi lesquels l'avidité des anticorps.

Concentrations des étalons

| Numéro de l'Étalon | Concentration U/ml |
|--------------------|--------------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 2 |
| 3 | 8 |
| 4 | 30 |
| 5 | 100 |

Courbe d'étalonnage type



CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte.

Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Section sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre. Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Il est recommandé que les témoins positifs et négatifs prédilués soient analysés en double exemplaire dans tous les dosages afin de contrôler la qualité de la méthode de test. Analyser le Témoin de référence prêt à l'emploi en deux exemplaires dans tous les dosages qualitatifs.

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications du coefficient des Témoins indiquées ci-dessous, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température -20°C, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Les agents de conservation tels que l'azoture de sodium à 0,1 % (p/v) n'affecteront pas les résultats obtenus avec les échantillons.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne reflèteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

Spécifications des coefficients des Témoins

| Protocole | Spécifications |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Qualitatif (coefficients) | $\frac{\text{Absorption du Témoin positif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}}$ voir étiquette du Témoin positif |
| | $\frac{\text{Absorption du Témoin négatif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}} < 0,95$ |
| Semi-Quantitatif | Se référer à l'étiquette du Témoin positif pour les limites attendues acceptables (U/ml) |
| | Concentration du Témoin négatif <2U/ml |

VALEURS ATTENDUES

200 échantillons sériques de donneurs apparemment en bonne santé, dont l'âge variait entre 18 et 72 ans, en nombres plus ou moins égaux d'hommes [n=105] et de femmes [n=95], ont été testés avec le test ELISA anti-CCP DIASTAT™.

Aucune différence pouvant être attribuée au genre ou à l'âge n'a été observée (calculée en comparant la tranche d'âge comprise entre ≤40 ans [n=115] et >40 ans [n=85]).

La moyenne générale de la concentration en auto-anticorps anti-CCP chez cette population était de $0,63 \pm 0,419$ U/ml (limites: 0,05-3,8U/ml).

En fonction des résultats de cette population témoin et de ceux d'une population clinique, la valeur seuil suggérée pour le dosage est de :-

Limites de référence
≤5U/ml = Résultat négatif
>5U/ml = Résultat positif

Ces limites de référence sont suggérées à titre de guide seulement, chaque laboratoire devant établir des limites de référence qui sont appropriées à leurs populations de patients et à leur pratique clinique. Veuillez noter que la polyarthrite rhumatoïde est deux fois plus prévalente chez les femmes que chez les hommes.

DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE

Sensibilité clinique dans les cas de PR établie cliniquement

Les résultats relatifs à la sensibilité clinique pour le test ELISA anti-CCP DIASTAT™ étaient calculés sous forme de pourcentage des sérums positifs pour PR établie cliniquement dans le dosage anti-CCP. La PR établie cliniquement était diagnostiquée suivant les critères du Collège de rhumatologie américain (ACR). Les résultats collationnés obtenus de quatre sites sont indiqués ci-dessous. La sensibilité clinique correspondante de l'IgM du FR déterminée avec un test vendu dans le commerce dans deux des sites est également indiquée ci-dessous.

| Site | PR établie PR (n) | Anti-CCP Positif (n) | Sensibilité clinique | PR établie RA (n) | IgM FR Positif (n) | Sensibilité clinique |
|--------------|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------|
| RU | 283 | 220 | 78 % | 283 | 208 | 74 % |
| RU | 100 | 75 | 75 % | 100 | 95 | 95 % |
| Europe | 100 | 78 | 78 % | - | - | - |
| Etats-Unis | 92 | 81 | 88 % | - | - | - |
| Total | 575 | 454 | 79 % | 383 | 303 | 79 % |

- Non testé

Spécificité clinique dans les états pathologiques sans PR et asymptomatiques

La spécificité clinique du test ELISA Anti-CCP DIASTAT™ a été obtenue en calculant le pourcentage de sérums négatifs provenant de patients avec un état pathologique sans PR obtenus avec le dosage anti-CCP. Les résultats collationnés dans cinq sites pour maladie sans PR et de quatre sites pour les cas asymptomatiques sont indiqués ci-dessous.

| Etats pathologiques sans PR | n | Anti-CCP négatif (n) | Spécificité clinique |
|-----------------------------------------|--------------|----------------------|----------------------|
| Lupus érythémateux aigu disséminé | 227 | 209 | 92 % |
| Sclérodermie | 92 | 86 | 93 % |
| Polymyosite | 21 | 21 | 100 % |
| Syndrome de Sjögren | 86 | 85 | 99 % |
| Arthrose | 66 | 59 | 89 % |
| Rhumatisme psoriasique | 49 | 48 | 98 % |
| PR réactive | 40 | 38 | 95 % |
| Pseudopolyarthrite rhizomélisque | 38 | 36 | 95 % |
| Fibromyalgie | 21 | 21 | 100 % |
| Sinovite précoce | 6 | 5 | 83 % |
| Syndrome de Reiters | 18 | 18 | 100 % |
| Sarcoïdose | 4 | 4 | 100 % |
| Arthropathie inflammatoire séronégative | 13 | 10 | 77 % |
| Colite ulcéreuse | 40 | 39 | 98 % |
| Maladie de Crohn | 43 | 43 | 100 % |
| Thyroïdite auto-immune | 50 | 50 | 100 % |
| Maladie de Lyme | 45 | 44 | 98 % |
| CREST | 22 | 22 | 100 % |
| PR juvénile | 9 | 8 | 89 % |
| Mononucléose infectieuse | 118 | 116 | 98 % |
| Parvovirus | 11 | 11 | 100 % |
| Vasculite | 23 | 22 | 96 % |
| Goutte | 11 | 11 | 100 % |
| Dermato-myosite | 10 | 10 | 100 % |
| Spondylarthrite ankylosante | 30 | 30 | 100 % |
| Totaux | 1.093 | 1.043 | 95,4 % |

| Asymptomatiques | n | Anti-CCP Négatif (n) | Spécificité clinique |
|-----------------|------------|----------------------|----------------------|
| Totaux | 334 | 334 | 100 % |

Spécificité de l'anti-CCP et IgM FR

Les taux d'IgM du FR et d'auto-anticorps anti-CCP ont été mesurés dans des groupes sans PR dans trois sites. Les résultats provenant de tous les sites ont été collationnés ci-dessous. Tous les résultats de l'IgM du FR incertains ont été exclus.

| Maladie | n | Anti-CCP | | IgM FR | |
|-----------------------------------|------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| | | Négatif n | Spécificité clinique | Négatif n | Spécificité clinique |
| Lupus érythémateux aigu disséminé | 147 | 128 | 87 % | 79 | 54 % |
| Syndrome de Sjögren | 50 | 49 | 98 % | 11 | 22 % |
| Sclérodermie | 53 | 48 | 91 % | 14 | 26 % |
| Polymyosite | 15 | 15 | 100 % | 11 | 73 % |
| Arthrose | 31 | 26 | 84 % | 20 | 65 % |
| Thyroïdite auto-immune | 35 | 35 | 100 % | 25 | 71 % |
| Maladie de Lyme | 36 | 36 | 100 % | 26 | 72 % |
| Mononucléose infectieuse | 39 | 38 | 97 % | 11 | 28 % |
| Totaux | 406 | 375 | 92 % | 197 | 49 % |

| Asymptomatiques | n | Anti-CCP | | IgM FR | |
|-----------------|------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| | | Négatif n | Spécificité clinique | Négatif n | Spécificité clinique |
| Totaux | 196 | 196 | 100 % | 158 | 81 % |

Accord avec l'IgM du Facteur rhumatoïde

La performance du test ELISA anti-CCP DIASTAT™ a été comparée à celle d'un test ELISA vendu dans le commerce pour la mesure de l'IgM du facteur rhumatoïde chez une population asymptomatique [n=196] et chez une population de cas de PR établie cliniquement [n=504].

| | | ELISA pour IgM FR | |
|------------------------------------------|---|----------------------|-----|
| | | + | - |
| ELISA anti-CCP DIASTAT™ | + | 0 | 0 |
| | - | 37 | 159 |
| Overall Accord général = 81 % n = 196 | | | |

| | | ELISA pour IgM FR | |
|----------------------------------|---|----------------------|----|
| | | + | - |
| ELISA ANTI-CCP DIASTAT™ | + | 365 | 33 |
| | - | 48 | 58 |
| Accord général = 84 % n = 504 | | | |

Caractéristiques de la dilution

Cinq dilutions de deux échantillons de patients ont été analysées avec deux lots de nécessaires. Le tableau suivant indique les valeurs moyennes obtenues et le pourcentage récupéré rectifié en fonction de la dilution.

| Echantillon | Dilution | Valeur moyenne U/ml | % récupéré rectifié en fonction de la dilution |
|-------------|----------|---------------------|------------------------------------------------|
| 1 | 1/100 | 66,6 | 100 |
| | 1/200 | 33,9 | 104 |
| | 1/400 | 17,9 | 113 |
| | 1/800 | 9,4 | 118 |
| | 1/1600 | 4,0 | 101 |
| 2 | 1/100 | 62,9 | 100 |
| | 1/200 | 31,1 | 101 |
| | 1/400 | 14,4 | 94 |
| | 1/800 | 7,4 | 97 |
| | 1/1600 | 3,2 | 84 |
| 3 | 1/100 | 77,8 | 100 |
| | 1/200 | 35,0 | 88 |
| | 1/400 | 16,0 | 82 |
| | 1/800 | 9,0 | 94 |
| | 1/1600 | 4,2 | 88 |

Imprécision

- Imprécision inter-dosages** déterminée en testant quatre témoins dans 25 dosages (n=4), en utilisant cinq laborantins et trois lots de nécessaires.

| Témoin | Valeur moyenne U/ml | Carré moyenne de la racine %CV |
|--------|---------------------|--------------------------------|
| 1 | 5,4 | 7,6 |
| 2 | 15,5 | 10,5 |
| 3 | 22,4 | 8,7 |
| 4 | 34,1 | 9,7 |

Le %CV pour chaque témoin était compris entre 1,8 et 16,3 % (QC1), 1,2 – 20,3 (QC2), 1,4 – 15,5 % (QC3) et 3,2 – 14,9 % (QC4). Cet éventail reflète le nombre de laborantins [n=5] et de lots de nécessaires [n=3] utilisés dans cette étude.

- Imprécision inter-dosages** déterminée en testant quatre témoins dans 25 dosages (n=4), en utilisant cinq laborantins et trois lots de nécessaires.

| Témoin | Valeur moyenne U/ml | ET | %CV |
|--------|---------------------|------|------|
| 1 | 5,4 | 0,74 | 13,6 |
| 2 | 15,5 | 1,71 | 11,0 |
| 3 | 22,4 | 2,76 | 12,4 |
| 4 | 34,1 | 2,56 | 7,6 |

Limite inférieure de détection

La limite inférieure de détection, calculée comme la moyenne de l'étalon zéro plus deux écart-types, après analyse en double exemplaire dans 12 dosages provenant de trois lots de nécessaires, était de 0,05U/ml.

Interférences

Une quantité maximale de 400mg/dl d'hémoglobine, de 0,2mg/ml de bilirubine, de 15mg/ml d'intralipides et de 200UI/ml de facteur rhumatoïde n'interfèrent pas avec les résultats des tests pour auto-anticorps anti-CCP.

RESTRICTIONS D'UTILISATION

1. Bien que la présence d'anticorps dirigés contre les CCP soit associée à la polyarthrite rhumatoïde, elle ne permet pas à elle seule de prononcer son diagnostic. Les données doivent être considérées en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques.
2. Chez certains individus, il peut y avoir des taux élevés d'anticorps anti-CCP mais peu ou pas de preuves d'une affection clinique. Par contre, il se peut que des patients avec une maladie évolutive aient des taux indétectables de ces anticorps. Actuellement, l'importance clinique de cette information n'est pas évidente.
3. Etant donné que le résultat d'un dosage des anticorps anti-CCP ne peut pas constituer une preuve diagnostique de la présence ou de l'absence d'une affection clinique, ne jamais instaurer un traitement en ne se basant que sur un résultat positif au test de détection des anticorps anti-CCP.
4. L'instauration ou la modification d'un traitement ne doit pas reposer uniquement sur une variation du taux d'auto-anticorps anti-CCP mais plutôt sur l'observation ou les observations clinique(s).
5. L'efficacité clinique du contrôle des taux d'auto-anticorps anti-CCP en tant qu'indication de l'évolution/rémission de la polyarthrite rhumatoïde n'a pas encore été entièrement définie.
6. La valeur du taux d'auto-anticorps anti-CCP dans l'arthrose juvénile n'a pas été déterminée.
7. En raison des caractéristiques spécifiques des interactions antigène/anticorps, ce n'est pas la concentration de l'anticorps qui est déterminée mais son activité. Puisque le sérum des patients contient des populations d'anticorps hétérogènes, il se peut que certains échantillons présentent une non linéarité, surtout à de très fortes dilutions des échantillons.

REFERENCES

1. Gough AKS, et al. *Lancet*, **344**, 23-27, 1994.
2. Smolen JS. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis (Section C). In *Manual of Biological Markers of Disease* (Eds. van Venrooij WJ, Maini RN), Kluwer Academic Publishers, 1996.
3. Barland P and Lipstein E. *Am J Med*, **100 (Suppl 2A)**, 16S-32S, 1996.
4. Nakamura RM. *J Clin Lab Immunol*, **14**, 305-313, 2000.
5. Simon M, et al. *J Clin Invest*, **92**, 1387-1393, 1993.
6. Sebbag M, et al. *J Clin Invest*, **95**, 2672-2679, 1995.
7. Girbal-Neuhauser E, et al. *J Rheum*, **162**, 585-594, 1999.
8. Schellekens GA et al. *J Clin Invest*, **101**, 273-281, 1998.
9. Schellekens GA et al. *Arthritis Rheum*, **43(1)**, 155-163, 2000.
10. van Boekel MAM, et al. *Arthritis Res*, **4**, 87-93, 2002.

RESUME DU PROTOCOLE

1. Diluer les échantillons et les Témoins positifs et négatifs à raison de 1:100. Ne pas diluer les Etalons ou le Témoin de référence.
2. Ajouter 100µl de Témoin de référence/Etalons en double exemplaire, de Témoins positifs et négatifs et d'échantillons prédilués dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25°C.
4. Laver les bandes 3 fois.
5. Ajouter 100µl de Conjugué dans chaque cupule.
6. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
7. Laver les bandes 3 fois.
8. Ajouter 100µl de Substrat dans chaque cupule.
9. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
10. Ajouter 100µl de Solution d'arrêt dans chaque cupule.
11. Lire la capacité d'absorption à 550nm.

La prueba Anti-PCC DIASTAT™ es un análisis inmunosorbente con anticuerpo ligado a enzima (ELISA) semicuantitativo/cualitativo para la detección de autoanticuerpos tipo IgG específicos a péptidos citrulinados cíclicos (PCC) en suero o plasma (tipo EDTA, heparina de litio o citrato de sodio) humano. Se utiliza como ayuda para el diagnóstico de Artritis Reumatoide (AR) y no es definitiva por sí sola. Los niveles de autoanticuerpos representan un parámetro de un proceso diagnóstico de múltiples criterios, que abarca valoraciones tanto clínicas como de laboratorio.

INTRODUCCIÓN



La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica de origen multifuncional que está caracterizada por la inflamación de las membranas que recubren las articulaciones. La enfermedad se propaga de las articulaciones pequeñas a las grandes, produciendo los daños más severos en la fase precoz¹. El diagnóstico de AR se basa, fundamentalmente, en características clínicas, radiológicas e inmunológicas. La prueba serológica más frecuente es la medición del factor reumatoide (FR). La presencia del FR es uno de los criterios del Colegio Americano de Reumatología para la clasificación de la AR. El más común es el tipo IgM, que se halla en un 60-80 % de los pacientes con AR. El FR no es específico de la AR, ya que está presente, con frecuencia, en individuos sanos y en pacientes con otras enfermedades autoinmunes e infecciones crónicas². Se ha señalado que hasta un 30 % de los pacientes con LES y sin evidencia de AR tiene un FR positivo³. A pesar de su escasa especificidad, el FR positivo se considera un predictor importante del resultado en la AR. Durante varios años, se ha reconocido que los anticuerpos al factor anti-perinuclear (FAP) y la queratina (AKA) son muy específicos para la AR. Los anticuerpos al FAP y al AKA se han detectado mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando epitelio bucal o esófago de rata⁴. La carencia de disponibilidad de donantes adecuados de células bucales ha limitado el uso del FAP como prueba rutinaria de laboratorio. Se ha identificado recientemente el antígeno de estos dos anticuerpos como filagrina epidérmica, una proteína intermedia asociada a filamentos e implicada en la cornificación de la epidermis^{5,6}. La profilagrina, que está presente en los gránulos de queratohialina de las células de la mucosa bucal humana, se enclava proteolíticamente en subunidades de filagrina durante la diferenciación celular. En esta etapa, la proteína se desfosforiliza y algunos residuos de arginina son transformados en citrulina por la enzima peptidilarginina desaminasa (PAD)⁷. En 1998, Schellekens y cols. señalaron que los autoanticuerpos que reaccionan con péptidos sintéticos lineares que contienen el poco frecuente aminoácido citrulina estaban presentes en un 76 % del suero AR con una especificidad para la AR del 96 %. Los anticuerpos de pacientes con AR que reconocieron la citrulina que contenía epítopes eran, básicamente, del tipo IgG y presentaban una afinidad relativamente elevada⁸. En un informe posterior, Schellekens y cols. señalaron que una prueba ELISA basada en péptido citrulinado cíclico (PCC) mostraba mejores características de rendimiento que la versión lineal para la detección de anticuerpos a la AR⁹. Muy recientemente, se ha señalado que, en principio, la mayor parte de los péptidos/proteínas citrulinadas son reconocidos por autoanticuerpos en suero AR, aunque con diferentes sensibilidades y especificidades¹⁰. Estos hallazgos sugieren un papel importante para los antígenos citrulinados en el diagnóstico de la AR.



El análisis anti-PCC DIASTAT™ es un ELISA basado en la detección de autoanticuerpos en suero o plasma humano a un péptido cíclico sintético que contiene residuos de arginina modificada. La prueba proporciona una herramienta adicional para el diagnóstico de pacientes con AR.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los vasos de las bandas de microtitulación se recubren con un péptido cíclico sintético altamente purificado que contiene residuos de arginina modificada. Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos en suero o plasma diluido se fijan a la superficie recubierta con antígeno. A continuación se lavan los vasos para eliminar los componentes no fijados. En la segunda incubación, el Conjugado, un anticuerpo monoclonal marcado con enzima a IgG humanos, se fija a cualquier autoanticuerpo fijado a la superficie. Después de otro lavado, se determinan los autoanticuerpos específicos mediante la incubación con el Substrato. El añadido de la Solución de Parada finaliza la reacción, produciendo un producto final coloreado. La cantidad de Conjugado fijado se mide en unidades de absorbencia. En el protocolo cualitativo, la cantidad de Conjugado fijado por la muestra se compara con la fijada por el Control de Referencia. En el protocolo semicuantitativo, la concentración de autoanticuerpo anti-PCC puede calcularse por interpolación a partir de una curva dosis-respuesta basada en los Estándares.

COMPONENTES DEL KIT

| | | | | |
|----------|--------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Conjugado | 1 _ 15 ml | Anticuerpo monoclonal de murina marcado con fosfatasa alcalina a IgG humana, búfer Tris, estabilizador de proteínas, <0,1 % (c/v) azida sódica. Listo para su uso. | |
| B | Substrato | 1 _ 15 ml | Mg ²⁺ , monofosfato de fenoltaleína (PMP), solución de búfer. Listo para su uso. No exponer a la luz durante el almacenamiento. NOTA. IRRITANTE |  |
| C | Solución de Parada | 1 _ 15 ml | Hidróxido de sodio, EDTA, búfer carbonatado (pH >10). Listo para su uso. NOTA. IRRITANTE. |  |

| | | | | |
|------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| D | Concentrado de Búfer de Lavado (16X) | 2 _ 25 ml | Búfer boratado, 0,8 % (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar. NOTA. NOCIVO. |  |
| E | Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con PCC | 12 _ 8 bandas de microtitulación de vasos | Recubierto con péptido citrulinado sintético, en un paquete metalizado y resellable, con desecante. | |
| F | Concentrado de Diluyente de Muestra (5X) | 1 _ 25 ml | Búfer fosfatado, estabilizador de proteínas, 0,5 % (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar. NOTA. NOCIVO |  |
| 1-5 | Estándares anti-PCC | 5 _ 1,0 ml | Plasma humano, búfer, <0,1 % (c/v) azida sódica. 0, 2, 8, 30, 100 U/ml. Listo para su uso. | |
| 6 | Control de referencia anti-PCC | 1 _ 1,5 ml | Plasma humano, búfer, <0,1 % (c/v) azida sódica. Listo para su uso. | |
| +/- | Controles Positivos y Negativos | 1 _ 0,2 ml 1 x 0,1 ml | Plasma humano, <0,1 % (c/v) azida sódica. Diluir 1:100 con Diluyente de Muestra de iluido antes de su uso, por lo que respecta a las muestras. | |
| | Folleto del Paquete | | | |

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Estabilidad del Kit Una Vez Abierto

Un kit fue abierto y reutilizado en tres ocasiones durante un período de tres meses sin efectos adversos sobre su eficacia.

Notas sobre la Manipulación y los Procedimientos

1. Guardar los componentes del kit a 2-8° C y utilizar hasta la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas. No utilizar reactivos caducados.
2. No mezclar números de lote diferentes.
3. No congelar los kits.
4. El Concentrado de Búfer de Lavado, el Concentrado de Diluyente de Muestra y los Controles Positivos y Negativos deben diluirse antes de su utilización. Todo el resto de reactivos están listos para ser usados.
5. El Búfer de Lavado diluido y el Diluyente de Muestra diluido son estables a 2-8° C durante 6 meses si se evita la contaminación microbiana.
6. Mantener las bandas de microtitulación sobrantes en el paquete metálico con desecante a 2-8° C, hasta su reutilización.
7. No exponer el Substrato a la luz durante el almacenamiento.
8. Evitar la contaminación de reactivos. Utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada manipulación de muestra o reactivo.

Signos de Deterioro

El Substrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo. La turbiedad o precipitación en cualquier componente indica deterioro y hay que desechar el componente.

Recogida y Almacenamiento de Muestras

El análisis está recomendado para muestras de suero o plasma (EDTA, litio heparina o citrado de sodio); no utilizar muestras turbias ni muy hemolizadas. Mezclar minuciosamente las muestras descongeladas antes del análisis y no volver a congelar/descongelar. No calentar las muestras inactivadas, ya que esto podría producir resultados falsos positivos.

Las muestras pueden guardarse sin diluir a 2-8° C durante cuatro semanas; para períodos de tiempo más prolongados, guardar a -20° C. Las muestras diluidas a 1:100 en Diluyentes de Muestra diluido deben utilizarse el mismo día de su disolución.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Únicamente para uso diagnóstico in vitro.

Precauciones de Seguridad

1. Siga estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente las relativas a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Los Estándares y los Controles contienen plasma humano comprobado mediante análisis aprobados por la FDA para el HbsAg, el antígeno del VIH-1 o el RNA del VIH-1, los anticuerpos antiVHC y antiVIH-1/VIH-2, cuyos resultados han sido no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece una garantía total de que no estén presentes agentes infecciosos, hay que considerar los Estándares y los Controles como potencialmente infecciosos y manipularlos con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. El Manual de Salud CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4^a edición, mayo 1999, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
3. No pipetar con la boca.
4. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
5. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes y abrasiones de la piel así como otras lesiones dermatológicas.
6. Los Estándares, los Controles, el Conjugado, el Concentrado de Diluyente de Muestra y el Concentrado de Búfer de Lavado contienen azida sódica que puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas extremadamente explosivas. Para su eliminación, verter con grandes cantidades de agua con el fin de prevenir la formación de azida.
7. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si se produce contacto con piel u ojos, lavar con agua y acudir inmediatamente a un médico.
8. Pueden solicitarse a Axis-Shield Diagnostics las hojas de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.

**C SOLUCIÓN DE PARADA**

Irritante

R36/38: Irrita los ojos y la piel.

S23: No respirar los humos.

S25: Evítase el contacto con los ojos.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos / la cara.

**D CONCENTRADO DE BÚFER DE LAVADO (16X)**

Nocivo

R22: Nocivo por ingestión.

R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

R52/53: Nocivo para los organismos acuáticos; puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

S23: No respirar los humos.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S28: En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos / la cara.

S46: En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.

S60: Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

S61: Evítase su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

B SUBSTRATO

Irritante

R36: Irrita los ojos.

S23: No respirar los humos.

S25: Evítase el contacto con los ojos.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos / la cara.

F CONCENTRADO DE DILUENTE DE MUESTRA (5X)

Nocivo

R22: Nocivo por ingestión.

R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

R36: Irrita los ojos.

R52/53: Nocivo para los organismos acuáticos; puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

S23: No respirar los humos.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S28: En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos / la cara.

S46: En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.

S60: Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

S61: Evítase su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

P R E P A R A C I Ó N**Materiales/Equipos Necesarios No Suministrados**

1. Lector de banda/placa de vasos 96 con filtro 550 nm (es aceptable 540-565 nm).
2. Pipetas de precisión para dispensar 10 µl, 100 µl, 1 ml. Pipeta automática para dispensar 100 µl. Pipeta automática para dispensar 200 µl para el lavado manual; lavador automático de placa opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1_100 ml, 1_400 ml.
4. Recipientes con volumen 1 ml.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallitas de papel.
7. Cronómetro para intervalos de 30 y 60 minutos.

Preparativos para el Análisis

Dejar que todos los componentes del kit, incluidas las bandas de microtitulación, se templen a 18-25° C durante 30-60 minutos antes de su utilización. Mezclar los reactivos mediante una suave inversión.

No diluir el Control de Referencia.

Diluir los siguientes reactivos y mezclar minuciosamente.

| Reactivo | Volumen | Añadir |
|------------------------------------------|---------|--------------------------------------|
| Concentrado de Búfer de Lavado | 1 vial | 375 ml de agua destilada/desionizada |
| Concentrado de Diluyente de Muestra | 1 vial | 100 ml de agua destilada/desionizada |
| Muestras/Controles Positivos y Negativos | 10 µl | 1 ml de Diluyente de Muestra diluido |

Calcular el número de bandas de microtitulación necesarias para el análisis actual y sujetarlas en el soporte de bandas de microtitulación. Volver a colocar las bandas sobrantes en el paquete metalizado resellable con el desecante y guardar a 2-8° C hasta su reutilización. Verificar que todas las bandas están firmemente sujetas en el soporte para bandas de microtitulación. Los usuarios pueden desear numerar cada banda a lo largo del borde superior para favorecer la identificación. Conservar el soporte de bandas de microtitulación para su uso posterior.

P R O T O C O L O D E L A N Á L I S I S

Protocolo cualitativo: Realizar el Control de Referencia, los Controles Positivos y Negativos y las muestras.

Protocolo semicuantitativo: Realizar los Estándares (1-5), los Controles Positivos y Negativos y las muestras.

1. Vasos de referencia para identificación.
2. Pipetar 100 µl del Control/Estándares por duplicado, los Controles Negativos y Positivos prediluidos(1:100), y las muestras de pacientes prediluidas (1:100) en los vasos correspondientes. No olvide cambiar las puntas de las pipetas entre añadidos. Esta fase no debe durar más de 15 minutos para ningún conjunto de Estándares/Controles/muestras.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Decantar el contenido de la banda mediante inversión rápida sobre un lavabo adecuado para la eliminación de materiales biológicos, teniendo presente el potencial riesgo infeccioso de las muestras. Secar los vasos de las bandas invertidas con toallitas de papel.
5. Lavar los vasos **tres veces** con un mínimo de 200 µl de Búfer de Lavado diluido. **Decantar y secar después de cada fase de lavado.**
6. Añadir 100 µl de Conjugado a cada vaso.
7. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
8. Repetir los pasos 4 y 5.
9. Añadir 100 µl de Substrato a cada vaso.
10. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C. **No decantar.**
11. Añadir 100 µl de Solución de Parada a cada vaso, en el mismo orden y ritmo que el Substrato. Agitar los vasos con suavidad para mezclar.
12. Leer las bandas a las 24 horas a 550 nm (540-565 nm).

C Á L C U L O E I N T E R P R E T A C I Ó N D E L O S R E S U L T A D O S

Considerar cada análisis de forma independiente a la hora de calcular e interpretar los resultados.

Protocolo Cualitativo

Calcular el valor de la tasa de absorbencia (densidad óptica) para los Controles Positivos y Negativos así como para cada muestra.

$$\text{Tasa de Absorbencia} = \frac{\text{Muestra o Valor de Absorbencia del Control}}{\text{Valor de Absorbencia del Control de Referencia promedio}}$$

Los usuarios deben calcular un límite entre las muestras positivas y negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes utilizados en la prueba clínica Axis-Shield sugieren el siguiente límite:

| <u>Tasa de Absorbencia</u> | <u>Interpretación del Resultado</u> |
|----------------------------|------------------------------------------|
| <0,95 | Negativo |
| ≥0,95 a ≤1,0 | Límite – se recomienda repetir la prueba |
| >1,0 | Positivo |

Protocolo semicuantitativo

Calcular el valor de absorbencia promedio de cada Estándar y realizar un gráfico de comparación con la concentración Estándar log₁₀ (véase siguiente tabla) en un papel cuadrículado adecuado. Posteriormente, pueden leerse las concentraciones de los Controles y las muestras a partir de la curva estándar; a continuación aparece como referencia un gráfico típico, no debe utilizarse para interpretar resultados. También resultan satisfactorios la logística de 4 parámetros (4PL) ponderada, la logística de cinco parámetros (5PL) ponderada, la curva uniforme y las curvas log/logit y lin/linit.

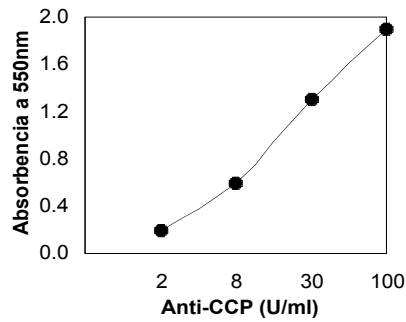
Las muestras con absorbencias superiores a la del Estándar 5 (100 U/ml) quedan fuera del rango del ensayo y deben señalarse como >100 U/ml, diluido y nuevamente analizado, con corrección de este otro factor de dilución.

NOTA: Como en todos los análisis que miden anticuerpos, este análisis determina la actividad del anticuerpo presente en la muestra, en lugar de la concentración. La actividad puede verse afectada por cierto número de parámetros, por ejemplo, la avidéz de los anticuerpos.

Concentraciones Estándar

| Número de Estándar | Concentración U/ml |
|--------------------|--------------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 2 |
| 3 | 8 |
| 4 | 30 |
| 5 | 100 |

Curva Estándar Típica



CONTROL DE CALIDAD

Comprobar que se lleva a cabo un mantenimiento y una calibración de lector de placa apropiados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que se utiliza la longitud de onda correcta.

Los usuarios deben garantizar que están totalmente familiarizados con las instrucciones para la realización del análisis, especialmente la sección de Advertencias y Precauciones y las Notas sobre Manipulación y Procedimientos. Los usuarios deben demostrar que pueden obtener especificaciones de rendimiento precisas y una gama comunicable de resultados de la prueba comparables a los determinados por el fabricante antes de comunicar resultados de pruebas en pacientes. Se recomienda que los Controles Positivos y Negativos prediluidos se realicen por duplicado en todos los ensayos para monitorizar la calidad del procedimiento de la prueba. Realizar el Control de Referencia listo para su uso por duplicado en todos los análisis Cualitativos.

Dando por sentado que se consiguen las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, el fallo de cualquier Control para satisfacer las especificaciones de la proporción de Control que aparecen a continuación invalida el análisis y no se deben comunicar los resultados del paciente. El operario puede repetir el análisis, tras haber revisado el procedimiento, o ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Para repetir el análisis, prepare una dilución nueva de cada Control y muestra. Los laboratorios pueden querer incluir controles internos en cada realización del análisis. Guardar dicho material de control a o por debajo de -20° C y evitar repetir los ciclos de congelación/descongelación. Los conservantes tales como la azida sódica a 0,1 % (c/v) no afectarán a los resultados de la muestra.

Los niveles analíticos identificados en determinadas enfermedades son los establecidos por el fabricante para poblaciones específicas y no reflejan necesariamente la literatura. Los niveles de incidencia, su relación con enfermedades específicas, los rangos de referencia y los valores límite apropiados deben calcularse para las poblaciones específicas atendidas por los usuarios.

Especificaciones de Tasa de Control

| Protocolo | Especificaciones |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cualitativo (proporciones) | $\frac{\text{Absorbancia de Control Positivo}}{\text{Absorbancia de Control de Referencia}}$ Véase etiqueta de Control Positivo |
| | $\frac{\text{Absorbancia de Control Negativo}}{\text{Absorbancia de Control de Referencia}}$ <0,95 |
| Semicuantitativo | Véase etiqueta de Control Positivo para el rango previsto aceptable (U/ml) |
| | Concentración del Control Negativo <2 U/ml |

VALORES PREVISTOS

Se analizaron 200 muestras de suero de donantes asintomáticos, aparentemente sanos, con edades comprendidas entre 18 y 72 años y con una representación similar de hombres [n=105] y mujeres [n=95], con la prueba ELISA Anti-PCC DIASTAT™.

No se observaron diferencias atribuibles al género ni a la edad (cálculos realizados comparando edades de ≤40 años [n=115] y >40 años [n=85]).

La concentración promedio de anti-PCC global para esta población fue de $0,63 \pm 0,419$ U/ml (rango 0,05-3,8 U/ml).

Basándose en los datos de esta población de referencia y los de una población clínica, el corte sugerido para el análisis es:-

Rango de la Referencia

≤5 U/ml = Negativo

>5 U/ml = Positivo

Este rango de referencia se sugiere únicamente como guía y cada laboratorio debe determinar un rango de referencia adecuado para sus poblaciones de pacientes y práctica clínica. Hay que señalar que la artritis reumatoide tiene una prevalencia casi doble en mujeres que en hombres.

DATOS SOBRE EL RENDIMIENTO

Sensibilidad Clínica en AR Confirmadas Clínicamente

Datos sobre la sensibilidad clínica para el ELISA Anti-PCC DIASTAT™ fue calculada como el porcentaje de suero con AR confirmada clínicamente, que dio un resultado positivo en el análisis anti-PCC. La AR confirmada clínicamente fue diagnosticada de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR). Los datos se obtuvieron de los cuatros centros que se mencionan a continuación. También se muestra la sensibilidad clínica correspondiente del FR IgM utilizando en dos de estos centros una prueba comercializada.

| Centro | Confirmada AR (n) | Anti-PCC Positivo (n) | Sensibilidad Clínica | Confirmada AR (n) | FR IgM Positivo (n) | Sensibilidad Clínica |
|--------------|-------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| G.B. | 283 | 220 | 78 % | 283 | 208 | 74 % |
| G.B. | 100 | 75 | 75 % | 100 | 95 | 95 % |
| Europa | 100 | 78 | 78 % | - | - | - |
| EE.UU. | 92 | 81 | 88 % | - | - | - |
| Total | 575 | 454 | 79 % | 383 | 303 | 79 % |

- No comprobado

Especificidad Clínica en Estadios de la Enfermedad No AR y Asintomáticos

La especificidad clínica para el ELISA Anti-PCC DIASTAT™ se obtuvo calculando el porcentaje de suero en estadio de la enfermedad no AR que dio un resultado negativo en el análisis anti-PCC. A continuación se muestran los datos obtenidos en cinco centros para la enfermedad no AR y en cuatro centros para asintomáticos.

| Estadios de la Enfermedad no AR | n | Anti-PCC Negativo (n) | Especificidad clínica |
|----------------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------|
| Lupus Eritematoso Sistémico | 227 | 209 | 92 % |
| Esclerodermia | 92 | 86 | 93 % |
| Polimiositis | 21 | 21 | 100 % |
| Síndrome de Sjögren | 86 | 85 | 99 % |
| Osteoartritis | 66 | 59 | 89 % |
| Artritis Psoriásica | 49 | 48 | 98 % |
| AR Reactiva | 40 | 38 | 95 % |
| Polimialgia Reumática | 38 | 36 | 95 % |
| Fibromialgia | 21 | 21 | 100 % |
| Sinovitis Temprana | 6 | 5 | 83 % |
| Síndrome de Reiter | 18 | 18 | 100 % |
| Sarcoidosis | 4 | 4 | 100 % |
| Artropatía Inflamatoria Seronegativa | 13 | 10 | 77 % |
| Colitis Ulcerosa | 40 | 39 | 98 % |
| Enfermedad de Crohn | 43 | 43 | 100 % |
| Tiroiditis Autoinmune | 50 | 50 | 100 % |
| Enfermedad de Lyme | 45 | 44 | 98 % |
| CREST | 22 | 22 | 100 % |
| AR Juvenil | 9 | 8 | 89 % |
| Mononucleosis Infecciosa | 118 | 116 | 98 % |
| Parvovirus | 11 | 11 | 100 % |
| Vasculitis | 23 | 22 | 96 % |
| Gota | 11 | 11 | 100 % |
| Dermatomiositis | 10 | 10 | 100 % |
| Espondilitis Anquilosante | 30 | 30 | 100 % |
| Totales | 1.093 | 1.043 | 95,4 % |

| Asintomáticos | n | Anti-PCC Negativo (n) | Especificidad clínica |
|----------------------|------------|------------------------------|------------------------------|
| Totales | 334 | 334 | 100 % |

Especificidad Clínica de Anti-PCC y FR IgM

Se midió el FR IgM y el anti-PCC en grupos no AR en tres centros. A continuación se muestran los datos obtenidos en todos los centros. Se han excluido todos los resultados FR IgM equívocos.

| Enfermedad | n | Anti-PCC | | FR IgM | |
|-----------------------------|------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| | | Negativo n | Especificidad Clínica | Negativo n | Especificidad Clínica |
| Lupus Eritematoso Sistémico | 147 | 128 | 87 % | 79 | 54 % |
| Síndrome de Sjögren | 50 | 49 | 98 % | 11 | 22 % |
| Esclerodermia | 53 | 48 | 91 % | 14 | 26 % |
| Polimiositis | 15 | 15 | 100 % | 11 | 73 % |
| Osteoartritis | 31 | 26 | 84 % | 20 | 65 % |
| Tiroiditis Autoinmune | 35 | 35 | 100 % | 25 | 71 % |
| Enfermedad de Lyme | 36 | 36 | 100 % | 26 | 72 % |
| Mononucleosis Infecciosa | 39 | 38 | 97 % | 11 | 28 % |
| Totales | 406 | 375 | 92 % | 197 | 49 % |

| Asintomáticos | n | Anti-PCC | | FR IgM | |
|----------------|------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| | | Negativo n | Especificidad Clínica | Negativo n | Especificidad Clínica |
| Totales | 196 | 196 | 100 % | 158 | 81 % |

Concordancia con Factor Reumatoide IgM

Se comparó el rendimiento del ELISA Anti-PCC DIASTAT™ con el de una prueba ELISA comercializada para la medición del Factor Reumatoide IgM en una población asintomática [n=196] y en una población con AR clínicamente confirmada [n=504].

| Población Asintomática | AR clínicamente confirmada | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------|--|--|---|---|-----------------------|---|---|-----------------|---|----|--|---|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------|--|--|---|---|-----------------------|---|-----|-----------------|---|----|--|---|----|
| <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td colspan="2" style="text-align: center;">ELISA FR IgM</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">ELISA Anti-PCC</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DIASTAT™</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">37</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">159</td> </tr> </table> | | ELISA FR IgM | | | + | - | ELISA Anti-PCC | + | 0 | DIASTAT™ | - | 37 | | - | 159 | <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td colspan="2" style="text-align: center;">ELISA FR IgM</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">ELISA Anti-PCC</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">365</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DIASTAT™</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">48</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">58</td> </tr> </table> | | ELISA FR IgM | | | + | - | ELISA Anti-PCC | + | 365 | DIASTAT™ | - | 48 | | - | 58 |
| | ELISA FR IgM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | + | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ELISA Anti-PCC | + | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DIASTAT™ | - | 37 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | - | 159 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ELISA FR IgM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | + | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ELISA Anti-PCC | + | 365 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DIASTAT™ | - | 48 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | - | 58 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Concordancia Global = 81 % n = 196</p> | <p>Concordancia Global = 84 % n = 504</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Características de la dilución

Se analizaron cinco diluciones de tres muestras de pacientes utilizando dos lotes de kits. Las siguientes tablas muestran los valores promedio obtenidos y el porcentaje de recuperación.

| Muestra | Dilución | Valor Promedio U/ml | Porcentaje de Recuperación % |
|---------|----------|---------------------|------------------------------|
| 1 | 1/100 | 66,6 | 100 |
| | 1/200 | 33,9 | 104 |
| | 1/400 | 17,9 | 113 |
| | 1/800 | 9,4 | 118 |
| | 1/1600 | 4,0 | 101 |
| 2 | 1/100 | 62,9 | 100 |
| | 1/200 | 31,1 | 101 |
| | 1/400 | 14,4 | 94 |
| | 1/800 | 7,4 | 97 |
| | 1/1600 | 3,2 | 84 |
| 3 | 1/100 | 77,8 | 100 |
| | 1/200 | 35,0 | 88 |
| | 1/400 | 16,0 | 82 |
| | 1/800 | 9,0 | 94 |
| | 1/1600 | 4,2 | 88 |

Imprecisión

- Imprecisión en el análisis** determinada por la comprobación de cuatro controles [n = 4], en veinticinco análisis, utilizando cinco operarios y tres lotes de kits.

| Control | Valor Promedio U/ml | %Raíz Cuadrada Promedio %CV |
|---------|---------------------|-----------------------------|
| 1 | 5,4 | 7,6 |
| 2 | 15,5 | 10,5 |
| 3 | 22,4 | 8,7 |
| 4 | 34,1 | 9,7 |

El rango del %CV para cada control fue de 1,8 – 16,3 % (QC1), 1,2 – 20,3 (QC2), 1,4 – 15,5 % (QC3) y de 3,2 – 14,9 % (QC4). Esta amplitud refleja el número de operarios [n=5] y de lotes de kits [n=3] utilizados para este estudio.

- Imprecisión entre análisis** determinada por la comprobación de cuatro controles [n = 4], en veinticinco análisis, utilizando cinco operarios y tres lotes de kits.

| Control | Valor Promedio U/ml | SD | %CV |
|---------|---------------------|------|------|
| 1 | 5,4 | 0,74 | 13,6 |
| 2 | 15,5 | 1,71 | 11,0 |
| 3 | 22,4 | 2,76 | 12,4 |
| 4 | 34,1 | 2,56 | 7,6 |

Límite de Detección Inferior

El límite de detección inferior, calculado como el promedio del estándar cero más dos desviaciones estándar, realizado por triplicado en 12 análisis a partir de tres lotes de kits fue de 0,05 U/ml.

Interferencias

La hemoglobina hasta 400 mg/dl, la bilirrubina hasta 0,2 mg/ml, los intralípidos hasta 15 mg/ml y el factor reumatoide hasta 200 IU/ml no interfieren con los resultados de los anticuerpos anti-PCC.

LIMITACIONES DE USO

1. Aunque la presencia de anticuerpos al PCC se asocia con la Artritis Reumatoide, un resultado positivo no es diagnóstico en sí mismo; hay que considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Algunas personas pueden tener niveles elevados de anticuerpos anti-PCC con escasa o ninguna evidencia de enfermedad clínica. Por el contrario, algunos pacientes con enfermedad activa pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos. El significado clínico de esta información es, en la actualidad, poco claro.
3. Ya que el resultado de un análisis anti-PCC no es una prueba diagnóstica de la presencia o ausencia de enfermedad clínica, no se debe iniciar la terapia únicamente sobre la base de un resultado anti-PCC positivo.
4. el inicio o los cambios de tratamiento no deben basarse en cambios en la concentración de autoanticuerpos anti-PCC, sino en la o las observaciones clínicas.
5. Aún no se ha definido con precisión la efectividad clínica de la monitorización de los niveles de autoanticuerpos PCC como indicación de la progresión/remisión de la Artritis Reumatoide.
6. Aún no se ha determinado el valor del anti-PCC en la artritis juvenil.
7. Debido a las características específicas de las interacciones antígeno/anticuerpo, no se determina la concentración de anticuerpos, sino su actividad. Ya que el suero de los pacientes contiene poblaciones de anticuerpos heterogéneas, algunas muestras pueden exhibir no linealidad, especialmente en muestras muy diluidas.

REFERENCIAS

1. Gough AKS, et al.. *Lancet*, **344**, 23-27, 1994.
2. Smolen JS. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis (Section C). In *Manual of Biological Markers of Disease* (Eds. van Venrooij WJ, Maini RN), Kluwer Academic Publishers, 1996.
3. Barland P and Lipstein E. *Am J Med*, **100 (Suppl 2A)**, 16S-23S, 1996.
4. Nakamura RM. *J Clin Lab Anal*, **14**, 305-313, 2000.
5. Simon M, et al. *J Clin Invest*, **92**, 1387-1393, 1993.
6. Sebbag M, et al. *J Clin Invest*, **95**, 2672-2679, 1995.
7. Girbal-Neuhauser E, et al. *J Immunol*, **162**, 585-594, 1999.
8. Schellekens GA, et al. *J Clin Invest*, **101**, 273-281, 1998.
9. Schellekens GA, et al. *Arthritis Rheum*, **43(1)**, 155-163, 2000.
10. van Boekel MAM, et al. *Arthritis Res*, **4**, 87-93, 2002.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

1. Diluir las muestras y los Controles Positivos y Negativos 1:100. No diluir los Estándares ni el Control de Referencia.
2. Añadir 100 µl de los Estándares/Control de Referencia por duplicado, las muestras y los Controles Negativos y Positivos prediluidos en los vasos referenciados de la banda de microtitulación.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Lavar las bandas 3 veces.
5. Añadir 100 µl de Substrato a cada vaso.
6. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
7. Lavar las bandas 3 veces.
8. Añadir 100 µl de Substrato a cada vaso.
9. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
10. Añadir 100 µl de Solución de Parada a cada vaso.
11. Leer la absorbencia a 550 nm.

DEUTSCH: ANWENDUNGSGEBIETE

Der DIASTAT™ Anti-CCP Test ist ein semiquantitativer/-qualitativer Enzym-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von Autoantikörpern der IgG-Klasse, die für im Humanserum oder Plasma (EDTA, Lithium-Heparin oder Natriumzitrat) vorliegendes zitruilliniertes Peptid (CCP) spezifisch sind. Der Test ist zur Unterstützung der Diagnose von Rheumatoïdarthritis (RA) bestimmt und ist isoliert betrachtet nicht maßgeblich. Die Autoantikörperspiegel stellen jedoch nur einen Parameter in einem sich aus vielen Kriterien zusammensetzenden diagnostischen Prozess dar, der sowohl klinische als auch Laborbeurteilungen einschließt.

EINLEITUNG


Rheumatoïdarthritis (RA) ist eine systemische Autoimmunkrankheit, sie ist multifunktional im Ursprung und durch die Entzündung der Membranen in Gelenken charakterisiert. Die Krankheit verbreitet sich von kleinen zu großen Gelenken, der größte Schaden entsteht in der frühen Phase¹. Die Diagnose von RA stützt sich in erster Linie auf klinische, radiologische und immunologische Eigenschaften. Der am häufigsten durchgeführte serologische Test ist die Messung des Rheumafaktors (RF). Das Vorhandensein von RF ist eins der Kriterien des American College of Rheumatology für die Klassifizierung von RA. Die IgM-Klasse ist am weitesten verbreitet und wird in 60-80 % der RA-Patienten befunden. RF ist für RA nicht spezifisch, da er häufig in gesunden Individuen und Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten und chronischen Infektionen vorkommt². Es wird berichtet, dass von SLE-Patienten ohne RA-Befund bis zu 30 % RF-positiv sind³. Trotz dieser niedrigen Spezifität wird ein positiver RF als wichtiger Prädiktor des Ausgangs in RA angesehen. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Antikörper zum Antiperinuklear-Faktor (APF) und Keratin (AKA) für RA hochspezifisch sind. Antikörper zu APF und AKA wurden durch indirekte Immunofluoreszenz unter Verwendung von Wangenepithel oder Rattenoesophagus gefunden⁴. Wegen der unzureichenden Verfügbarkeit von geeigneten Spendern von Wangenepithelzellen wurde APF nur begrenzt als routinemäßiger Labortest verwendet. Vor kurzem konnte das Antigen dieser beiden Antikörper als epidermales Filaggrin, einem an der Verhornung der Epidermis beteiligten filamentzugehörigen Intermediärprotein identifiziert werden^{5,6}. In Keratohyalin-Körnchen humaner Backenschleimhautzellen gefundenes Profilaggrin wird während der Spezialisierung der Zellen proteolytisch in Filaggrinuntereinheiten gespalten. In diesem Stadium wird das Protein entphosphorisiert und einige Argininrückstände werden durch die Enzym-Peptidylarginindeiminase (PAD)⁷ zu Zitruillin konvertiert. 1998 berichteten Schellekens und Kollegen, dass Autoantikörper, welche mit linearen synthetischen Peptiden reagieren, in denen die ungewöhnliche Aminosäure Zitruillin vorhanden ist, in 76 % der RA-Seren mit einer Spezifität für RA von 96 % gefunden wurden. Die Antikörper in Patienten mit RA, welche die zitruillinhaltigen Epitopen erkannten, waren zum größten Teil in der IgG-Klasse und von relativ hoher Affinität⁸. In einer späteren Veröffentlichung berichteten Schellekens und Kollegen, dass bei einem auf zyklisch zitruilliniertes Peptid (CCP) basierenden ELISA-Test im Vergleich zur linearen Version eine bessere Leistungscharakteristik im Nachweis von Antikörpern zu RA gefunden wurde⁹. In jüngster Vergangenheit wurde berichtet, dass die meisten zitruillinierten Proteine/Peptide von Autoantikörpern in RA-Seren im Prinzip erkannt werden, auch wenn dieses mit Unterschieden in Empfindlichkeit und Spezifität geschieht¹⁰. Diese Befunde legen nahe, dass zitruillinierte Antigene eine wichtige Rolle in der Diagnose von RA einnehmen.




Der DIASTAT™ Anti-CCP Assay ist ein auf dem Nachweis von Autoantikörpern in Humanserum oder Plasma basierender ELISA, gerichtet auf modifizierte Argininrückstände enthaltendes synthetisches zyklisches Peptid. Der Test ist ein weiteres Hilfsmittel in der Diagnose von Patienten mit RA.

TESTPRINZIP

Die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens sind mit einem hochgradig gereinigten, modifizierte Argininrückstände enthaltenden, synthetischen zyklischen Peptid beschichtet. Während der ersten Inkubation binden sich in verdünntem Serum oder Plasma vorliegende spezifische Autoantikörper an die mit Antigen beschichtete Oberfläche. Die Vertiefungen werden dann zur Entfernung ungebundener Komponenten gewaschen. Bei der zweiten Inkubation heftet sich das Konjugat, ein gegen humanes IgG gerichteter Enzym-markierter monoklonaler Antikörper, an alle Oberflächengebundenen Autoantikörper an. Nach weiterem Waschen werden spezifische Autoantikörper durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und führt zu einem farbigen Endprodukt. Die Menge des gebundenen Konjugates wird in Extinktionseinheiten gemessen. Im qualitativen Protokoll wird die von der Probe gebundene Konjugatmenge mit der von der Referenzkontrolle gebundenen Konjugatmenge verglichen. Im semiquantitativen Protokoll kann die Anti-CCP Autoantikörper-Konzentration durch Interpolation einer auf die Standards bezogenen Dosis-Wirkungskurve bestimmt werden.

TESTKIT-REAGENZIE

| | | | |
|----------|----------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Konjugat | 1 _ 15 ml | Mit alkalischer Phosphatase markierter muriner monoklonaler Antikörper gegen Human-IgG, Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1 % (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig. |
| B | Substrat | 1 _ 15 ml | Mg ²⁺ , Phenolphthaleinmonophosphat (PMP), Pufferlösung. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern. Zur Beachtung: REIZEND.  |

| | | | | |
|------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| C | Stopplösung | 1 _ 15 ml | Natriumhydroxid, EDTA, Karbonatpuffer (pH >10). Gebrauchsfertig. Zur Beachtung: REIZEND. |  |
| D | Waschpuffer-Konzentrat (16x) | 2 _ 25 ml | Boratpuffer, 0,8 % (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen. Zur Beachtung: MINDERGIFTIG. |  |
| E | CCP-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen | 12 _ 8 Streifen mit Mikrotitervertiefungen | Beschichtet mit synthetischem zitruelliniertem Peptid in einer wiederverschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel. | |
| F | Probendiluens-Konzentrat (5x) | 1 _ 25 ml | Phosphatpuffer, Proteinstabilisator, 0,5 % (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen. Zur Beachtung: MINDERGIFTIG |  |
| 1-5 | Anti-CCP Standards | 5 _ 1,0 ml | Humanplasma, Puffer, <0,1 % (w/v) Natriumazid. 0, 2, 8, 30, 100 U/ml. Gebrauchsfertig. | |
| 6 | Anti-CCP Referenzkontrolle | 1 _ 1,5 ml | Humanplasma, Puffer, <0,1 % (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig. | |
| +/- | Positiv- und Negativ-Kontrollen | 1 _ 0,2 ml 1 x 0,1 ml | Humanplasma, <0,1 % (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch: Verdünnung 1:100 mit verdünntem Probendiluens, wie für die Proben. | |
| | Packungsbeilage | | | |

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Haltbarkeit des geöffneten Kits

Ein Testkit wurde geöffnet und während des dreimonatigen Zeitraums ohne nachteilige Wirkung auf die Kitleistung drei mal wieder verwendet.

Handhabungs und Verfahrenshinweise

1. Die Testkit-Bestandteile bei 2-8°C lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum verwenden. Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus verwenden.
2. Reagenzien aus verschiedenen Testkit-Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden.
3. Testkits nicht einfrieren.
4. Waschpuffer-Konzentrat, Probendiluens-Konzentrat und Positiv und Negativ-Kontrollen müssen vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünntes Probendiluens sind bei 2-8°C bis zu 6 Monaten beständig, wenn eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
6. Überzählige Mikrotiterstreifen in die Folienpackung zurückgeben und mit dem Trockenmittel bis zum Gebrauch bei 2-8°C lagern.
7. Das Substrat während der Lagerung nicht der Lichteinwirkung aussetzen.
8. Die Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

Anzeichen einer Wertminderung

Das Substrat soll hellgelb aussehen. Eine Rosafärbung ist ein Anzeichen für eine Kontamination, und das Reagenz muss verworfen werden. Trübung oder Niederschlag in einem Bestandteil sind Anzeichen einer Wertminderung, und der Bestandteil muss verworfen werden.

Probensammlung und Aufbewahrung

Der Assay ist für Serum- oder Plasma-proben (EDTA, Lithium-Heparin oder Natriumzitat) vorgesehen; keine grob hämolysierten oder dickflüssigen Proben verwenden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen und erneutes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Proben nicht durch Erhitzen inaktivieren, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Unverdünnte Proben können bei 2-8°C für vier Wochen gelagert werden; für längere Zeiträume bei -20°C lagern. Im Verhältnis 1:100 verdünnte Proben sind am Tag des Ansetzens der Verdünnung zu verbrauchen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die Anwendung als In-vitro-Diagnostikum.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Die Anleitungen in dieser Broschüre, besonders die Handhabungs und Lagerungsvorschriften, strikt befolgen.
2. Standards und Kontrollen enthalten menschliches Plasma und wurden gemäß den geltenden FDA-Richtlinien auf HBsAg, HIV-1 RNA oder HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 und anti-HCV getestet und als nicht reaktiv/negativ befunden. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen alle Standards und Kontrollen als potentiell infektiös angesehen und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien wie andere potentiell gefährliche biologische Materialien behandelt werden. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4. Auflage, Mai 1999, beschreibt wie diese Materialien unter Beachtung der Good Laboratory Practice (GLP) zu handhaben sind. Dies trifft in den USA zu.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
5. Alle erkrankten Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und weitere Hautläsionen ausreichend schützen.
6. Standards, Kontrollen, Konjugat, Probendiluens-Konzentrat und Waschpuffer-Konzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei und Kupferrohren unter Bildung hoch explosiver Metallazide reagieren kann. Zur Vermeidung einer Azidansammlung bei der Entsorgung mit reichlich Wasser wegspülen.
7. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Natriumhydroxid muss mit reichlich Wasser aufgewischt werden. Wenn Berührung mit Augen oder Haut auftritt, mit Wasser abspülen und sofort den Arzt konsultieren.
8. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage von Axis-Shield Diagnostics erhältlich.

Xi
C STOPPLÖSUNG
Reizend

R36/38: Reizt die Augen und die Haut.
S23: Rauch nicht einatmen.
S25: Berührung mit der Augen vermeiden.
S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

Xn
D WASCHPUFFERKONZENTRAT (16X)
Mindergiftig

R22: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R32: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R52/53: Schädlich für Wasserorganismen; kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
S23: Rauch nicht einatmen.
S26: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S28: Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
S46: Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
S60: Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
S61: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

B SUBSTRAT

Reizend
R36: Reizt die Augen.
S23: Rauch nicht einatmen.
S25: Berührung mit der Augen vermeiden.
S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

F PROBENDILUENS-KONZENTRAT (5X)

Mindergiftig
R22: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R32: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R36: Reizt die Augen.
R52/53: Schädlich für Wasserorganismen; kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
S23: Rauch nicht einatmen.
S26: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S28: Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
S46: Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
S60: Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
S61: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

VORBEREITUNG

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien/Geräte

1. Lesegerät mit 550 nm Filter (540-565 nm ist zulässig) für eine Platte/einen Streifen mit 96 Vertiefungen.
2. Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 µl, 100 µl und 1 ml. Automatische Pipette zum Pipettieren von 100 µl. Automatische Pipette zum Pipettieren von 200 µl zum manuellen Waschen, wahlweise mit einem automatischen Plattenwäscher.
3. Glas/Kunststoffmesszylinder: 1_100 ml, 1_400 ml.
4. Gefäße zur Aufnahme eines 1 ml Volumens
5. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
6. Papiertücher.
7. Stoppuhr für 30 und 60 Minuten Intervalle.

Vorbereitung zur Testdurchführung

Alle Testkit-Bestandteile, einschließlich der Mikrotiterstreifen, vor Gebrauch 30-60 Minuten auf bis zu 18-25°C anwärmen. Die Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen.

Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich mischen.

| Reagenz | Volumen | Zugabe |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------------------------|
| Waschpuffer-Konzentrat | 1 Flasche | 375 ml destilliertes/deionisiertes Wasser |
| Probendiluens-Konzentrat | 1 Flasche | 100 ml destilliertes/deionisiertes Wasser |
| Positiv und Negativ-Kontrollen/Proben | 10 µl | 1 ml verdünntes Probendiluens |

Die Anzahl der für den jeweiligen Test erforderlichen Mikrotiterstreifen berechnen, und diese in dem Mikrotiterstreifenrahmen vorstecken. Überzählige Streifen mit dem Trockenmittel in die Folienpackung zurückgeben und bis zum Gebrauch bei 2-8°C lagern. Sicherstellen, dass Streifen im Mikrotiterstreifenrahmen sicher festgehalten werden. Die Anwender können die einzelnen Streifen an der oberen Kante nummerieren, um die Identifikation zu erleichtern. Den Mikrotiterstreifenrahmen zur weiteren Verwendung aufbewahren.

TESTPROTOKOLL

Qualitatives Protokoll: Referenzkontrolle, Positiv- und Negativkontrollen und Proben testen.

Semiquantitatives Protokoll: Standards (1-5), Positiv- und Negativ-Kontrolle und Proben testen.

1. Referenzvertiefungen zum Nachweis.
2. 100 µl Referenzkontrolle/Standards (Doppelbestimmung), vorverdünnte (1:100) Positiv- und Negativ-Kontrollen und vorverdünnte (1:100) Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Bitte denken Sie daran, zwischen den Zugaben die Pipettenspitzen zu wechseln. Dieser Schritt darf für die jeweilige Standard-/Kontroll-/Probenreihe nicht länger als 15 Minuten dauern.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25°C inkubieren.
4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umkehren über einem für die Entsorgung biologischer Materialien geeigneten Spülbecken dekantieren, wobei die potentielle Infektionsgefahr der Proben zu berücksichtigen ist. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
5. Die Vertiefungen **dreimal** mit mindestens 200 µl verdünntem Waschpuffer waschen. **Dekantieren und nach jedem Waschschrift abtupfen.**
6. In jede Vertiefung 100 µl Konjugat geben.
7. 30 ± 5 Minuten bei 18-25°C inkubieren.
8. Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. In jede Vertiefung 100 µl Substrat geben.
10. 30 ± 5 Minuten bei 18-25°C inkubieren. **Nicht dekantieren.**
11. In der gleichen Reihenfolge und Rate wie für das Substrat in jede Vertiefung 100 µl Stopplösung geben. Die Vertiefungen durch vorsichtiges Beklopfen mischen.
12. Die Streifen innerhalb von 24 Stunden bei 550 nm (540-565 nm) ablesen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test getrennt auswerten.

Qualitatives Protokoll

Das Verhältnis des Extinktionswertes (optische Dichte) für die Positiv- und Negativ-Kontrollen und für jede Probe berechnen.

$$\text{Extinktionsverhältnis} = \frac{\text{Extinktionswert der Probe oder Kontrolle}}{\text{Mittelwert der Extinktion der Referenzkontrolle}}$$

Die Anwender müssen einen für ihre Patientenpopulationen spezifischen Cut-off-Wert zwischen positiven und negativen Proben berechnen. Die Ergebnisse von den Patientenpopulationen, die an der von Axis-Shield durchgeführten klinischen Prüfung teilnahmen, deuten auf den folgenden Cut-off-Wert hin:

| <u>Extinktionsverhältnis</u> | <u>Interpretation der Ergebnisse</u> |
|------------------------------|-----------------------------------------|
| <0,95 | Negativ |
| ≥0,95 bis ≤1,0 | Borderline – Testwiederholung empfohlen |
| >1,0 | Positiv |

Semiquantitatives Protokoll

Der durchschnittliche Extinktionswert jedes Standards wird gegen eine log₁₀-Standardkonzentration (siehe nachfolgende Tabelle) auf geeignetem Diagrammpapier aufgezeichnet. Die Konzentration von Proben und Kontrollen kann dann von der Standardkurve abgelesen werden; eine typische Kurve wird für Referenzzwecke nachstehend gezeigt, sie darf jedoch nicht für die Interpretation der Ergebnisse eingesetzt werden. Gewichtete 4 Parameter umfassende angepaßte logistische (4PL), gewichtete 5 Parameter umfassende angepaßte logistische (5PL) geglättete Spline- oder log/logit- und lin/lnit-Kurve ist ebenfalls ausreichend.

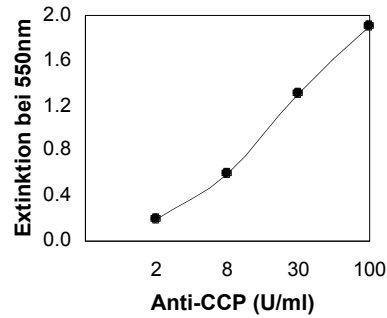
Proben mit Absorbanzen über Standard 5 (100 U/ml) liegen außerhalb des Assaybereichs und müssen als 100 U/ml angegeben, verdünnt und mit Korrektur für diesen weiteren Verdünnungsfaktor nochmals getestet werden.

Bitte beachten: Wie jeder Assay zum Nachweis von Antikörpern bestimmt auch dieser Assay die Aktivität der in der Probe vorkommenden Antikörper und nicht deren Konzentration. Die Aktivität kann von einer Reihe verschiedener Parameter beeinflusst werden, wie zum Beispiel der Antikörper-Avidität.

Standardkonzentrationen

| Standard-nummer | Konzentration U/ml |
|-----------------|--------------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 2 |
| 3 | 8 |
| 4 | 30 |
| 5 | 100 |

Typische Standardkurve



QUALITÄTSKONTROLLE

Darauf achten, dass eine angemessene Instandhaltung und Kalibrierung des Plattenlesegerätes nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die richtige Wellenlänge angewendet wird.

Die Laboratorien sollten sicherstellen, dass das Personal mit der Testanleitung, besonders aber den Abschnitten zu den Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen sowie den Handhabungs und Verfahrenshinweisen vollkommen vertraut ist. Das Personal muss darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass es vor der Herausgabe der Patientenergebnisse Leistungsspezifikationen in Bezug auf die Präzision und den zu berichtenden Bereich der Testergebnisse erheben kann, die mit den von dem Hersteller vorgegebenen vergleichbar sind. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens wird empfohlen, dass die vorverdünnten Positiv- und Negativ-Kontrollen in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen. Bei allen qualitativen Tests muss die gebrauchsfertige Referenzkontrolle als Doppelbestimmung mitlaufen.

Vorausgesetzt, daß die vom Hersteller beschriebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt werden, ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht herausgegeben werden, wenn eine Kontrolle nicht den unten angegebenen Kontrollverhältnis-Spezifikationen entspricht. Der Test kann nach Überprüfung des Verfahrens oder Kontaktaufnahme mit dem Händler/Hersteller wiederholt werden. Bei Wiederholung des Tests eine frische Verdünnung von jeder Kontrolle und der Probe herstellen. Einige Laboratorien möchten bei jedem Testdurchlauf gegebenenfalls auch ihre laboreigenen Kontrollen mitlaufen lassen. Dieses Kontrollmaterial muss bei oder unter -20°C aufbewahrt werden, wobei wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden sind. Die Ergebnisse der Proben werden durch Konservierungsmittel, wie zum Beispiel Natriumazid (0,1 % (w/v)) nicht beeinflusst.

Bei den Konzentrationen von Analyten, die bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden, handelt es sich um diejenigen, die von dem Hersteller für spezifische Populationen vorgegeben werden und stimmen nicht unbedingt mit den in der Literatur angegeben überein. Inzidenz-Grade, ihr Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen, Referenzbereiche und geeignete Cut-off-Punkte sind von dem jeweiligen Laboratorium für die von ihnen betreuten spezifischen Populationen zu berechnen.

Kontrollverhältnis-Spezifikationen

| Protokoll | Spezifikationen |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Qualitativ (Verhältnisse) | $\frac{\text{Extinktion für die Positive Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$ Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle |
| | $\frac{\text{Extinktion für die Negativ Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$ <0,95 |
| Semiquantitativ | Siehe Etikett für den zulässigen erwarteten Bereich (U/ml) für die Positiv-Kontrolle. |
| | Konzentration der Negativ-Kontrolle <2 U/ml |

ERWARTETE WERTE

200 Serumproben von asymptomatischen, scheinbar gesunden Spendern im Alter von 18 bis 72 Jahren, bestehend aus etwa gleich vielen Männern [n=105] und Frauen [n=95], wurde mit Hilfe des DIASTAT™ Anti-CCP ELISA-Tests untersucht.

In Bezug auf Geschlecht oder Alter wurden keine Unterschiede beobachtet (berechnete Vergleichsaltersgruppen 40 Jahre [n=115] und >40 Jahre [n=85]).

Die mittlere Anti-CCP Gesamtkonzentration für diese Population betrug $0,63 \pm 0,419$ U/ml (Bereich 0,05-3,8 U/ml).

Auf Grundlage der Referenzdaten dieser Population und denjenigen einer klinischen Population beträgt der empfohlene Assay-Grenzwert:

| |
|------------------------------------------------------------------|
| <i>Referenzbereich</i> ≤5 U/ml = Negativ >5 U/ml = Positiv |
|------------------------------------------------------------------|

Dieser Referenzbereich wird lediglich als Empfehlung vorgeschlagen, jedes Labor sollte einen für die jeweilige Patientenpopulation und klinische Praxis angemessenen Referenzbereich festlegen. Es ist zu beachten, dass Rheumatoïdarthritis in Frauen doppelt so häufig vorkommt als in Männern.

LEISTUNGSMERKMALE

Klinische Sensitivität in klinisch bestätigter RA

Daten für klinische Sensitivität des DIASTAT™ Anti-CCP ELISA wurden als Prozentsatz der im Anti-CCP Assay positiven und klinisch bestätigten RA-Sera berechnet. Klinisch bestätigte RA wurde gemäß den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) diagnostiziert. Nachstehend sind die systematisch geordneten Daten von vier Orten aufgeführt. Nachstehend ebenfalls angegeben ist die korrespondierende klinische Sensitivität von RF IgM, die mit Hilfe eines auf dem Markt angebotenen Tests an zwei dieser Orte gemessen wurde.

| Ort | Bestätigte RA (n) | Anti-CCP Positiv (n) | Klinische Sensitivität | Bestätigte RA (n) | RF IgM Positiv (n) | Klinische Sensitivität |
|-------------------|-------------------|----------------------|------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| Großbritannien | 283 | 220 | 78 % | 283 | 208 | 74 % |
| Großbritannien | 100 | 75 | 75 % | 100 | 95 | 95 % |
| Europa | 100 | 78 | 78 % | - | - | - |
| USA | 92 | 81 | 88 % | - | - | - |
| Gesamtzahl | 575 | 454 | 79 % | 383 | 303 | 79 % |

- Nicht getestet

Klinische Spezifität in Nicht-RA-Krankheitszuständen und asymptomatischer Population

Die klinische Spezifität für den DIASTAT™ Anti-CCP ELISA wurde durch Berechnung des Prozentsatzes der im Anti-CCP Assay negativen und klinisch bestätigten Sera mit Nicht-RA-Krankheitsstatus gewonnen. Nachstehend sind die systematisch geordneten Daten von fünf Orten für Nicht-RA-Krankheiten und von vier Orten für asymptomatische Population aufgeführt.

| Nicht-RA-Krankheitszustände | n | Anti-CCP Negativ (n) | Klinische Spezifität |
|----------------------------------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Systemischer Lupus erythematoses | 227 | 209 | 92 % |
| Sklerodermie | 92 | 86 | 93 % |
| Polymyositis | 21 | 21 | 100 % |
| Sjögrensches Syndrom | 86 | 85 | 99 % |
| Osteoarthritis | 66 | 59 | 89 % |
| Psoriasis-Arthropathie | 49 | 48 | 98 % |
| Reaktive RA | 40 | 38 | 95 % |
| Polymyalgia rheumatica | 38 | 36 | 95 % |
| Fibromyalgie | 21 | 21 | 100 % |
| Frühe Synovitis | 6 | 5 | 83 % |
| Reitersches Syndrom | 18 | 18 | 100 % |
| Sarkoidose | 4 | 4 | 100 % |
| Seronegative entzündliche Arthropathie | 13 | 10 | 77 % |
| Colitis ulcerosa | 40 | 39 | 98 % |
| Crohnsche Krankheit | 43 | 43 | 100 % |
| Autoimmunthyreoiditis | 50 | 50 | 100 % |
| Lyme-Krankheit | 45 | 44 | 98 % |
| CREST | 22 | 22 | 100 % |
| Juvenile RA | 9 | 8 | 89 % |
| Infektiöse Mononukleose | 118 | 116 | 98 % |
| Parvovirus | 11 | 11 | 100 % |
| Vaskulitis | 23 | 22 | 96 % |
| Gicht | 11 | 11 | 100 % |
| Dermatomyositis | 10 | 10 | 100 % |
| Spondylarthritis | 30 | 30 | 100 % |
| Summe | 1.093 | 1.043 | 95,4 % |

| Asymptomatische Population | n | Anti-CCP Negativ (n) | Klinische Spezifität |
|-----------------------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Summe | 334 | 334 | 100 % |

Klinische Spezifität von Anti-CCP und RF IgM

RF IgM und Anti-CCP wurden an drei Orten in Nicht-RA-Gruppen gemessen. Die Daten von allen Orten sind nachstehend systematisch geordnet. Alle nicht eindeutige RF IgM Ergebnisse sind ausgeschlossen.

| Krankheit | n | Anti-CCP | | RF IgM | |
|----------------------------------|------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| | | Negativ n | Klinische Spezifität | Negativ n | Klinische Spezifität |
| Systemischer Lupus erythematodes | 147 | 128 | 87 % | 79 | 54 % |
| Sjögrensches Syndrom | 50 | 49 | 98 % | 11 | 22 % |
| Sklerodermie | 53 | 48 | 91 % | 14 | 26 % |
| Polymyositis | 15 | 15 | 100 % | 11 | 73 % |
| Osteoarthritis | 31 | 26 | 84 % | 20 | 65 % |
| Autoimmunthyreoiditis | 35 | 35 | 100 % | 25 | 71 % |
| Lyme-Krankheit | 36 | 36 | 100 % | 26 | 72 % |
| Infektiöse Mononukleose | 39 | 38 | 97 % | 11 | 28 % |
| Summe | 406 | 375 | 92 % | 197 | 49 % |

| Asymptomatische Population | n | Anti-CCP | | RF IgM | |
|----------------------------|------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| | | Negativ n | Klinische Spezifität | Negativ n | Klinische Spezifität |
| Summe | 196 | 196 | 100 % | 158 | 81 % |

Übereinstimmung mit Rheumafaktor IgM

Die Leistung des DIASTAT™ Anti-CCP ELISA wurde mit einem auf dem Markt angebotenen ELISA Test in der Messung des Rheumafaktors IgM in einer asymptomatischen Population [n=196] und in einer Population von klinisch bestätigten RA [n=504] verglichen.

| Asymptomatische Population | | RF IgM ELISA | |
|------------------------------|---|--------------|-----|
| | + | - | |
| DIASTAT™ | + | 0 | 0 |
| Anti-CCP ELISA | - | 37 | 159 |
| Gesamtübereinstimmung = 81 % | | | |
| n = 196 | | | |

| Klinisch bestätigte RA | | RF IgM ELISA | |
|------------------------------|---|--------------|----|
| | + | - | |
| DIASTAT™ | + | 365 | 33 |
| Anti-CCP ELISA | - | 48 | 58 |
| Gesamtübereinstimmung = 84 % | | | |
| n = 504 | | | |

Verdünnungsmerkmale

Fünf Verdünnungen von drei Patientenproben wurden unter Verwendung von zwei Kitchargen getestet. Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Mittelwerte und die um die Verdünnung korrigierte Wiederfindung.

| Probe | Ver-dünnung | Mittelwert U/ml | Für die Verdünnung bereinigte Wiederfindung (%) |
|-------|-------------|-----------------|-------------------------------------------------|
| 1 | 1/100 | 66,6 | 100 |
| | 1/200 | 33,9 | 104 |
| | 1/400 | 17,9 | 113 |
| | 1/800 | 9,4 | 118 |
| | 1/1600 | 4,0 | 101 |
| 2 | 1/100 | 62,9 | 100 |
| | 1/200 | 31,1 | 101 |
| | 1/400 | 14,4 | 94 |
| | 1/800 | 7,4 | 97 |
| | 1/1600 | 3,2 | 84 |
| 3 | 1/100 | 77,8 | 100 |
| | 1/200 | 35,0 | 88 |
| | 1/400 | 16,0 | 82 |
| | 1/800 | 9,0 | 94 |
| | 1/1600 | 4,2 | 88 |

Impräzision

1. **Intraassay-Impräzision** ermittelt durch Testen von vier Kontrollen [n=4] in fünfundzwanzig Assays, mit fünf Betreibern und drei Kitchargen.

| Kontrolle | Mittelwert U/ml | Effektiver Mittelwert %CV |
|-----------|-----------------|---------------------------|
| 1 | 5,4 | 7,6 |
| 2 | 15,5 | 10,5 |
| 3 | 22,4 | 8,7 |
| 4 | 34,1 | 9,7 |

Der Bereich von %CV für jede Kontrolle war 1,8 – 16,3 % (QC1), 1,2 – 20,3 (QC2), 1,4 – 15,5 % (QC3) und 3,2 – 14,9 % (QC4). Die Spanne ist eine Auswirkung der Anzahl der in dieser Studie eingesetzten Betreiber [n=5] und Kitchargen [n=3].

2. **Interassay-Impräzision** ermittelt durch Testen von vier Kontrollen [n=4] in fünfundzwanzig Assays, mit fünf Betreibern und drei Kitchargen.

| Kontrolle | Mittelwert U/ml | SD | VK (%) |
|-----------|-----------------|------|--------|
| 1 | 5,4 | 0,74 | 13,6 |
| 2 | 15,5 | 1,71 | 11,0 |
| 3 | 22,4 | 2,76 | 12,4 |
| 4 | 34,1 | 2,56 | 7,6 |

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze, berechnet als Mittelwert des Nullstandards plus zwei Standardabweichungen, durchgeführt in Dreifachbestimmung in 12 Tests aus drei Kitchargen, lag bei 0,05 U/ml.

Störfaktoren

Hämoglobin bis zu 400 mg/dl, Bilirubin bis zu 0,2 mg/ml, Intralipid bis zu 15 mg/ml und Rheumafaktor bis zu 200 IU/ml stören die Ergebnisse für CCP-Antikörper nicht.

ANWENDUNGSGRENZEN

1. Obgleich das Vorliegen von Antikörpern zu CCP auf Rheumatoidarthritis hindeutet, ist ein positives Ergebnis für sich allein nicht diagnostisch, die Daten müssen unter Berücksichtigung von anderen klinischen und Laborbefunden betrachtet werden.
2. Bei einigen Patienten können hohe Anti-CCP-Antikörperspiegel mit wenigen oder keinen Befunden einer klinischen Erkrankung vorliegen. Andererseits können bei einigen Patienten mit aktiver Krankheit nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper vorhanden sein. Die klinische Bedeutung dieser Informationen ist gegenwärtig unklar.
3. Da das Ergebnis eines Anti-CCP-Assay kein diagnostische Nachweis des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins einer klinischen Krankheit ist, sollte die Behandlung nicht allein auf Grundlage eines positiven Anti-CCP Ergebnisses eingeleitet werden.
4. Initialisierung oder Änderung der Behandlung darf nicht auf Grund von Änderungen in der Anti-CCP Autoantikörperkonzentration erfolgen, sondern muss auf klinischen Beobachtung/en beruhen.
5. Die klinische Wirksamkeit der Überwachung von CCP-Autoantikörperspiegeln als ein Indikator für die Progression/Remission von Rheumatoidarthritis wurde nicht festgelegt.
6. Der Wert von Anti-CCP in juveniler Arthritis wurde nicht nachgewiesen.
7. Auf Grund der spezifischen Eigenschaften von Antigen/Antikörper-Interaktionen wird nicht die Konzentration von Antikörpern nachgewiesen, sondern die Aktivität. Da Patientenseren heterogene Antikörperpopulationen enthalten kann es insbesondere bei sehr hoher Verdünnung der Proben vorkommen, dass einige Proben keine Linearität erkennen lassen.

LITERATUR

1. Gough AKS, et al. *Lancet*, **344**, 23-27, 1994.
2. Smolen JS. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis (Section C). In *Manual of Biological Markers of Disease* (Eds. van Venrooij WJ, Maini RN), Kluwer Academic Publishers, 1996.
3. Barland P and Lipstein E. *Am J Med*, **100 (Suppl 2A)**, 16S-23S, 1996.
4. Nakamura RM. *J Clin Lab Anal*, **14**, 305-313, 2000.
5. Simon M, et al. *J Clin Invest*, **92**, 1387-1393, 1993.
6. Sebbag M, et al. *J Clin Invest*, **95**, 2672-2679, 1995.
7. Girbal-Neuhauser E, et al. *J Immunol*, **162**, 585-594, 1999.
8. Schellekens GA, et al. *J Clin Invest*, **101**, 273-281, 1998.
9. Schellekens GA, et al. *Arthritis Rheum*, **43(1)**, 155-163, 2000.
10. van Boekel MAM, et al. *Arthritis Res*, **4**, 87-93, 2002.

ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

1. Die Proben und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen im Verhältnis 1:100 verdünnt werden. Standards oder Referenzkontrolle nicht verdünnen.
2. 100 µl Referenzkontrolle/Standards (in Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und Proben in die entsprechenden gekennzeichneten Vertiefungen des Mikrotiterstreifens geben.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25°C inkubieren.
4. Streifen 3mal waschen.
5. In jede Vertiefung 100 µl Konjugat geben.
6. 30 ± 5 Minuten bei 18-25°C inkubieren.
7. Streifen 3mal waschen.
8. In jede Vertiefung 100 µl Substrat geben.
9. 30 ± 5 Minuten bei 18-25°C inkubieren.
10. In jede Vertiefung 100 µl Stopplösung geben.
11. Extinktion bei 550 nm ablesen.

ITALIANO: INDICAZIONI PER L'USO

Il test anti-CCP DIASTAT™ è un dosaggio immunoenzimatico semiquantitativo/qualitativo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) per la rivelazione della classe IgG di autoanticorpi specifici verso il peptide citrullinato ciclico nel siero o nel plasma (EDTA, litio eparina o sodio citrato) umano. È indicato quale mezzo adiuvante nella diagnosi dell'artrite reumatoide (AR) e, da solo, non va considerato come definitivo. I livelli autoanticorpali rappresentano uno dei parametri del processo diagnostico a più criteri, che includono le valutazioni cliniche e laboratoristiche.

INTRODUZIONE



L'artrite reumatoide (AR) è una malattia autoimmune sistemica a eziologia multifunzionale e caratterizzata dall'infiammazione delle membrane sinoviali. Si propaga dalle piccole alle grandi articolazioni, con il danno maggiore nella fase iniziale¹. La diagnosi di AR è principalmente basata sulle caratteristiche cliniche, radiologiche ed immunologiche. Il test sierologico più frequente è la misurazione del fattore reumatoide (FR); la presenza dell'FR è uno dei criteri adottati dall'American College of Rheumatology per la classificazione della AR. L'immunoglobulina della classe M è di solito la più frequente ed è presente nel 60-80% dei pazienti affetti da AR. Il fattore FR non è specifico per la AR, essendo spesso presente in individui sani e nei pazienti affetti da altre malattie autoimmuni e da altre infezioni croniche². Nella letteratura è riportato che fino al 30% di pazienti affetti da LES senza evidenze di RA sono positivi per l'FR³. Nonostante la bassa specificità, la positività FR è considerata un importante prodromo dell'insorgenza della AR. Ormai da diversi anni si riconosce che gli anticorpi verso il fattore antiperinucleare (APF) e anticheratina (AKA) hanno elevata specificità per la RA. Gli anticorpi verso l'APF e l'AKA sono stati rivelati mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando l'epitelio buccale o l'esofago del ratto⁴. La mancanza di disponibilità di donatori di cellule buccali ha limitato l'impiego dell'APF quale test routinario di laboratorio. L'antigene di entrambi questi anticorpi è stato recentemente individuato nella filaggrina epidermica, una proteina intermedia aggregata in filamenti, interessata nella corneificazione dell'epidermide^{5,6}. La profilaggrina, presente nei granuli cheratocitocellulari delle cellule della mucosa buccale umana, viene proteoliticamente clivata in sottounità di filaggrina durante la differenziazione cellulare. In questa fase, la proteina è defosforilata ed alcuni residui di arginina vengono trasformati in citrullina dall'enzima peptidilarginina deaminasi (PAD)⁷. Nel 1998, Schellekens e colleghi hanno riportato che gli autoanticorpi reattivi con i peptidi sintetici lineari contenenti l'insolito amminoacido citrullina erano presenti nel 76% dei sieri AR, con una specificità per l'AR del 96%. Gli anticorpi nei pazienti affetti da AR che riconoscevano la citrullina contenente epitopi erano predominantemente le immunoglobuline della classe G ad affinità relativamente elevata⁸. In una pubblicazione successiva, Schellekens e colleghi hanno riportato che un test ELISA basato sul peptide citrullinato ciclico (CCP) ha dimostrato caratteristiche prestazionali superiori rispetto alla versione lineare nella rivelazione degli anticorpi verso la AR⁹. È molto recente la segnalazione che, in principio, la maggior parte dei peptidi/proteine citrullinati vengono riconosciuti dagli autoanticorpi nei sieri AR, sebbene con sensibilità e specificità diverse¹⁰. Questi reperti suggeriscono l'importanza del ruolo degli antigeni citrullinati nella diagnosi della AR.



Il dosaggio anti-CCP DIASTAT™ è un ELISA basato sulla rivelazione degli autoanticorpi verso il peptide ciclico sintetico contenente residui di arginina modificata nel siero o nel plasma umano. Il test offre un ulteriore strumento diagnostico per i pazienti affetti da AR.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con un peptide ciclico sintetico altamente purificato, contenente residui di arginina modificata. Durante la prima incubazione, gli autoanticorpi specifici nel siero o plasma diluito si legano con la superficie rivestita con antigene; i pozzetti sono quindi lavati per rimuovere i componenti non legati. Nella seconda incubazione, il coniugato - un anticorpo monoclonale, marcato con un enzima, verso le IgG umane - si lega a qualsiasi autoanticorpo adeso alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, gli autoanticorpi specifici vengono tracciati per incubazione con il substrato. L'aggiunta della soluzione bloccante pone fine alla reazione, generando un prodotto finale colorato. La quantità di coniugato legato viene misurata in unità di assorbanza. Nel protocollo qualitativo, la quantità di coniugato legato dal campione viene rapportata contro quella legata dal controllo di riferimento, mentre in quello semiquantitativo, la concentrazione degli autoanticorpi anti-CCP può essere valutata per interpolazione dalla curva dose-risposta basata sugli standard.

COMPONENTI DEL KIT

| | | | | |
|----------|---------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Coniugato | 1 _ 15 ml | Anticorpo monoclonale murino, marcato con fosfatasi alcalina per le IgG umane, tampone Tris, stabilizzante delle proteine, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso. | |
| B | Substrato | 1 _ 15 ml | Mg ²⁺ , fenoltaleina monofosfato (PMP), soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare evitando l'esposizione alla luce. NOTA: IRRITANTE |  |
| C | Soluzione bloccante | 1 _ 15 ml | Iodossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH >10). Pronta all'uso. NOTA: IRRITANTE |  |

| | | | | |
|------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| D | Tampone di lavaggio concentrato (16X) | 2 _ 25 ml | Tampone borato, azide di sodio 0,8% (p/v). Diluire prima dell'uso. NOTA: NOCIVO |  |
| E | Pozzetti rivestiti di CCP e supporto per strip | 8 pozzetti di microtitolazione da 12 strip | Rivestiti con peptide citrullinato sintetico, in confezione di alluminio risigillabile, contenente essiccante. | |
| F | Diluyente per campioni concentrato (5X) | 1 _ 25 ml | Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine, azide di sodio 0,5% (p/v). Diluire prima dell'uso. NOTA: NOCIVO |  |
| 1-5 | Standard anti-CCP | 5 _ 1,0 ml | Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). 0, 2, 8, 30, 100 U/ml. Pronto per l'uso. | |
| 6 | Controllo di riferimento anti-CCP | 1 _ 1,5 ml | Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso. | |
| +/- | Controlli positivi e negativi | 1 _ 0,2 ml 1 x 0,1 ml | Plasma umano, azide di sodio <0,1% (p/v). Diluire 1:100 con il diluyente per campioni diluito prima dell'uso, come per i campioni. | |
| | Foglio illustrativo | | | |

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Stabilità del kit aperto

Un kit è stato aperto e utilizzato in tre occasioni, in un periodo di tre mesi, con nessun effetto prestazionale avverso.

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2°C e 8°C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non miscelare componenti appartenenti a lotti di numero diverso.
3. Non congelare i kit.
4. Prima dell'uso, diluire il tampone di lavaggio concentrato, il diluyente per campioni concentrato e i controlli positivi e negativi. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Una volta diluiti, il tampone di lavaggio e il diluyente per campioni sono stabili a temperature comprese tra 2°C e 8°C per un periodo massimo di 6 mesi, in assenza di contaminazione microbica.
6. Riporre le strip di microtitolazione inutilizzate nella confezione di alluminio contenente l'essiccante a temperature di 2-8°C, fino al momento dell'uso.
7. Conservare il substrato senza esporlo alla luce.
8. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.

Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere di colore giallo pallido. Una colorazione rosa è indice di contaminazione e il reagente va smaltito. La torbidità o la precipitazione di un componente qualsiasi è indice di deterioramento e il componente va smaltito.

Raccolta e conservazione dei campioni

Il dosaggio è indicato per i campioni sierici o del plasma (EDTA, litio eparina o sodio citrato); non utilizzare campioni altamente emolizzati o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del test; evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Non inattivare mediante calore i campioni, per evitare di ottenere falsi positivi.

I campioni possono essere conservati non diluiti a temperature comprese tra 2°C e 8°C per quattro settimane; per periodi più lunghi, conservare a -20°C. I campioni diluiti a 1:100 nel diluyente per campioni diluito vanno utilizzati nello stesso giorno di diluizione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per solo uso diagnostico in vitro.

Precauzioni di sicurezza

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. Gli standard e i controlli contengono plasma umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'HbsAg, per l'antigene HIV-1 o per l'HIV-1 RNA e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV-1/HIV-2 e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, gli standard e i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopericolosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4^a edizione, Maggio 1999, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo non è applicabile negli Stati Uniti d'America.
3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. Gli standard, i controlli, il coniugato, il diluente per campioni concentrato e il tampone di lavaggio concentrato contengono azide di sodio, che reagisce con tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Smaltire negli scarichi con acqua abbondante per evitare l'accumulo di azide.
7. La soluzione bloccante contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Eventuali spandimenti vanno mescolati con acqua abbondante e raccolti con materiale assorbente. Se viene a contatto con la pelle o gli occhi, irrigare con acqua e rivolgersi immediatamente al medico.
8. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Axis-Shield Diagnostics.



C SOLUZIONE BLOCCANTE

Irritante

R36/38: Irritante per gli occhi e la pelle.

S23: Non respirare i fumi.

S25: Evitare il contatto con gli occhi.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S29/35: Non gettare i residui nelle fognature; non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.



D TAMPONE DI LAVAGGIO CONCENTRATO (16X)

Nocivo

R22: Nocivo per ingestione.

R32: A contatto con acidi libera gas molto tossico.

R52/53: Nocivo per gli organismi acquatici; può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

S23: Non respirare i fumi.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S28: In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.

S29/35: Non gettare i residui nelle fognature; non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46: In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

S60: Questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.

S61: Non disperdere nell'ambiente. Riferirsi alle istruzioni speciali / schede informative in materia di sicurezza.

B SUBSTRATO

Irritante

R36: Irritante per gli occhi.

S23: Non respirare i fumi.

S25: Evitare il contatto con gli occhi.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S29/35: Non gettare i residui nelle fognature; non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

F DILUENTE PER CAMPIONI CONCENTRATO (5X)

Nocivo

R22: Nocivo per ingestione.

R32: A contatto con acidi libera gas molto tossico.

R36: Irritante per gli occhi.

R52/53: Nocivo per gli organismi acquatici; può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

S23: Non respirare i fumi.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S28: In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.

S29/35: Non gettare i residui nelle fognature; non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46: In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

S60: Questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.

S61: Non disperdere nell'ambiente. Riferirsi alle istruzioni speciali / schede informative in materia di sicurezza.

PREPARAZIONE

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

1. Lettore per piastra da 96 pozzetti/strip con filtro da 550 nm (540-565 nm è accettabile).
2. Pipette di precisione per dispensare 10 µl, 100 µl, 1 ml. Pipetta automatica per dispensare 100 µl. Pipetta automatica per dispensare 200 µl per il lavaggio manuale. Lavapietra automatica opzionale.

3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1_100 ml, 1_400 ml.
4. Contenitore di 1 ml di volume.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette assorbenti di carta.
7. Timer per intervalli di 30 e 60 minuti.

Preparazione del dosaggio

Prima dell'uso, lasciar riscaldare i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, fino a temperature comprese tra 18°C e 25°C per 30-60 minuti. Miscelare delicatamente i reagenti per inversione.

Non diluire il controllo di riferimento.

Diluire i seguenti reagenti e miscelare accuratamente.

| Reagente | Volume | Aggiungere |
|----------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|
| Tampone di lavaggio concentrato | 1 flaconcino | 375 ml di acqua distillata/deionizzata. |
| Diluente per campioni concentrato | 1 flaconcino | 100 ml di acqua distillata/deionizzata. |
| Controlli positivi e negativi/campioni | 10 µl | 1 ml di diluente per campioni diluito |

Calcolare il numero di strip di microtitolazione necessarie per il dosaggio da eseguire e porle nell'apposito supporto. Riporre le strip inutilizzate nella confezione di alluminio risigillabile contenente essiccante; conservare a temperature comprese tra 2 e 8°C fino al momento dell'uso. Verificare che tutte le strip siano ben salde nell'apposito supporto. A sua discrezione, l'utente può numerare ciascuna strip lungo il lato superiore per facilitarne l'identificazione. Conservare il supporto per le strip di microtitolazione per l'uso futuro.

PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO

Protocollo qualitativo: analizzare il controllo di riferimento, i controlli positivo e negativo e i campioni.

Protocollo semiquantitativo: analizzare gli standard (1-5), i controlli positivo e negativo e i campioni.

1. Marcare i pozzetti per l'identificazione.
2. Dispensare con la pipetta 100 µl di controllo di riferimento/standard in duplicato, i controlli positivo e negativo prediluiti (1:100) e i campioni prediluiti (1:100) dei pazienti negli appositi pozzetti. Ricordarsi di cambiare il puntale della pipetta ad ogni aggiunta di volumi. Questa operazione non deve richiedere più di 15 minuti per un ogni serie di standard/controlli/campioni.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25°C.
4. Decantare il contenuto delle strip per inversione rapida in un lavello idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale infettivo dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta assorbente.
5. Lavare i pozzetti **tre volte** con almeno 200 µl di tampone di lavaggio diluito. **Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.**
6. Aggiungere 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto.
7. Incubare 30±5 minuti a 18-25°C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100 µl di substrato in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30±5 minuti a 18-25°C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità del substrato. Picchiettare delicatamente i pozzetti per miscelare.
12. Leggere le strip entro 24 ore a 550 nm (540-565 nm).

CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Valutare ciascun saggio separatamente per calcolare e interpretare i risultati.

Protocollo qualitativo

Calcolare il rapporto del valore di assorbanza (densità ottica) per i controlli positivi e negativi e per ciascun campione.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{valore d'assorbanza del campione o controllo}}{\text{valore medio d'assorbanza del controllo di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare il valore di normalità (punto di cut-off) tra campioni positivi e negativi, che sia specifico alla loro popolazione di pazienti. I risultati ottenuti dalle popolazioni di pazienti, adottate negli studi clinici condotti da Axis-Shield, suggeriscono i seguenti valori di normalità:

| <u>Rapporto di assorbanza</u> | <u>Interpretazione dei risultati</u> |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <0,95 | Negativo |
| ≥da 0,95 ≤1,0 | Valore borderline: si consiglia di ripetere il test |
| >1,0 | Positivo |

Protocollo semiquantitativo

Mettere in grafico il valore medio d'assorbanza per ciascuno standard contro la concentrazione standard \log_{10} (vedere la tabella che segue) su carta grafica appropriata. Leggere la concentrazione dei controlli e dei campioni sulla curva standard; un grafico tipico è riportato di seguito a scopo di riferimento e non va pertanto utilizzato per l'interpretazione dei risultati. È pure accettabile la curva logistica ponderata a 4 (4PL) o 5 (5PL) parametri, logit-log, lineare-lineare e spline liscio.

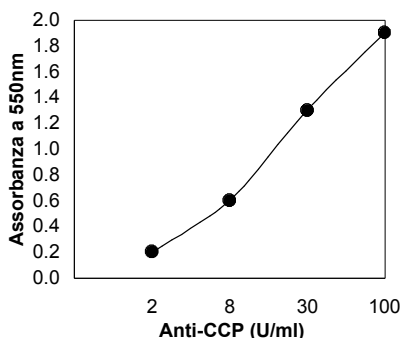
I campioni con assorbanza superiore allo standard 5 (100 U/ml) sono fuori intervallo di dosaggio e vanno riportati come >100 U/ml, diluiti e rianalizzati, correggendo il fattore di diluizione.

NOTA: analogamente a qualsiasi metodo di misura degli anticorpi, questo dosaggio determina l'attività degli anticorpi presenti nel campione, non la loro concentrazione. L'attività può essere influenzata da diversi parametri, come l'avidità degli anticorpi.

Concentrazioni standard

| Numero standard | Concentrazione U/ml |
|-----------------|---------------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 2 |
| 3 | 8 |
| 4 | 30 |
| 5 | 100 |

Curva standard tipica



CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Verificare che la manutenzione e calibrazione del lettore di piastre vengano eseguite in modo adeguato e in conformità alle istruzioni del costruttore, e che venga impiegata la lunghezza d'onda corretta.

Gli operatori devono accertarsi di aver compreso appieno le istruzioni per il dosaggio, in particolare per quanto concerne le avvertenze, le precauzioni e le annotazioni sulla manipolazione e la procedura. Inoltre, prima di riferire i risultati dei test al paziente, gli operatori devono aver dimostrato di essere in grado di ottenere specifiche prestazionali, in termini di precisione e di intervallo riportabile dei risultati, equiparabili a quelle stabilite dal costruttore. Si consiglia di eseguire i controlli positivo e negativo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi, al fine di monitorare la qualità della procedura. Eseguire il controllo di riferimento, pronto per l'uso, in duplicato per tutti i dosaggi qualitativi.

Presupponendo che le specifiche di precisione descritte dal costruttore siano soddisfatte, qualora un controllo qualsiasi non soddisfi le specifiche del rapporto di controllo riportate di seguito, il dosaggio va considerato non valido e non va riportato. L'operatore può ripetere il dosaggio, dopo aver riesaminato la procedura seguita, oppure rivolgersi al distributore o costruttore. Se il dosaggio viene ripetuto, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. Per ciascuna serie analitica, i laboratori possono scegliere di includere i propri controlli interni. Conservare i materiali di controllo a temperature pari o inferiori a -20°C; evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. I preservanti, come l'azide di sodio a 0,1% (p/v), non incidono in alcuna misura sui risultati dei campioni.

I livelli degli analiti identificati in patologie specifiche sono quelli stabiliti dal costruttore per popolazioni specifiche, per il qual motivo è possibile che non riflettano quanto riportato nella letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, gli intervalli di riferimento e i valori di normalità appropriati devono essere calcolati per le popolazioni specifiche servite dagli operatori.

Specifiche del rapporto di controllo

| Protocollo | Specifiche | |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Qualitativo (rapporti) | Assorbanza controllo positivo | vedere l'etichetta del controllo |
| | Assorbanza controllo di riferimento | positivo |
| | Assorbanza controllo negativo | <0,95 |
| | Assorbanza controllo di riferimento | |
| Semi-quantitativo | Vedere l'etichetta del controllo positivo per l'intervallo accettabile previsto (U/ml). | |
| | Concentrazione controllo negativo <2 U/ml | |

VALORI ATTESI

200 campioni sierici, prelevati da donatori asintomatici, apparentemente sani, comprendenti un rapporto pressoché eguale di soggetti maschili [n=105] e femminili [n=95], di età compresa tra 18 e 72 anni sono stati analizzati utilizzando l'ELISA anti-CCP DIASTAT™.

Non si sono osservate differenze attribuibili a sesso o età (calcolate comparando i range di età di ≤40 anni [n=115] e >40 anni [n=85]).

La concentrazione media totale di anti-CCP per questa popolazione era 0,63 ± 0,419 U/ml (range 0,05-3,8 U/ml).

In base a questi dati derivati dalla popolazione di riferimento e a quelli di una popolazione clinica, il valore di normalità suggerito è:

Intervallo di riferimento

≤5 U/ml = Negativo

>5 U/ml = Positivo

Il range di riferimento qui suggerito viene riportato solo a scopo indicativo; ciascun laboratorio deve stabilire il range appropriato per le rispettive popolazioni di pazienti e pratica clinica. Va notato che la prevalenza dell'artrite reumatoide nelle donne è doppia rispetto all'uomo.

DATI SULLE PRESTAZIONI

Sensibilità clinica nella AR confermata clinicamente

Dati di sensibilità clinica dell'ELISA anti-CCP DIASTAT™, calcolati quale percentuale dei sieri positivi per la AR clinicamente confermata nel dosaggio anti-CCP. La AR clinicamente confermata è stata diagnosticata conformemente ai criteri dell'American College of Rheumatology (ACR). I dati collazionati da quattro centri sono riportati di seguito, unitamente alla corrispondente sensibilità clinica dell'RF IgM, calcolata in due centri utilizzando un test disponibile nel mercato.

| Centro | AR confermata (n) | Anti-CCP Positivo (n) | Sensibilità clinica | AR confermata (n) | RF IgM Positivo (n) | Sensibilità clinica |
|---------------|-------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| UK | 283 | 220 | 78% | 283 | 208 | 74% |
| UK | 100 | 75 | 75% | 100 | 95 | 95% |
| Europa | 100 | 78 | 78% | - | - | - |
| USA | 92 | 81 | 88% | - | - | - |
| Totale | 575 | 454 | 79% | 383 | 303 | 79% |

- Non analizzato

Specificità clinica negli stati non AR e asintomatici

La specificità clinica dell'ELISA anti-CCP DIASTAT™ è stata ottenuta calcolando la percentuale di sieri negativi di stato patologico non AR nel dosaggio anti-CCP. I dati collazionati da cinque centri per lo stato non AR e da quattro centri per gli asintomatici sono riportati di seguito.

| Stati patologici non AR | n | Anti-CCP Negativo (n) | Specificità clinica |
|----------------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Lupus eritematoso sistemico | 227 | 209 | 92% |
| Sclerodermia | 92 | 86 | 93% |
| Polimiosite | 21 | 21 | 100% |
| Sindrome di Sjögren | 86 | 85 | 99% |
| Osteoartrite | 66 | 59 | 89% |
| Artrite psoriatca | 49 | 48 | 98% |
| AR reattiva | 40 | 38 | 95% |
| Polimialgia reumatica | 38 | 36 | 95% |
| Fibromialgia | 21 | 21 | 100% |
| Sinovite precoce | 6 | 5 | 83% |
| Sindrome di Reiter | 18 | 18 | 100% |
| Sarcoidosi | 4 | 4 | 100% |
| Artropatia infiammatoria sieronegativa | 13 | 10 | 77% |
| Colite ulcerativa | 40 | 39 | 98% |
| Malattia di Crohn | 43 | 43 | 100% |
| Tiroidite autoimmune | 50 | 50 | 100% |
| Malattia di Lyme | 45 | 44 | 98% |
| Sindrome CREST | 22 | 22 | 100% |
| AR giovanile | 9 | 8 | 89% |
| Mononucleosi infettiva | 118 | 116 | 98% |
| Parvovirus | 11 | 11 | 100% |
| Vasculite | 23 | 22 | 96% |
| Gotta | 11 | 11 | 100% |
| Dermatomiosite | 10 | 10 | 100% |
| Spondilite anchilosante | 30 | 30 | 100% |
| Totale | 1.093 | 1.043 | 95,4% |

| Asintomatici | n | Anti-CCP Negativo (n) | Specificità clinica |
|---------------------|------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Totale | 334 | 334 | 100% |

Specificità clinica dell'anti-CCP ed FR IgM

L'FR IgM e l'anti-CCP sono stati misurati in gruppi non AR in tre centri. I dati raccolti da tutti i centri sono stati collazionati di seguito. Tutti i risultati FR IgM equivoci sono stati esclusi.

| Malattia | n | Anti-CCP | | FR IgM | |
|-----------------------------|------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|
| | | Negativo n | Specificità clinica | Negativo n | Specificità clinica |
| Lupus eritematoso sistemico | 147 | 128 | 87% | 79 | 54% |
| Sindrome di Sjögren | 50 | 49 | 98% | 11 | 22% |
| Sclerodermia | 53 | 48 | 91% | 14 | 26% |
| Polimiosite | 15 | 15 | 100% | 11 | 73% |
| Osteoartrite | 31 | 26 | 84% | 20 | 65% |
| Tiroidite autoimmune | 35 | 35 | 100% | 25 | 71% |
| Malattia di Lyme | 36 | 36 | 100% | 26 | 72% |
| Mononucleosi infettiva | 39 | 38 | 97% | 11 | 28% |
| Totale | 406 | 375 | 92% | 197 | 49% |

| Asintomatici | n | Anti-CCP | | FR IgM | |
|---------------|------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|
| | | Negativo n | Specificità clinica | Negativo n | Specificità clinica |
| Totale | 196 | 196 | 100% | 158 | 81% |

Concordanza con il fattore reumatoide IgM

La prestazione dell'ELISA anti-CCP DIASTAT™ è stata comparata con un ELISA disponibile nel mercato per la misurazione del fattore reumatoide IgM in una popolazione asintomatica [n=196] e in una popolazione con AR clinicamente confermata [n=504].

Popolazione asintomatica

| | | ELISA FR IgM | |
|----------------------------|---|--------------|-----|
| | | + | - |
| ELISA anti-CCP DIASTAT™ | + | 0 | 0 |
| | - | 37 | 159 |

Concordanza totale = 81%
n = 196

AR clinicamente confermata

| | | ELISA FR IgM | |
|----------------------------|---|--------------|----|
| | | + | - |
| ELISA anti-CCP DIASTAT™ | + | 365 | 33 |
| | - | 48 | 58 |

Concordanza totale = 84%
n = 504

Caratteristiche di diluizione

Sono state analizzate cinque diluizioni dei campioni di tre pazienti utilizzando due lotti di kit. Nella tabella che segue sono riportati i valori medi ottenuti e la percentuale di recupero.

| Campione | Diluizione | Valore medio U/ml | % di recupero |
|----------|------------|-------------------|---------------|
| 1 | 1/100 | 66,6 | 100 |
| | 1/200 | 33,9 | 104 |
| | 1/400 | 17,9 | 113 |
| | 1/800 | 9,4 | 118 |
| | 1/1600 | 4,0 | 101 |
| 2 | 1/100 | 62,9 | 100 |
| | 1/200 | 31,1 | 101 |
| | 1/400 | 14,4 | 94 |
| | 1/800 | 7,4 | 97 |
| | 1/1600 | 3,2 | 84 |
| 3 | 1/100 | 77,8 | 100 |
| | 1/200 | 35,0 | 88 |
| | 1/400 | 16,0 | 82 |
| | 1/800 | 9,0 | 94 |
| | 1/1600 | 4,2 | 88 |

Imprecisione

- Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando quattro controlli [n=4] in 25 dosaggi, utilizzando cinque operatori e tre lotti di kit.

| Controllo | Valore medio U/ml | Valore quadratico medio %CV |
|-----------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | 5,4 | 7,6 |
| 2 | 15,5 | 10,5 |
| 3 | 22,4 | 8,7 |
| 4 | 34,1 | 9,7 |

Il range della %CV per ciascun controllo era 1,8 – 16,3% (QC1), 1,2 – 20,3 (QC2), 1,4 – 15,5% (QC3) e 3,2 – 14,9% (QC4). Questa dispersione è un riflesso del numero di operatori [n=5] e dei lotti di kit [n=3] utilizzati in questo studio.

- Imprecisione interdosaggio** determinata analizzando quattro controlli (n=4) in 25 dosaggi, utilizzando cinque operatori e tre lotti di kit.

| Controllo | Valore medio U/ml | DS | %CV |
|-----------|-------------------|------|------|
| 1 | 5,4 | 0,74 | 13,6 |
| 2 | 15,5 | 1,71 | 11,0 |
| 3 | 22,4 | 2,76 | 12,4 |
| 4 | 34,1 | 2,56 | 7,6 |

Limite inferiore di rivelazione

Il limite inferiore di rivelazione, calcolato quale valore medio dello standard zero più due deviazioni standard, eseguito in triplicato in 12 dosaggi da tre lotti di kit, era 0,05 U/ml.

Interferenze

L'emoglobina fino a 400 mg/dl, la bilirubina fino a 0,2 mg/ml, gli intralipidi fino a 15 mg/ml e il fattore reumatoide fino a 200 IU/ml non incidono sui risultati dell'anti-CCP.

LIMITI D'IMPIEGO

1. Sebbene la presenza di anticorpi contro il CCP sia associata all'artrite reumatoide, un risultato positivo di per sé non è indice diagnostico e i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. In alcuni soggetti possono essere presenti elevati livelli di anticorpi anti-CCP con scarsa o nessuna evidenza della patologia clinica. Per contro, in alcuni pazienti con malattia in atto, i livelli di questi anticorpi possono essere non rivelabili. La significanza clinica di questi dati non è stata tuttora chiarita.
3. Considerato che il risultato di un test anti-CCP non è prova diagnostica della presenza o dell'assenza della patologia clinica, non si deve iniziare la terapia solo sulla base di una positività CCP.
4. L'inizio o la modifica di una terapia non devono essere basati sulle variazioni della concentrazione autoanticorpale anti-CCP, bensì sulle osservazioni cliniche.
5. Non è stata definita l'efficacia clinica del monitoraggio dei livelli autoanticorpali CCP quale indice di progressione o remissione dell'artrite reumatoide.
6. Non è stato determinato il valore dell'anti-CCP nell'artrite giovanile.
7. Date le caratteristiche specifiche delle interazioni antigene-anticorpo, non è la concentrazione degli anticorpi ad essere determinata, bensì l'attività. Dal momento che il siero dei pazienti contiene popolazioni eterogenee di anticorpi, alcuni campioni possono essere caratterizzati da un grado di non linearità, in particolar modo ad elevate diluizioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Gough AKS, et al. *Lancet*, **344**, 23-27, 1994.
2. Smolen JS. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis (Section C). In *Manual of Biological Markers of Disease* (Eds. van Venrooij WJ, Maini RN), Kluwer Academic Publishers, 1996.
3. Barland P and Lipstein E. *Am J Med*, **100 (Suppl 2A)**, 16S-32S, 1996.
4. Nakamura RM. *J Clin Lab Anal*, **14**, 305-313, 2000.
5. Simon M, et al. *J Clin Invest*, **92**, 1387-1393, 1993.
6. Sebbag M, et al. *J Clin Invest*, **95**, 2672-2679, 1995.
7. Girbal-Neuhauser E, et al. *J Immunol*, **162**, 585-594, 1999.
8. Schellekens GA, et al. *J Clin Invest*, **101**, 273-281, 1998.
9. Schellekens GA, et al. *Arthritis Rheum*, **43(1)**, 155-163, 2000.
10. van Boekel MAM, et al. *Arthritis Res*, **4**, 87-93, 2002.

RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

1. Diluire 1:100 i campioni e i controlli positivo e negativo. Non diluire gli standard o il controllo di riferimento.
2. Aggiungere 100 µl di controllo di riferimento/standard in duplicato, i controlli positivo e negativo e i campioni prediluiti nei pozzetti marcati della strip di microtitolazione.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25°C.
4. Lavare le strip 3 volte.
5. Aggiungere 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto.
6. Incubare 30±5 minuti a 18-25°C.
7. Lavare le strip 3 volte.
8. Aggiungere 100 µl di substrato in ciascun pozzetto.
9. Incubare 30±5 minuti a 18-25°C.
10. Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
11. Leggere l'assorbanza a 550 nm.



For in vitro diagnostic use |
Pour diagnostic in vitro | Para uso diagnóstico in vitro |
In Vitro Diagnosticum | Per uso diagnostico in vitro



Catalogue number |
Numéro catalogue | Número de catálogo |
Bestellnummer | Numero di catalogo



Lot |
Lot | Lote |
Ch.-B. | Lotto



96 tests |
96 determinations | 96 pruebas |
96 Bestimmungen | 96 tests



Caution |
Avertissez | Adverta |
Verwarnen | Cautela



See instructions for use |
Voir les consignes d'utilisation | Ver las instrucciones de uso |
Gebrauchsinformation beachten | Vedere le istruzioni per l'uso



Use by |
Utiliser avant | Utilizar antes de |
Verwendbar bis | Scadenza



Store at 2-8°C |
Conserver à 2-8°C | Conservar a 2-8°C |
Lagerung bei 2-8°C | Conservare a 2-8°C



Manufactured by |
Fabriqué par | Fabricado por |
Hergestellt von | Prodotto da



Positive Control |
Témoin positif | Control Positivo |
Positiv-Kontrolle | Controllo Positivo



Negative Control |
Témoin négatif | Control Negativo |
Negativ-Kontrolle | Controllo Negativo