

AUTOSTAT™II Anti-Cyclic Citrullinated

Peptide (CCP)

Anti-CCP

REF FGA42



INTENDED USE

The Hycor 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 (including Serum Separator Tubes) or plasma (EDTA, lithium heparin, or sodium citrate). Detection of anti-CCP antibodies is used as an aid in the diagnosis of Rheumatoid Arthritis (RA), and should be used in conjunction with other clinical information. Autoantibody levels represent one parameter in a multi-criterion diagnostic process, encompassing both clinical and laboratory-based assessments. For in vitro diagnostic use.

INTRODUCTION

Rheumatoid Arthritis (RA) is a common, systemic autoimmune disease affecting 0.5-1.0% of the adult population. RA is characterised by chronic inflammation of the synovium which can lead to progressive joint destruction and in many cases lead to disability and reduction of quality of life.¹ It is generally accepted that early intervention is vital in preventing irreversible joint damage and it is therefore important to diagnose RA as early in the disease course as possible.^{2,3} 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).⁴ Although the RF test has good sensitivity, it is not specific for RA, as it is often present in healthy individuals and patients with other rheumatic or inflammatory diseases, autoimmune diseases or chronic infections.⁵ For several years, it has been recognised that antibodies to anti-perinuclear factor (APF) and keratin (AKA) are highly specific for RA. It was subsequently reported that both these antibodies reacted with native flaggrin and now are referred to as anti-flaggrin antibodies (AFA).^{6,7,8} Recent evidence has shown that all these antibodies are directed to citrulline containing epitopes.⁹ Citrulline is a non-standard amino acid, as it is not incorporated into proteins during protein synthesis. It can however be generated via post-translational modification of arginine residues by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD).¹⁰ In 1998, Schellekens and colleagues reported that autoantibodies reactive with linear synthetic peptides containing citrulline were highly specific for RA in an ELISA based assay.¹¹ Subsequent studies demonstrated that cyclic variants of these linear peptides, termed cyclic citrullinated peptides (CCP) were as specific for RA but with a higher sensitivity than the linear peptides.¹² In an effort to further improve the sensitivity of the CCP test, a dedicated library of citrulline-containing peptides was screened with RA sera and a new set of peptides (CCP2) was discovered which gave superior performance compared to the CCP1 test.¹³ Over the last few years many published reports have confirmed the diagnostic performance of the CCP2 test.¹⁴ Anti-CCP antibodies, which are also often termed as anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA's), have been found to be present very early in the disease, often with the absence of clinical symptoms and many reports indicate that elevated levels of anti-CCP antibodies can predict the development of erosive disease.^{15,16,17,18,19,20} These findings suggest an important role for cyclic citrullinated peptides in the diagnosis of RA at an early stage of the disease course.

In 2010 the *ACR / EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria* were published and replaced the "old" ACR criteria of 1987 which were widely considered not to be suitable for the early diagnosis of RA. The revised classification criteria, jointly published by the American College of Rheumatology (ACR) and the European League Against Rheumatism (EULAR) recommend a point scoring system of between 0 and 10. The new classification criteria are to be applied to every individual presenting with definitive synovitis (undifferentiated inflammatory Arthritis). The four additional criteria were number of joints involved, serologic abnormality, acute-phase response and duration of symptoms in the involved joints. For the first time the serologic criteria included measurement of ACPAs, such as anti-CCP, as well as some definition of a low positive and high positive serology result.²¹

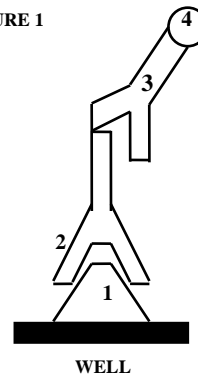
The Hycor Anti-CCP assay is an ELISA based on the detection of autoantibodies in human serum or plasma towards a synthetic cyclic peptide containing modified arginine residues (CCP2 peptides). The test provides an additional tool in the diagnosis of patients with RA.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with a highly purified synthetic cyclic citrullinated 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 polyclonal 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 and 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 Calibrators. See figure 1 below:

FIGURE 1



COLORLESS

BLUE

ADD STOP SOLUTION

YELLOW

- 1. Antigen
- 2. Analyte
- 3. Enzyme Conjugate
- 4. Substrate

KIT COMPONENTS

CONJ	1 x 15 ml	Horseshradish peroxidase-labelled goat polyclonal antibody to human IgG, 0.1% (w/v) p-Hydroxyphenylacetic acid, 0.15% (w/v) Proclin and 1% protein (bovine) stabiliser (w/v) in a HEPES buffer. Ready-to-use. N.B. IRRITANT
SUBS	1 x 15 ml	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage. N.B. HARMFUL
SOLN STOP	1 x 15 ml	Sulphuric acid 0.25mol/L aqueous solution Ready-to-use.
BUF WASH 10 X	3 x 25 ml	Phosphate buffered saline, 1.3% (v/v) Tween 20 Dilute before use.
MT PLATE	8 x 12 well microtitre (breakapart) strips	Coated with synthetic cyclic citrullinated peptide, in a resealable foil pack with desiccant.
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25 ml	Phosphate buffer, protein (bovine) stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use. N.B. HARMFUL
CAL 1	1 x 1 ml	Phosphate buffer, protein (bovine) stabiliser, < 0.1% (w/v) sodium azide. 0 U/mL. Ready-to-use.
CAL 2 - CAL 6	5 x 1 ml	Human plasma, Phosphate buffer, protein (bovine) stabiliser, < 0.1% (w/v) sodium azide. 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Ready-to-use.
CONTROL REF	1 x 1.5 ml	Human plasma, buffer, < 0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.
CONTROL +	1 x 0.3 ml	Human plasma, < 0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:100 with diluted Sample Diluent before use, as for samples.
CONTROL -	1 x 0.3 ml	Human plasma, < 0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:100 with diluted Sample Diluent before use, as for samples.

STORAGE OF REAGENTS

Opened (In-Use) Kit Stability

A kit was opened, and reused on three occasions over a three month period with no adverse effect on kit performance. Following use, components must be returned to storage at 2-8°C.

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. Ensure microbial contamination of the diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent is avoided and return to 2-8°C after testing.
6. Replace surplus (unused) microtitre strips in the foil pack with the desiccant. Ensure seal is integral and return to 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 colourless to very pale blue in colour. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded. If crystals are visible in the wash or sample diluent on removal from cold storage, these will dissolve upon inversion and equilibration to room temperature.

Sample Collection and Storage

The assay is recommended for human serum (including serum separator tube (SST)) or plasma (EDTA, lithium heparin, or sodium citrate) samples. Other tube types have not been tested for use in the assay. 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. For preparation for analysis follow the tube manufacturer's instructions for the collection tubes. Samples may be stored undiluted at 2-8°C for four weeks; for longer storage store at -20°C or lower. Samples diluted at 1:100 in diluted Sample Diluent must be used within the 24 hours 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. Calibrators 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 or HCV RNA and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Calibrators and Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) approved guidelines "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections" (M29-A3 – Third Edition),²² describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice.
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 Calibrators, Controls and Sample Diluent 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.
7. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Hycor Biomedical.

CONJ Irritant

R43: May cause sensitisation by skin contact.
 S24: Avoid contact with skin.
 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.

SUBS Harmful

R20/21/22: Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
 R36/37/38: Irritating to eyes, respiratory system and skin.
 S23: Do not breathe vapour.
 S24/25 Avoid contact with skin and 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.
 S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

SAMPLE DIL 5 X 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.
 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.

PREPARATION

Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 450 nm filter.
2. Precision pipettes to dispense 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatic pipette to dispense 100 µL. Automatic pipette to dispense 300 µL for manual washing; automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1×100 mL, 1×500 mL.
4. 1 mL volume containers.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. 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	Vol	Add
Wash Buffer Concentrate	1 vial	225 ml distilled/deionised water
Sample Diluent Concentrate	1 vial	100 ml distilled/deionised water
Positive/Negative Controls/ Samples	10 µl	1 ml 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: assay Reference Control, Positive and Negative Controls, and samples.

Semi-Quantitative protocol: assay Calibrators (1-6), Positive and Negative Controls, and samples.

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100 µL Reference Control/Calibrators in duplicate, pre-diluted (1:100) Positive and Negative Controls, in duplicate, and pre-diluted (1:100) patient samples in duplicate into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed **10 minutes** for any one set of Calibrators /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 **four times** with a minimum of 300 µL diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100 µL Conjugate to each well.
7. Incubate 30 ± 5 minutes at 18-25°C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100 µL Substrate to each well.
10. Incubate 30 ± 5 minutes at 18-25°C. **Do not decant.**
11. Add 100 µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate addition. Tap wells gently to mix and ensure there are no visible bubbles.
12. Read strips at 450 nm.
13. Read the assay within 60 minutes of completion of the test.

CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

Consider each assay separately when calculating and interpreting results.

Qualitative Protocol

Calculate the mean absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample to the mean Reference Control Absorbance Value:

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

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 Hycor clinical trial suggest the following cut-off:

Absorbance Ratio	Result Interpretation
< 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 Calibrator against log₁₀ Calibrator concentration (see following table) on suitable graph paper. Mean concentrations of Positive and Negative Controls and samples can then be read from the calibration curve; a typical calibration curve plot is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results. 4-parameter logistic (4PL) and Cubic Spline curve-fits are satisfactory. Other curve-fit models are not recommended.

Samples with absorbances above Calibrator 6 (300 U/mL) are outside the range of the assay, and should be reported as > 300 U/mL, diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

For the interpretation of Semi-Quantitative results and on the basis of the Hycor reference* population data the following is suggested.

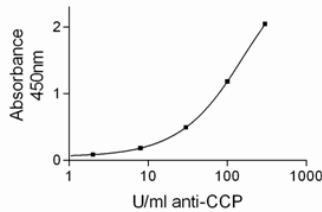
Mean Sample Result	Result Interpretation
≤ 5 U/mL	Negative
> 5 U/mL	Positive

*This is suggested as a guideline only. It is recommended that users establish a reference range, which may be unique to the population.

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.

Calibrator Concentration	
Calibrator Number	Concentration U/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Typical Calibration 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	Specification
Qualitative (ratios)	Positive Control Absorbance ≥ 1.1 Reference Control Absorbance
	Negative Control Absorbance < 0.95 Reference Control Absorbance
Semi-Quantitative	See Positive Control acceptance expected range (U/ml) Negative Control concentration < 2 U/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.

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 ± 0.419 U/mL (range 0.05-3.8 U/mL).

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

Reference Range

≤ 5 U/ml = Negative

> 5 U/ml = Positive

This reference range is suggested as a guideline only and each laboratory should establish a reference range, which may be unique to the population it serves depending upon geographical, patient, dietary, environmental factors or clinical practice. Please note that Rheumatoid Arthritis is twice as prevalent in females as in males.

PERFORMANCE DATA

Dilution Linearity

The Hycor Anti-CCP assay is designed to be linear across the measurement range from LOD to 300 U/mL.

Based on a study performed by guidance from the CLSI document EP6-A,²³ the Hycor Anti-CCP assay demonstrated linearity from 1.04 U/mL to 300 U/mL.*

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Samples > 300 U/mL exhibit mean recovery of ≤ 100% ± 15%* of the expected result when diluted into the assay range and using the correct dilution factor.

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data

Clinical Sensitivity and Specificity

The clinical sensitivity of the Hycor Anti-CCP assay was determined for 229 confirmed RA individuals, and clinical specificity was determined for 285 non-RA specimens (135 from patients with other rheumatic and non-rheumatic disorders and 150 from asymptomatic apparently healthy individuals). Using a cut-off of 5.0 U/mL, the sensitivity was calculated to be 78% with a specificity of 99%. The results are summarized in the following tables.*

Specimen Category	Total n	Positive n	% Sensitivity
RA	229	179	78

Specimen Category	Total n	Positive n	% Sensitivity
Non-RA Specimens in Total	285	4	98.6
Non-RA Healthy Asymptomatic	150	1	99.3
Non-RA Disease Specimens [†]	135	3	97.8

Clinical specificity for 135 specimens from patients with other rheumatic and non-rheumatic disorders is categorised in the following table.

Non-RA Disease Specimens	Total n	Positive n	Clinical Sensitivity (%)
Total	135	3	97.8
Inflammatory Polyarthritis	41	1	97.6
EBV IgG Positive	18	1	94.4
Hashimoto's Thyroiditis	17	0	100
Sjögren's Syndrome	16	1	93.8
Systemic Lupus Erythematosus	16	0	100
Vasculitis	5	0	100
Scleroderma	5	0	100
Osteoarthritis	4	0	100
Crohn's Disease	3	0	100
Raynaud's Phenomenon	3	0	100
Ulcerative Colitis	2	0	100
Psoriatic Arthritis	2	0	100
Reactive Arthritis	1	0	100
Ankylosing Spondylitis and Polymyositis	2	0	100

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

METHOD COMPARISON

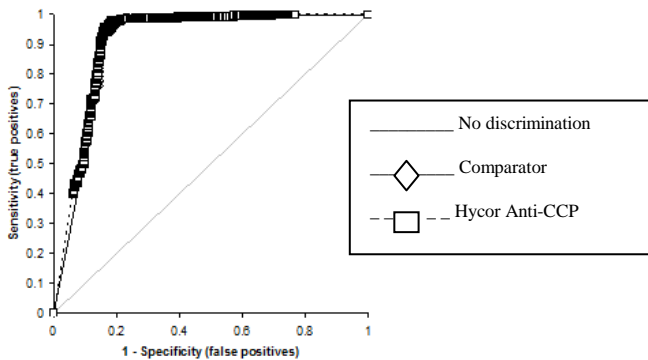
The Hycor Anti-CCP assay is designed to have a concordance of $\geq 99\%$ for RA and non-RA specimens when compared to a comparator Anti-CCP assay. The RA and non-RA specimens described in the Clinical Sensitivity and Specificity section were used to compare the Hycor Anti-CCP assay to the comparator Anti-CCP assay. The cut-off employed for the comparator Anti-CCP assay was 5.0 U/mL, as stated in the manufacturer's package insert. Using a cut-off of 5.0 U/mL for the Hycor Anti-CCP assay, the concordance was calculated to be 99%. The results are summarized in the following tables.*

All samples (514)	Hycor	Comparator	
		Positive	Negative
		Positive	179
Negative	1	330	

Comparison Method	Hycor vs Comparator
Number of specimens	65
Slope of regression line	0.910
Y-intercept	1.226
Correlation coefficient	0.94

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

A Receiver Operator Characteristic (ROC) analysis was carried out using the above data obtained for the two assays. The area under the curve (AUC) for the Hycor Anti-CCP assay was 0.910 (95% confidence interval: 0.881-0.940) and 0.903 (95% confidence interval: 0.871-0.934) for the comparator Anti-CCP assay thus indicating that both assays are comparable with respect to their clinical differentiation. The ROC analysis curve is shown below.*



*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Precision

A study was performed with guidance from the CLSI (formerly NCCLS) Document EP5-A2.²⁴ Two anti-CCP controls, six QC panel members and one human serum sample were assayed using two lots of reagents, in replicates of two, at two separate times per day for 20 days (n=80). Data from this study are summarised in the following table as representative data (rounded to 1 decimal place):

Sample	Kit Lot	n	Mean (U/ml)	Within Run		Between Run		Between Day		Total	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Pos Control	001	80	20.30	1.05	5.2	1.24	6.1	0.00	0.0	1.63	8.0
	003	80	20.62	0.43	2.1	1.20	5.8	0.00	0.0	1.27	6.2
QC 1	001	80	3.72	0.33	8.8	0.17	4.5	0.13	3.6	0.39	10.5
	003	80	3.92	0.23	5.8	0.35	8.9	0.04	1.1	0.42	10.7
QC 2	001	80	8.17	0.34	4.2	0.72	8.8	0.00	0.0	0.80	9.8
	003	80	8.47	0.30	3.6	0.70	8.3	0.25	2.9	0.80	9.5
QC 3	001	80	15.30	0.37	2.4	0.93	6.0	0.30	1.9	1.04	6.8
	003	80	15.98	0.36	2.2	0.92	5.8	0.00	0.0	0.99	6.2
QC 4	001	80	53.55	2.30	4.3	3.19	6.0	1.71	3.2	4.29	8.0
	003	80	55.49	2.36	4.2	3.35	6.0	0.00	0.0	4.09	7.4
QC 5	001	80	94.26	3.17	3.4	7.31	7.8	2.01	2.1	8.22	8.7
	003	80	97.15	2.61	2.7	5.56	5.7	4.79	4.9	7.79	8.0
QC 6	001	80	134.77	4.58	3.4	5.84	4.3	5.74	4.3	9.38	7.0
	003	80	142.41	5.69	4.0	9.02	6.3	0.00	0.0	10.67	7.5
Ref Control	001	80	5.18	0.34	6.6	0.24	4.6	0.21	4.0	0.46	9.0
	003	80	5.09	0.26	5.1	0.21	4.1	0.21	4.2	0.39	7.7
Sample 1	001	80	4.83	0.16	3.3	0.38	7.9	0.24	5.0	0.48	9.9
	003	80	4.77	0.20	4.1	0.37	7.8	0.25	5.2	0.49	10.2

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data

Limit of Detection

The limit of detection (LOD) of the Hycor Anti-CCP assay according to the CLSI (formerly NCCLS) Document EP17-A²⁵ was found to be 1.04 U/mL*.

LOD determinations were performed using one negative anti-CCP sample (60 replicates) and six low-level anti-CCP samples (15 replicates each).

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

High Dose Hook

High dose hook is a phenomenon whereby very high level specimens may read within the dynamic range of the assay. For the Hycor Anti-CCP assay, no high dose hook effect was observed when a sample containing approximately 3000 U/mL of anti-CCP antibody was assayed.*

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Interference

The Hycor Anti-CCP assay is designed to have a maximum deviation in anti-CCP concentration from the following potentially interfering compounds within:

- $\pm 15\%$ for anti-CCP concentrations ≥ 10.0 U/mL
- $\pm 10\%$ for anti-CCP concentrations ≥ 4.0 U/mL to < 10.0 U/mL
- < 0.75 U/mL for anti-CCP concentrations < 4.0 U/mL

A study was performed based on guidance from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document EP7-A2²⁶ for the Hycor Anti-CCP assay. Six samples with anti-CCP levels across the assay range were supplemented with the potentially interfering compounds listed in the table below. The maximum deviation of anti-CCP concentration observed in samples during these studies ranged from:

- -9.4% to 3.3% for anti-CCP concentrations ≥ 10.0 U/mL
- -7.3% to 4.8% for anti-CCP concentrations ≥ 4.0 U/mL to < 10.0 U/mL
- -0.6 U/mL to 0.05 U/mL for anti-CCP concentrations < 4.0 U/mL*

Potential Interfering Substance	No interference found up to the following concentration
Haemoglobin	4 mg/mL
Bilirubin	0.2 mg/mL
Triglyceride (Intralipid Solution)	15 mg/mL
Rheumatoid Factor	200 IU/mL
Total Protein	120 mg/mL

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

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.

USAGE PREVU

Le test anti-CCP Hycor est un dosage immunoenzymatique semi-quantitatif/qualitatif sur support solide (ELISA) utilisé pour détecter la classe d'IgG des auto-anticorps propres aux peptides citrulinés (CCP) du sérum (dont les tubes à gel séparateur de sérum [TSS]) ou du plasma humain (EDTA, héparinate de lithium ou citrate de sodium). La détection des anticorps anti-CCP sert de support au diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR), et doit être utilisée en association avec d'autres informations cliniques. Les taux d'auto-anticorps représentent un paramètre dans le cadre d'un processus diagnostique multicritères comprenant des évaluations cliniques et en laboratoire. Pour l'usage diagnostique *in vitro*.

INTRODUCTION

La PR est une maladie systémique auto-immune fréquente qui touche 0,5 à 1,0 % de la population adulte. La PR se caractérise par une inflammation chronique du tissu synovial qui peut entraîner une destruction articulaire progressive et dans de nombreux cas, un handicap et une détérioration de la qualité de vie.¹ On s'accorde généralement à dire qu'une intervention précoce est essentielle dans la prévention de dommages articulaires irréversibles et il est par conséquent important de diagnostiquer la PR dès que possible au cours de la maladie.^{2,3} Le diagnostic de la PR repose essentiellement sur des caractéristiques cliniques, radiologiques et immunologiques. Le test sérologique le plus commun est la mesure du facteur rhumatoïde (FR).⁴ Bien que le test du FR présente une bonne sensibilité, le FR n'est pas propre à la PR puisqu'on le retrouve chez les personnes en bonne santé et les patients atteints d'autres maladies rhumatismales, inflammatoires ou auto-immunes ou encore d'infections chroniques.⁵

Pendant de nombreuses années, les anticorps anti-facteur pérucléaire (FAP) et anti-kératine (AKA) ont été considérés comme très spécifiques à la PR. On a ensuite signalé que ces deux anticorps réagissaient à la filaggrine native et on les appelle aujourd'hui « anticorps anti-filaggrine » (AAF).^{6,7,8} De récentes preuves ont mis en évidence le fait que tous ces anticorps visent les épitopes contenant de la citrulline.⁹ La citrulline est un acide aminé non standard étant donné qu'elle n'est pas incorporée aux protéines au cours de la synthèse protéique. On peut toutefois le générer via modification post-transitionnelle de résidus arginine par l'enzyme peptidylarginine déiminase (PAD).¹⁰ En 1998, Schellekens et ses collaborateurs ont signalé que les auto-anticorps réactifs aux peptides synthétiques linéaires contenant de la citrulline étaient très spécifiques à la PR au cours d'un dosage ELISA.¹¹ Les études ultérieures ont démontré que les variantes cycliques de ces peptides linéaires, appelées peptides cycliques citrulinés (CPP) étaient aussi spécifiques à la PR, mais avec une sensibilité supérieure aux peptides linéaires.¹² En vue d'améliorer davantage la sensibilité du test CCP, on a filtré une bibliothèque spéciale de peptides contenant de la citrulline sur base de sérums de PR et on a découvert un nouveau groupe de peptides (CCP2) offrant une meilleure performance que le test CCP1.¹³ Ces dernières années, nombre de rapports publiés ont confirmés la performance diagnostique du test CCP2.¹⁴ On a mis en évidence la présence d'anticorps anti-CCP (également souvent appelés « anticorps anti-protéines/peptides citrulinés[e]s [ACPA] ») très tôt au cours de la maladie, souvent en l'absence de symptômes cliniques et nombre de rapports indiquent que des taux élevés d'anticorps anti-CCP peuvent permettre de pronostiquer le développement d'une maladie érosive.^{15,16,17,18,19,20} Ces résultats suggèrent un rôle important des peptides cycliques citrulinés dans le diagnostic de la PR à un stade précoce de la maladie.

En 2010, les critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde du Collège américain de rhumatologie (American College of Rheumatology ou ACR) et de la ligue européenne contre le rhumatisme (European League Against Rheumatism ou EULAR) (*ACR/EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria*) ont été publiés et ont remplacés les « anciens » critères de l'ACR de 1987 considérés, de l'avis général, comme ne permettant pas un diagnostic précoce de la PR. Les critères révisés de classification, conjointement publiés par l'ACR et l'EULAR, recommandent un système de notation entre 0 et 10. Les nouveaux critères de classification sont à appliquer à chaque individu présentant une synovite définitive (arthrite inflammatoire indifférenciée). Les quatre critères supplémentaires étaient le nombre d'articulations touchées, les anomalies sérologiques, la réponse de la phase aiguë et la durée des symptômes sur les articulations touchées. Pour la première fois, les critères sérologiques comprenaient la mesure des ACPA, tels que les anti-CCP, ainsi qu'une certaine définition d'un résultat sérologique positif faible et élevé.²¹

Le dosage anti-CCP Hycor est un test ELISA reposant sur la détection des auto-anticorps du sérum ou du plasma humain avec un peptide cyclique synthétique contenant des résidus arginine modifiés (peptides CCP2). Le test représente un outil supplémentaire pour le diagnostic des patients atteints de PR.

PRINCIPE DU DOSAGE

Les puits des barrettes de microplaque sont recouverts d'un peptide citruliné synthétique très purifié contenant des résidus arginine modifiés. Pendant la première incubation, des auto-anticorps spécifiques du sérum ou du plasma dilué se lient à la surface enrobée d'antigènes. On va ensuite les puits pour éliminer les composants non liés. Au cours de la deuxième incubation, le conjugué (Conjugate), anticorps polyclonal d'anti-IgG humaine marqué à l'enzyme, se lie à tous les auto-anticorps liés à la surface. Après un nouveau lavage, on détecte les auto-anticorps spécifiques par incubation avec le substrat (Substrate). L'ajout de solution d'arrêt (Stop Solution) arrête la réaction, ce qui donne un produit fini coloré, et on mesure la quantité de conjugué lié dans des unités d'absorbance. Dans le cadre du protocole qualitatif, on compare la quantité de conjugué lié par l'échantillon avec celle liée par le témoin de référence (reference Control). Dans le cadre du protocole semi-quantitatif, il est possible d'estimer la concentration d'auto-anticorps

anti-CCP par interpolation à partir d'une courbe dose-réponse établie sur base d'étalons (Calibrators).

COMPOSANTS DE LA TROUSSE

CONJ	1 x 15 ml	Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG humaine marqué à la peroxydase du raifort, 0,1 % (p/v) d'acide p-hydroxyphénylacétique, 0,15 % (p/v) de procline et 1 % de stabilisateur de protéines (bovines) (p/v) dans un tampon HEPES. Prêt à l'emploi. N.B. IRRITANT
SUBS	1 x 15 ml	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, solution tampon. Prêt à l'emploi. Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation. N.B. NOCIF
SOLN STOP	1 x 15 ml	Acide sulfurique 0,25 mol/L en solution aqueuse Prêt à l'emploi.
BUF WASH 10 X	3 x 25 ml	Tampon phosphate salin, 1,3 % (v/v) Tween 20 Diluer avant l'emploi.
MT PLATE	Barrettes (détachables) de microplaque à 8 x 12 puits	Enrobées de peptide cyclique citruliné synthétique, sous emballage refermable en feuille d'aluminium avec dessiccatif
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25 ml	Tampon phosphate, stabilisateur de protéines (bovines), 0,5 % (p/v) d'acide de sodium. Diluer avant l'emploi. N.B. NOCIF
CAL 1	1 x 1ml	Tampon phosphate, stabilisateur de protéines (bovines), < 0,1 % (p/v) d'acide de sodium. 0 U/mL. Prêt à l'emploi.
CAL 2 - CAL 6	5 x 1 ml	Plasma humain, tampon phosphate, stabilisateur de protéines (bovines), < 0,1 % (p/v) d'acide de sodium. 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Prêt à l'emploi.
CONTROL REF	1 x 1.5 ml	Plasma humain, tampon, < 0,1 % (p/v) d'acide de sodium. Prêt à l'emploi.
CONTROL +	1 x 0.3 ml	Plasma humain, < 0,1 % (p/v) d'acide de sodium. Diluer à 1:100 avec du diluant d'échantillon (Sample Diluent) dilué avant l'emploi, comme pour les échantillons.
CONTROL -	1 x 0.3 ml	Plasma humain, < 0,1 % (p/v) d'acide de sodium. Diluer à 1:100 avec du diluant d'échantillon (Sample Diluent) dilué avant l'emploi, comme pour les échantillons.

CONSERVATION DES REACTIFS

Stabilité de la trousse ouverte

Une trousse a été ouverte et réutilisée à trois reprises sur une période de trois mois sans effet indésirable sur la performance de la trousse. Après utilisation, les composants doivent être de nouveau stockés à une température comprise entre 2 et 8° C.

Remarques relatives à la manipulation et à l'utilisation

1. Les composants de la trousse doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C. Leur utilisation est autorisée jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser de réactifs dont la date de péremption est dépassée.
2. Ne pas mélanger différents numéros de lots.
3. Ne pas congeler les trousses.
4. Il faut diluer le tampon de lavage concentré (Wash Buffer Concentrate), le diluant d'échantillon concentré (Sample Diluent Concentrate) et les témoins positif et négatif (Positive and Negative Controls) avant l'emploi. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Vérifier l'absence de toute contamination microbienne du tampon de lavage dilué et du diluant d'échantillon dilué puis conserver à nouveau entre 2 et 8 °C après analyse.
6. Remettre les barrettes de microplaque en trop (inutilisées) dans l'emballage en alu avec le dessiccatif. Vérifier que l'emballage est bien fermé et conserver à nouveau entre 2 et 8 °C jusqu'à la prochaine utilisation.
7. Ne pas exposer le substrat à la lumière pendant la conservation.
8. Éviter de contaminer les réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette jetable lors de chaque manipulation de réactif ou d'échantillon.

Signes de détérioration

Le substrat doit être incolore à bleu très clair. Les turbidités ou précipités de tout composant indiquent une détérioration et il faut alors jeter le composant.
En présence de cristaux dans le tampon de lavage ou le diluant d'échantillon à la sortie de l'entreposage au froid, ceux-ci se dissolvent à l'inversion et l'équilibrage à température ambiante.

Recueil et conservation des échantillons

Le dosage est recommandé pour le prélèvement de sérum (dont les tubes avec gel séparateur de sérum[SST]) ou le plasma (tubes EDTA, avec héparinate de lithium ou citrate de sodium) humain. Les autres types de tubes n'ont pas été testés quand à une utilisation dans le cadre d'un dosage. Ne pas utiliser d'échantillons grossièrement hémolysés ou turbides. Bien mélanger les échantillons décongelés avant dosage et éviter de congeler/décongeler à répétition. Ne pas décomplémenter les échantillons, cela peut générer des résultats faussement positifs.

Pour préparer l'analyse, suivre les instructions du fabricant sur le tube quant aux tubes de prélèvement. Les échantillons peuvent être conservés non dilués entre 2 et 8 °C pendant quatre semaines ; pour une conservation plus longue, entreposer à -20 °C ou moins. Il faut utiliser les échantillons dilués à 1:100 dans du diluant d'échantillon dilué dans les 24 heures suivant la dilution.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

N'utiliser que pour le diagnostic in vitro.

Précautions d'emploi

- Il est impératif de se conformer strictement à ce mode d'emploi, en particulier en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
- Les étalons et témoins contiennent du plasma humain testé par dosages approuvés par la FDA pour le HBsAG (antigène de surface de l'hépatite B), l'acide ribonucléique ou ARN du VIH-1 (HIV-1 RNA) ou l'antigène du VIH-1 (HIV-1 Ag), les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 (anti-HIV-1/HIV-2), et les anticorps anti-VHC (anti-HCV) ou l'ARN du VHC (HCV RNA) et avérés non-réactifs/négatifs. Comme aucun test connu ne permet de déterminer avec certitude l'absence d'agents infectieux, les étalons et témoins doivent être considérés potentiellement infectieux et manipulés avec les mêmes précautions que tout autre matériau potentiellement nocif pour l'organisme. Les recommandations approuvées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sur la Protection du personnel de laboratoire contre les infections acquises dans le cadre de leur emploi (Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections) (M29-A3 –Troisième édition)²² décrivent la méthode de manipulation de ces matériaux conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL).
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas fumer, manger, boire ou appliquer de cosmétiques dans les zones où les trousses et les échantillons sont manipulés.
- Il convient de protéger convenablement toute affection, coupure ou éraflure cutanée et autres lésions cutanées.
- Les étalons et témoins ainsi que le diluant d'échantillon concentré contiennent de l'acide de sodium. Celui-ci peut réagir avec les tuyaux en plomb ou en cuivre et former des azides de métal très explosifs. Lors de l'élimination, vider avec une grande quantité d'eau pour éviter toute accumulation d'azide.
- Les fiches de sécurité associées à tous les composants dangereux contenus dans cette trousse sont disponibles sur demande auprès de Hycor Biomedical

CONJ Irritant

R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
S24 : Éviter tout contact avec la peau.
S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un dispositif de protection des yeux/du visage

SUBS Nocif

R20/21/22 : Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
R36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.
S23 : Ne pas respirer les vapeurs.
S24/25 : Éviter le contact avec la peau et 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 toutes les précautions d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un dispositif de protection des yeux/du visage.
S46 : En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

SAMPLE DIL 5 X 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.
S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un dispositif de protection des yeux/du visage.
S46 : En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

PREPARATION

Matériel/équipement nécessaire, mais non fourni

- Lecteur à filtre 450 nm pour barrette/microplaque à 96 puits.
- Pipettes de précision délivrant 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipette automatique délivrant 100 µL. Pipette automatique délivrant 300 µL pour lavage manuel ; nettoyeur automatique de microplaque en option.
- Éprouvette graduée à pied en verre/plastique : 1×100 mL, 1×500 mL.
- Récipients 1 mL.
- Eau distillée/désionisée.
- Serviettes en papier.
- Minuteur pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation au dosage

Laisser tous les composants de la trousse, y compris les barrettes de microplaque, passer entre 18 et 25 °C pendant 30 à 60 minutes avant l'emploi. Mélanger les réactifs par une inversion en douceur.

Ne pas diluer le témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

Réactif	Vol	Ajouter
Tampon de lavage concentré	1 flacon	225 ml d'eau distillée/désionisée
Diluant d'échantillon concentré	1 flacon	100 ml d'eau distillée/désionisée
Témoins positif et négatif/échantillons	10 µl	1 ml de diluant d'échantillon dilué

Calculer le nombre de barrettes de microplaque nécessaires pour le dosage en cours et les maintenir dans le support pour barrette de microplaque. Remettre les barrettes en trop dans l'emballage refermable en alu avec le dessiccant et conserver celui-ci entre 2 et 8 °C jusqu'à la prochaine utilisation. Vérifier que toutes les barrettes sont bien maintenues dans le support pour barrettes de microplaque. Il se peut que les utilisateurs souhaitent numéroter chaque barrette dans le coin supérieur pour les aider à l'identification. Garder le support pour barrette de microplaque en vue d'autres utilisations.

PROTOCOLE DE DOSAGE

Protocole qualitatif : dosage du témoin de référence, des témoins positif et négatif ainsi que des échantillons.

Protocole semi-quantitatif : dosage des étalons (1 à 6), des témoins positif et négatif ainsi que des échantillons.

- Puits de référence pour identification.
- Pipeter 100 µL de témoin de référence/d'étalons en double, de témoins positif et négatif pré-dilués (à 1:100) en double et d'échantillons patients pré-dilués (à 1:100) en double dans les puits appropriés. Ne pas oublier de changer d'embouts de pipettes entre les différents ajouts. Cette étape ne doit pas prendre plus de **10 minutes** pour chaque lot d'étalons/témoins/échantillons.
- Incuber 60 ± 10 minutes entre 18 et 25 °C.
- Décanté le contenu des barrettes par inversion rapide au-dessus d'un évier adapté à l'élimination des matériaux biologiques en gardant à l'esprit le risque infectieux potentiel des échantillons. Bien sécher les barrettes retournées avec des serviettes en papier.
- Laver les puits **quatre fois** avec au moins 300 µL de tampon de lavage dilué. **Décanté et séché après chaque étape de lavage.**
- Ajouter 100 µL de conjugué à chacun des puits.
- Incuber 30 ± 5 minutes entre 18 et 25 °C.
- Répéter les étapes 4 et 5.
- Ajouter 100 µL de substrat à chacun des puits.
- Incuber 30 ± 5 minutes entre 18 et 25 °C. **Ne pas décanter.**
- Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chacun des puits, dans le même ordre et au même débit que l'ajout de substrat. Tapoter doucement pour mélanger et s'assurer qu'il n'y a pas de bulle.
- Lire les barrettes à 450 nm.
- Lire le dosage 60 minutes maximum après le test.

CALCIL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

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

Protocole qualitatif

Calculer le rapport de la valeur d'absorbance (densité optique) moyenne pour les témoins positif et négatif puis pour chaque échantillon par rapport à la valeur d'absorbance moyenne du témoin de référence :

$$\text{Rapport d'absorbance} = \frac{\text{Valeur moyenne de l'échantillon ou d'absorbance du témoin}}{\text{Valeur moyenne d'absorbance du témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer entre les échantillons positifs et négatifs un seuil propre à leurs populations de patients. Les résultats établis à partir des populations de patients exploités dans le cadre de l'essai clinique Hycor tendent à indiquer le seuil suivant

Rapport d'absorbance Interprétation des résultats

< 0.95	Négatif
≥ 0.95 to ≤ 1.0	Ambigu : renouvellement du test recommandé
> 1.0	Positif

Protocole semi-quantitatif

Tracer la valeur moyenne d'absorbance de chaque étalon par rapport à la concentration enregistrée₁₀ de l'étalon (cf. tableau suivant) sur une feuille millimétrée adaptée. On peut ensuite lire les concentrations positives et négatives moyennes de témoins et d'échantillons sur la courbe d'étalonnage ; un tracé d'étalonnage type est présenté ci-dessous à titre d'exemple, il ne faut pas l'utiliser pour interpréter des résultats. Les ajustements des courbes logistique à 4 paramètres (4PL) et splines cubiques sont satisfaisants. Les autres modèles d'ajustement ne sont pas recommandés

Les échantillons à absorbances supérieures à l'étalon 6 (300 U/mL) se situent hors de la plage de dosage et il faut les signaler comme contenant > 300 U/mL, étant dilués et redosés, pour corriger ce facteur de dilution.

Pour l'interprétation des résultats semi-quantitatifs et en se basant sur les données de la population de référence* Hycor, on suggère la plage de référence suivante :

Valeur moyenne du résultat de l'échantillon Interprétation du résultat

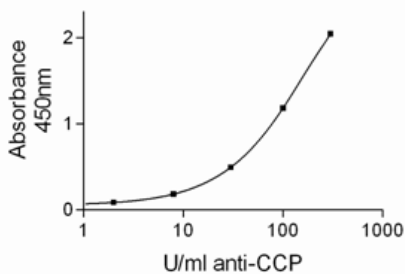
≤ 5 U/mL	Négatif
> 5 U/mL	Positif

*Cette plage de référence a seulement valeur de recommandation. Il est recommandé aux utilisateurs d'établir leur propre plage de référence, qui peut s'appliquer à une seule population.

NB : Comme dans le cadre de tout dosage mesurant les anticorps, ce dosage détermine l'activité de l'anticorps présent dans l'échantillon plutôt que la concentration. L'activité peut varier en fonction d'un certain nombre de paramètres, tels que l'avidité des anticorps.

Concentrations d'étalons	
Numéro d'étalon	Concentration U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Courbe type d'étalonnage



CONTRÔLE QUALITÉ

Veiller à ce que l'entretien et l'étalonnage du lecteur de microplaque soient effectués conformément aux instructions du fabricant et que la bonne longueur d'ondes soit appliquée.

Les utilisateurs doivent veiller à respecter strictement les instructions relatives à ce dosage, en particulier celles contenues dans les sections Mises en gardes et précautions et Remarques relatives à la manipulation et à l'utilisation. Avant de communiquer les résultats des tests des patients, l'utilisateur doit démontrer qu'il peut obtenir des caractéristiques de performance en termes de précision et une plage de validité des résultats de test comparables à ceux établis par le fabricant. Il est recommandé de lancer les témoins positif et négatif pré-dilués en double pour tous les dosages afin de suivre la qualité de la procédure de test. Lancer le témoin de référence prêt à l'emploi en double pour tous les dosages qualitatifs.

En supposant que les spécifications de précision décrites par le fabricant sont respectées, si un quelconque témoin ne respecte pas les spécifications relatives au rapport de témoin ci-dessous, le dosage s'avère non valable et il ne faut pas communiquer les résultats patient. L'utilisateur peut répéter le dosage après avoir examiné sa procédure ou contacté le distributeur/fabricant. En cas de nouveau dosage, préparer une autre dilution de chaque témoin et échantillon. Il se peut que les laboratoires souhaitent inclure des témoins internes à chaque cycle de dosage. Conserver un tel matériel de contrôle à -20 °C ou moins et éviter les cycles de congélation/décongélation à répétition. Les conservateurs tels que l'azide de sodium à 0,1 % (p/v) n'influent pas sur les résultats de l'échantillon. Les taux d'analytes identifiés dans telle ou telle maladie sont ceux établis par le fabricant pour des populations déterminées et ne reflètent pas nécessairement les textes de référence. Il faut calculer les taux d'incidence, leur relation avec certaines maladies, les plages de référence et les seuils appropriés pour telle ou telle population couverte par les utilisateurs.

Spécifications du rapport de témoin

Protocole	Spécifications
Qualitatif (rapports)	$\frac{\text{Absorbance du témoin positif}}{\text{Absorbance du témoin de référence}} \geq 1.1$
	$\frac{\text{Absorbance du témoin négatif}}{\text{Absorbance du témoin de référence}} < 0.95$
Semi-quantitatif	Cf. le témoin positif plage d'acceptation attendue (U/mL) Concentration du témoin négatif < 2 U/mL

VALEURS ATTENDUES

200 échantillons sériques issus de donneurs asymptomatiques apparemment sains âgés de 18 à 72 ans, comprenant approximativement le même nombre d'hommes [n = 105] et de femmes [n = 95], ont été testés.

On n'a pas observé de différences imputables au sexe ou à l'âge (tranches d'âge comparatives calculées ≤ 40 ans [n = 115] et > 40 ans [n = 85]).

La concentration anti-CCP globale moyenne pour cette population était de 0,63 ± 0,419 U/mL (plage de 0,05 à 3,8 U/mL).

Sur base de ces données de la population de référence et de celles d'une population clinique, on propose le dosage suivant :

Plage de référence

≤ 5 U/ml = négatif

> 5 U/ml = positif

Cette plage de référence a seulement valeur de recommandation et tous les laboratoires doivent établir une plage de référence qui puisse être unique pour la population aux besoins de laquelle elle répond, en fonction de facteurs géographiques, relatifs aux patients, alimentaires, environnementaux ou dépendant de la pratique clinique. Noter que la polyarthrite rhumatoïde est deux fois plus prévalente chez les femmes que chez les hommes.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Linéarité de dilution

Le dosage anti-CCP Hycor vise la linéarité sur la plage de mesure allant de la limite de détection (LOD) à 300 U/mL.

À partir d'une étude menée sur base du document EP6-A du CLSI,²³ le dosage anti-CCP Hycor a démontré une linéarité de 1,04 U/mL à 300 U/mL.*

* Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données

Les échantillons > 300 U/mL présentent une récupération moyenne de ≤ 100 % ± 15 %* du résultat attendu lorsqu'ils sont dilués dans la plage de dosage et exploitent le bon facteur de dilution.

* Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données

Sensibilité et spécificité cliniques

La sensibilité clinique du dosage anti-CCP Hycor a été déterminée pour 229 patients atteints de PR confirmée et la spécificité clinique a été déterminée pour 285 échantillons non PR (135 prélevés sur des patients présentant d'autres troubles rhumatismaux et non rhumatismaux et 150 sur des personnes asymptomatiques apparemment en bonne santé). Sur base d'un seuil de 5,0 U/mL, la sensibilité a été établie à 78 % avec une spécificité de 99 %. Les résultats sont synthétisés dans les tableaux suivants.*

Catégorie d'échantillon	Total n	Positif n	% de sensibilité
PR	229	179	78

Catégorie d'échantillon	Total n	Positif n	% de spécificité
Échantillons non PR au total	285	4	98.6
Non PR sains asymptomatiques	150	1	99.3
Échantillons de maladie non PR ⁺	135	3	97.8

Le tableau suivant propose un classement de la spécificité clinique de 135 échantillons de patients présentant d'autres troubles rhumatismaux et non rhumatismaux.

Non-RA Disease Specimens	Total n	Positif n	Spécificité clinique (%)
Total	135	3	97.8
Polyarthrite inflammatoire	41	1	97.6
VEB IgG positif	18	1	94.4
Thyroïdite de Hashimoto	17	0	100
Syndrome de Sjögren	16	1	93.8
Lupus érythémateux systémique	16	0	100
Vasculite	5	0	100
Sclérodémie	5	0	100
Ostéoarthrite	4	0	100
Maladie de Crohn	3	0	100
Syndrome de Raynaud	3	0	100
Colite ulcéreuse	2	0	100
Arthrite psoriasique	2	0	100
Arthrite réactive	1	0	100
Spondylarthrite ankylosante et polymyosite	2	0	100

*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données.

Comparaison des méthodes

Le dosage anti-CCP Hycor est conçu pour obtenir une concordance de $\geq 99\%$ pour les échantillons PR et non PR par comparaison avec un dosage anti-CCP comparateur. Les échantillons PR et non PR décrits dans la section sensibilité et spécificité cliniques ont été exploités pour comparer l'essai anti-CCP Hycor avec l'essai anti-CCP comparateur. Le seuil appliqué pour le dosage anti-CCP comparateur était de 5,0 U/mL, comme indiqué sur la notice du fabricant. Sur base d'un seuil de 5,0 U/mL pour le dosage anti-CCP Hycor la concordance a été établie à 99 %. Les résultats sont synthétisés dans les tableaux suivants.*

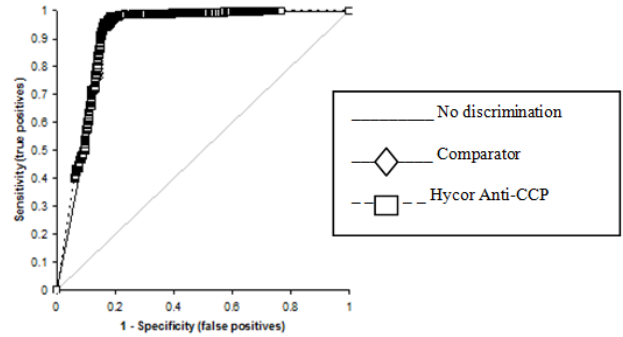
Tous les échantillons (514)

Hycor		Comparateur	
		Positif	Négatif
	Positif	179	4
	Négatif	1	330

Méthode de comparaison	Hycor comparé à Comparateur
Nombre d'échantillons	65
Pente de la courbe de régression	0.910
Point d'intersection avec l'axe y	1.226
Coefficient de corrélation	0.94

*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données.

Une analyse par caractéristique de fonctionnement du récepteur (Receiver Operator Characteristic ou ROC) a été menée en exploitant les données ci-dessus obtenues pour les deux dosages. L'aire sous la courbe (ASC) du dosage anti-CCP Hycor était de 0,910 (intervalle de confiance de 95 % : 0,881 à 0,940) et 0,903 (intervalle de confiance de 95 % : 0,871 à 0,934) pour le dosage anti-CCP comparateur, indiquant ainsi que les deux dosages sont comparables sur le plan de la différenciation clinique. La courbe de l'analyse ROC est présentée ci-dessous.*



*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données.

Précision

Une étude a été menée sur base du document EP5-A2 du CLSI (anciennement NCCLS).²⁴ Deux témoins anti-CCP, six membres de panel de CQ et un échantillon de sérum humain ont été dosés à l'aide de deux lots de réactifs, en réalisant deux dosages par jour, à deux moments distincts, pendant 20 jours (n = 80). Les données établies à partir de cette étude sont synthétisées dans le tableau suivant en tant que données représentatives (arrondies à 1 chiffre après la virgule) :

Echantillon	Trousse Lot	n	Moyenne (U/ml)	Intra-cucule		Entre les cycles		Entre les journées		Total	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Témoin positif	001	80	20.30	1.05	5.2	1.24	6.1	0.00	0.0	1.63	8.0
	003	80	20.62	0.43	2.1	1.20	5.8	0.00	0.0	1.27	6.2
CQ 1	001	80	3.72	0.33	8.8	0.17	4.5	0.13	3.6	0.39	10.5
	003	80	3.92	0.23	5.8	0.35	8.9	0.04	1.1	0.42	10.7
CQ 2	001	80	8.17	0.34	4.2	0.72	8.8	0.00	0.0	0.80	9.8
	003	80	8.47	0.30	3.6	0.70	8.3	0.25	2.9	0.80	9.5
CQ 3	001	80	15.30	0.37	2.4	0.93	6.0	0.30	1.9	1.04	6.8
	003	80	15.98	0.36	2.2	0.92	5.8	0.00	0.0	0.99	6.2
CQ 4	001	80	53.55	2.30	4.3	3.19	6.0	1.71	3.2	4.29	8.0
	003	80	55.49	2.36	4.2	3.35	6.0	0.00	0.0	4.09	7.4
CQ 5	001	80	94.26	3.17	3.4	7.31	7.8	2.01	2.1	8.22	8.7
	003	80	97.15	2.61	2.7	5.56	5.7	4.79	4.9	7.79	8.0
CQ 6	001	80	134.77	4.58	3.4	5.84	4.3	5.74	4.3	9.38	7.0
	003	80	142.41	5.69	4.0	9.02	6.3	0.00	0.0	10.67	7.5
Témoin de réf.	001	80	5.18	0.34	6.6	0.24	4.6	0.21	4.0	0.46	9.0
	003	80	5.09	0.26	5.1	0.21	4.1	0.21	4.2	0.39	7.7
Ech 1	001	80	4.83	0.16	3.3	0.38	7.9	0.24	5.0	0.48	9.9
	003	80	4.77	0.20	4.1	0.37	7.8	0.25	5.2	0.49	10.2

*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données

Limite de détection

Il a été établi que la limite de détection (LOD) du dosage anti-CCP Hycor conforme au document EP17-A²⁵ du CLSI (anciennement NCCLS) est de 1,04 U/mL*.

Les LOD ont été déterminés au moyen d'un échantillon anti-CCP négatif (60 réplicats) et de six échantillons anti-CCP à faible niveau (15 réplicats chacun).

*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données.

Effet crochet à forte dose

L'effet crochet à forte dose est un phénomène dans lequel des échantillons présentant une concentration très élevée peuvent apparaître dans la plage dynamique du dosage. Pour le dosage anti-CCP Hycor, aucun effet crochet à forte dose n'a été observé lors du dosage d'un échantillon contenant environ 3000 U/mL d'anticorps anti-CCP.*

*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données.

Interférence

Le dosage anti-CCP Hycor vise un écart maximal de la concentration anti-CCP par rapport aux composés potentiellement interférents suivants à :

- $\pm 15\%$ pour les concentrations anti-CCP $\geq 10,0$ U/mL
- $\pm 10\%$ pour les concentrations anti-CCP $\geq 4,0$ U/mL à $< 10,0$ U/mL
- $< 0,75$ U/mL pour les concentrations anti-CCP $< 4,0$ U/mL

Une étude a été menée sur base du document EP7-A²⁶ du CLSI sur le dosage anti-CCP Hycor. On a complété six échantillons à taux anti-CCP répartis sur la plage de dosage avec les composés potentiellement interférents énumérés dans le tableau ci-dessous.

L'écart maximal de la concentration anti-CCP observée dans les échantillons pendant ces études s'échelonnait de :

- -9,4 % à 3,3 % pour les concentrations anti-CCP $\geq 10,0$ U/mL
- -7,3 % à 4,8 % pour les concentrations anti-CCP $\geq 4,0$ U/mL à $< 10,0$ U/mL
- -0,6 U/mL à 0,05 U/mL pour les concentrations anti-CCP $< 4,0$ U/mL*

Substance potentiellement interférente	On n'a pas décelé d'interférence à la concentration suivante
Hémoglobine	4 mg/mL
Bilirubine	0.2 mg/mL
Triglycéride (solution intralipide)	15 mg/mL
Facteur rhumatoïde	200 IU/mL
Protéine totale (gammaglobulines)	120 mg/mL

*Données représentatives ; les résultats des différents laboratoires peuvent différer de ces données.

LIMITES D'UTILISATION

1. Bien que la présence d'anticorps anti-CCP soit associée à la polyarthrite rhumatoïde, un résultat positif n'est pas un diagnostic en soi ; il faut considérer les données à la lumière d'autres résultats cliniques et de laboratoire.
2. Certaines personnes peuvent présenter des taux élevés d'anticorps anti-CCP et pas ou peu de preuve de maladie clinique. Par opposition, certains patients dont la maladie est active peuvent présenter des taux indétectables de ces anticorps. La signification clinique de ces informations reste floue.
3. Comme le résultat d'un dosage anti-CCP n'est pas une preuve diagnostique de la présence ou de l'absence d'une maladie clinique, il ne faut pas initier de traitement sur base d'un simple résultat positif aux anti-CCP.
4. L'initiation ou le changement de traitement ne doit pas reposer sur les variations de la concentration en anticorps anti-CCP, mais plutôt sur une/des observation(s) clinique(s).
5. L'efficacité clinique du suivi des taux d'auto-anticorps anti-CCP comme indice de la progression/rémission de la polyarthrite rhumatoïde n'a pas été définie.
6. L'intérêt des anticorps anti-CCP dans l'arthrite juvénile n'a pas été déterminé.
7. En raison des caractéristiques propres aux interactions antigènes/anticorps, on ne s'attache pas à la concentration des anticorps, mais à son activité. Puisque le sérum des patients contient des populations d'anticorps hétérogènes, certains échantillons peuvent présenter une non linéarité, en particulier à des dilutions d'échantillon très élevées.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Bei dem Hycor Anti-CCP-Test handelt es sich um einen semi-quantitativen/qualitativen enzymgekoppelten Immunsorptionsstest (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) für den Nachweis der für zyklische citrullinierte Peptide spezifischen IgG-Klasse von Autoantikörpern in Humanserum (insbesondere SST-Röhrchen) oder -plasma (EDTA, Lithium-Heparin oder Natriumcitrat). Der Nachweis von Anti-CCP-Antikörpern trägt zur Sicherung der Diagnose einer rheumatoiden Arthritis bei, darf jedoch nur im Konsens mit anderen klinischen Informationen interpretiert werden. Die Autoantikörperkonzentration stellt nur einen Parameter eines multikriteriellen diagnostischen Prozesses dar, der gleichermaßen klinische wie labortechnische Beurteilungen umfasst. Nur für die in vitro-Diagnostik.

EINLEITUNG

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine verbreitete systemische Autoimmunerkrankung, von der 0,5 % – 1,0 % der erwachsenen Bevölkerung betroffen sind. Charakterisiert ist die RA durch eine chronische Entzündung der Synovialis, die zu einer progressiven Gelenkzerstörung und in vielen Fällen zu Behinderung und Einschränkungen der Lebensqualität führen kann.¹ Ein frühzeitiges Eingreifen ist anerkanntermaßen der Schlüssel zur Verhinderung irreversibler Gelenkschäden, daher muss die Diagnose RA möglichst früh im Krankheitsverlauf gesichert werden.^{2,3} Die Diagnosestellung bei der RA beruht primär auf klinischen, radiologischen und immunologischen Merkmalen. Der am häufigste eingesetzte serologische Test ist die Bestimmung des Rheumafaktors (RF).⁴ Dieser weist zwar eine zufriedenstellende Sensitivität auf, ist jedoch nicht spezifisch für RA, da der Rheumafaktor oftmals auch bei Gesunden und an anderen rheumatischen oder entzündlichen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder chronischen Infektionen Erkrankten nachweisbar ist.⁵ Schon vor mehreren Jahren setzte sich die Erkenntnis durch, dass der Antiperinukleäre Faktor (APF) sowie der Anti-Keratin-Antikörper (AKA) eine hohe Spezifität für RA aufweisen. In der Folge wurde festgestellt, dass diese Antikörper mit nativem Filaggrin reagieren, so dass sie heute als Anti-Filaggrin-Antikörper bezeichnet werden.^{6,7,8} Neueste Erkenntnisse belegen, dass sich alle diese Antikörper gegen Epitope richten, die Citrullin enthalten.⁹ Citrullin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, d. h. nicht am Aufbau von Proteinen im Rahmen der Proteinsynthese beteiligt, kann jedoch durch posttranskriptionale Modifizierung von Argininresten durch das Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD) entstehen.¹⁰ 1998 wurde von der Arbeitsgruppe um Schellekens festgestellt, dass mit linearen synthetischen citrullinierten Peptiden reaktive Autoantikörper in einem auf dem ELISA-Verfahren basierenden Assay hochgradig spezifisch für RA sind.¹¹ Nachfolgende Untersuchungen belegten, dass zyklische Varianten dieser Peptide, so genannte zyklische citrullinierte Peptide (Cyclic Citrullinated Peptides, CCP), ebenso spezifisch für RA sind, zugleich jedoch eine höhere Sensitivität als lineare Peptide aufweisen.¹² In dem Bemühen um eine weitere Verbesserung der Sensitivität des CCP-Tests wurde eine dedizierte Bibliothek citrullinierter Peptide mittels RA-Seren gescreent. Dabei wurde ein neuer Peptidsatz (CCP2) mit im Vergleich zum CCP1-Test herausragendem Leistungsvermögen entdeckt.¹³ Im Laufe der letzten Jahre wurde die diagnostische Leistungsfähigkeit des CCP2-Tests in einer Vielzahl von Veröffentlichungen bestätigt.¹⁴ Anti-CCP-Antikörper, auch als Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (Anti Citrullinated Peptide/Protein Antibodies, ACPA) bezeichnet, konnten bereits in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung nachgewiesen werden, oftmals bei völliger Abwesenheit klinischer Symptome. Viele Veröffentlichungen bezeugen zudem, dass eine erhöhte Konzentration von Anti-CCP-Antikörpern als Prädiktor für die Entwicklung einer erosiven Erkrankung angesehen werden kann.^{15,16,17,18,19,20} Diese Erkenntnisse belegen die bedeutende Rolle zyklischer citrullinierter Peptide für die Diagnose der RA im Frühstadium.

Die 2010 publizierten RA-Klassifizierungskriterien von ACR / EULAR (ACR / EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria) ersetzen die „alten“ ACR-Kriterien von 1987, die weithin als für die Frühdiagnostik der RA ungeeignet angesehen wurden. Die in Kooperation vom American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) herausgegebenen revidierten Klassifizierungskriterien empfehlen ein auf der Vergabe von Punkten zwischen 0 und 10 basierendes Beurteilungssystem. Die neuen Klassifizierungskriterien sollten bei jedem Patienten zur Anwendung gelangen, der sich mit eindeutiger Synovitis (undifferenzierte entzündliche Arthritis) vorstellt. Die vier zusätzlich aufgenommenen Kriterien waren: Anzahl der beteiligten Gelenke, serologische Anomalien, Akutphase-Antwort und Dauer des Anhaltens der Symptome in den beteiligten Gelenken. Erstmals zählte die Bestimmung der ACPA (Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine wie beispielsweise Anti-CCP) zu den serologischen Kriterien, wobei für diese zudem gewisse Definitionen für die Unterscheidung zwischen niedrig-positiven und hoch-positiven Ergebnissen geschaffen wurden.²¹

Bei dem Hycor Anti-CCP-Assay handelt es sich um einen auf dem Nachweis von Autoantikörpern gegen modifizierte Argininreste enthaltende synthetische zyklische Peptide (CCP2-Peptide) in Humanserum oder -plasma basierenden ELISA, der als zusätzliches Hilfsmittel für die diagnostische Abklärung von RA-Patienten zur Verfügung steht.

PRINZIP DES ASSAYS

Die Wells der Mikrotiterstreifen sind mit einem hochgereinigten, modifizierte Argininreste enthaltenden synthetischen zyklischen citrullinierten Peptid beschichtet. Während der ersten Inkubation binden spezifische Autoantikörper im verdünnten Serum oder Plasma an die antigenbeschichtete Oberfläche. Anschließend werden die Wells ausgewaschen, um ungebundene Komponenten zu entfernen. Während der zweiten

Inkubation bindet das Konjugat – ein gegen humanes IgG gerichteter enzymmarkierter polyklonaler Antikörper – sämtliche oberflächengebundene Autoantikörper. Nach einem weiteren Waschschritt werden die spezifischen Autoantikörper durch Inkubation mit dem Substrat markiert. Durch Zugabe der Stopplösung wird die Reaktion beendet. Anschließend wird die Menge des im gefärbten Endprodukt gebundenen Konjugats in Adsorptionseinheiten gemessen. Im qualitativen Protokoll wird die Menge des durch die Probe gebundenen Konjugats mit der durch eine Referenzkontrolle gebundenen Menge verglichen. Im semiquantitativen Protokoll kann die Konzentration der Anti-CCP-Autoantikörper durch Interpolation einer auf Kalibratoren basierenden Dosis-Wirkungs-Kurve geschätzt werden.

KOMPONENTEN DES KITS

CONJ	1 x 15 ml	Meerrettichperoxydase-markierte polyklonale Ziegen-Antikörper gegen humanes IgG, 0,1 % (Massenkonzentration) p-Hydroxyphenyllessigsäure, 0,15 % (Massenkonzentration) Proclin und 1 % (Massenkonzentration) Proteinestabilisator (bovin) in einem HEPEs-Puffer. Gebrauchsfertig. ZUR BEACHTUNG: REIZEND
SUBS	1 x 15 ml	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Pufferlösung. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern. ZUR BEACHTUNG: GESUNDHEITSSCHÄDLICH
SOLN STOP	1 x 15 ml	Schwefelsäure in wässriger Lösung (0,25 mol/l) Gebrauchsfertig.
BUF WASH 10 X	3 x 25 ml	Phosphatgepufferte Salzlösung, 1,3 % (Volumenkonzentration) Polysorbat 20 Vor Gebrauch verdünnen.
MT PLATE	8x12-Well-Mikrotiter-Streifen (abbrechbar)	Beschichtet mit synthetischem zyklischem citrulliniertem Peptid, in wiederverschließbarer Folienverpackung mit Trockenmittel.
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25 ml	Phosphatpuffer, Proteinestabilisator (bovin), 0,5 % (Massenkonzentration) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen. ZUR BEACHTUNG: GESUNDHEITSSCHÄDLICH
CAL 1	1 x 1 ml	Phosphatpuffer, Proteinestabilisator (bovin), < 0,1 % (Massenkonzentration) Natriumazid. 0 U/ml. Gebrauchsfertig.
CAL 2 - CAL 6	5 x 1 ml	Humanplasma, Phosphatpuffer, Proteinestabilisator (bovin) < 0,1 % (Massenkonzentration) Natriumazid. 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. Gebrauchsfertig.
CONTROL REF	1 x 1.5 ml	Humanplasma, Puffer, < 0,1% (Massenkonzentration) Natriumazid.
CONTROL +	1 x 0.3 ml	Humanplasma, < 0,1% (Massenkonzentration) Natriumazid. Vor Gebrauch wie Proben im Verhältnis 1:100 mit verdünntem Probenverdünner verdünnen.
CONTROL -	1 x 0.3 ml	Humanplasma, < 0,1% (Massenkonzentration) Natriumazid. Vor Gebrauch wie Proben im Verhältnis 1:100 mit verdünntem Probenverdünner verdünnen.

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Stabilität des geöffneten Kits

Ein Kit wurde geöffnet und über einen Zeitraum von drei Monaten dreimal eingesetzt, ohne dass sich nachteilige Auswirkungen auf das Leistungsvermögen des Kits zeigten. Nach Verwendung müssen die Komponenten wieder bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Anmerkungen zu Handhabung und Verfahrensweisen

- Kit-Komponenten bei 2 °C bis 8 °C lagern und vor Ablauf des auf den Etiketten angegebenen Haltbarkeitsdatums verwenden. Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien mit unterschiedlichen Chargennummern nicht mischen.
- Kits nicht einfrieren.
- Waschpufferkonzentrat, Probenverdünnerkonzentrat sowie Positiv- und Negativkontrollen müssen vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.
- Eie mikrobielle Kontamination des verdünnten Waschpuffers und des verdünnten Probenverdünners ist unter allen Umständen zu verhindern. Nach Durchführung des Tests wieder bei 2 °C bis 8 °C lagern.
- Überschüssige (unbenutzte) Mikrotiterstreifen wieder in die Folienverpackung mit Trockenmittel geben. Dichtigkeit des Verschlusses kontrollieren und bis zur Verwendung weiter bei 2 °C bis 8 °C lagern.
- Substrat lichtgeschützt lagern.
- Kontamination der Reagenzien vermeiden. Bei jedem Pipettieren eines Reagenz oder einer Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

Anzeichen für Zersetzung

Das Substrat muss farblos bis ausgesprochen blassblau sein. Trübungen oder Ausfällungen sind bei allen Komponenten als Anzeichen einer Zersetzung anzusehen, die entsprechende Komponente ist zu entsorgen.

Nach der Entnahme aus der Kühllagerung sichtbare Kristalle im Waschpuffer oder im Probenverdünner lösen sich während des Erwärms der Lösung auf Raumtemperatur auf.

Gewinnung und Lagerung von Proben

Der Assay ist für Humanserum- (insbesondere SST-Röhrchen) und Humanplasmaproben (EDTA, Lithium-Heparin oder Natriumcitrat) vorgesehen. Hinsichtlich der Verwendbarkeit anderer Röhrchentypen für diesen Assay liegen keine Erkenntnisse vor. Keine stark hämolytierten oder getrübbten Proben verwenden. Aufgetaute Proben vor der Analyse gründlich durchmischen. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen ist zu vermeiden. Proben nicht hitzeinaktivieren, da dies zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Bei der Vorbereitung für die Analyse entsprechend den Anweisungen des Entnahmeröhrchen-Herstellers verfahren. Unverdünnte Proben können bei 2 °C bis 8 °C für bis zu vier Wochen, bei -20 °C oder darunter auch für einen längeren Zeitraum gelagert werden. Im Verhältnis 1:100 in verdünntem Probenverdünner verdünnte Proben müssen innerhalb von 24 Stunden nach dem Verdünnen verwendet werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die in vitro-Diagnostik.

Sicherheitsvorkehrungen

- Die Anweisungen in dieser Broschüre – insbesondere zu Handhabung und Lagerungsbedingungen – sind auf das Genaueste zu befolgen.
- Kalibratoren und Kontrollen enthalten Humanplasma, das mittels FDA-zugelassener Assays auf HBsAg, HIV-1 RNA oder HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 sowie anti-HCV oder HCV RNA getestet und als nichtreaktiv bzw. negativ eingestuft wurde. Da kein bekannter Test das Vorliegen von Infektionserregern mit letzter Sicherheit ausschließen kann, sind Kalibratoren und Kontrollen als potenziell infektiös anzusehen und mit derselben Vorsicht zu handhaben wie alle anderen potenziell biologisch gefährlichen Materialien. Die vom CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) genehmigten Richtlinien „Schutz von Laborkräften vor berufsbedingten Infektionen“ (M29-A3 – Dritte Ausgabe)²² beschreibt die Handhabung dieser Materialien in Übereinstimmung mit guter Laborpraxis.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In Bereichen, in denen Kits und Proben gehandelt werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika auflegen.
- Hautleiden, Schnitte, Abschürfungen und andere Hautläsionen adäquat schützen.
- Kalibratoren, Kontrollen und Probenverdünnungskonzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohren unter Bildung hochexplodiver Metallazide reagieren kann. Bei der Entsorgung mit großen Mengen Wasser nachspülen, um die Bildung von Aziden zu vermeiden.
- Materialsicherheitsdatenblätter* für alle in diesem Kit enthaltenen gefährlichen Komponenten sind auf Anfrage bei Hycor Biomedical erhältlich

CONJ



Reizend

R43: Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

S24: Berührung mit der Haut vermeiden.

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.

SUBS



Gesundheitsschädlich

R20/21/22: Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R36/37/38: Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.

S23: Dampf nicht einatmen.

S24/25: Berührung mit den Augen und der Haut 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.

S46: Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

SAMPLE DIL 5 X



Gesundheitsschädlich

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.

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.

VORBEREITUNG

Benötigte, aber nicht zum Lieferumfang gehörende Materialien/Geräte/Hilfsmittel

- 96-Well-Platten/Streifenlesegerät mit 450-nm-Filter
- Präzisionspipetten für die Abgabe von 10 µl, 100 µl, 1 ml / Automatische Pipette für die Abgabe von 100 µl / Automatische Pipette für die Abgabe von 300 µl für den manuellen Waschvorgang / Optional: Automatisches Plattenwaschgerät
- Messzylinder (Glas/Kunststoff): 1 × 100 ml, 1 × 500 ml
- 1-ml-Behälter
- Destilliertes/deionisiertes Wasser
- Papiertücher
- Zeitgeber für 30- und 60-Minuten-Intervalle

Vorbereitungen für den Assay

Alle Komponenten des Kits einschließlich der Mikrotiterstreifen vor Gebrauch auf 18 °C bis 25 °C erwärmen lassen

(30 bis 60 Minuten). Reagenzien durch behutsames Umkehren durchmischen.

Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich durchmischen.

Reagenz	Volumen	Zugabe
Waschpufferkonzentrat	1 Flasche	225 ml destilliertes/deionisiertes Wasser
Probenverdünnungskonzentrat	1 Flasche	100 ml destilliertes/deionisiertes Wasser
Positiv- und Negativkontrollen / Proben	10 µl	1 ml diluted verdünnte Probenverdünnung

Die Anzahl der für den aktuellen Assay benötigten Mikrotiterstreifen berechnen und diese in den Mikrotiterstreifenraster einsetzen. Überschüssige Mikrotiterstreifen wieder in die Folienverpackung mit Trockenmittel geben und bis zur Verwendung weiter bei 2 °C bis 8 °C lagern. Sicherstellen, dass alle Streifen fest und sicher im Mikrotiterstreifenraster sitzen. Zur eindeutigen Identifizierung empfiehlt es sich, die Streifen am oberen Rand zu nummerieren. Den Mikrotiterstreifenraster für die weitere Verwendung beiseite legen.

ASSAY PROROKOLL

Qualitatives Protokoll: Assay-Referenzkontrolle, Positiv- und Negativkontrolle, Proben.

Semiquantitatives Protokoll: Assay-Kalibratoren (1-6), Positiv- und Negativkontrollen, Proben.

- Wells für die Identifizierung referenzieren.
- 100 µl Referenzkontrolle/Kalibratoren (Doppelbestimmung), vorverdünnte (1:100) Positiv- und Negativkontrolle (Doppelbestimmung) und vorverdünnte (1:100) Patientenproben (Doppelbestimmung) in die entsprechenden Wells pipettieren. Unbedingt nach jedem Pipettieren die Pipettenspitze wechseln. Dieser Schritt darf für eine Kalibratoren/Kontrollen/Probenreihe nicht mehr als **10 Minuten** in Anspruch nehmen.
- 60 ± 10 Minuten bei 18 °C bis 25 °C inkubieren.
- Den Streifeninhalt durch schnelles Umdrehen über einem für die Entsorgung biologischer Materialien vorgesehenen Spülbecken dekantieren. Dabei die von den Proben potenziell ausgehende Infektionsgefahr berücksichtigen. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
- Die Wells **vier Mal** mit mindestens 300 µl verdünntem Waschpuffer waschen. **Nach jedem Waschschritt dekantieren und abtupfen.**
- In jedes Well 100 µl Konjugat geben.
- 30 ± 5 Minuten bei 18 °C bis 25 °C inkubieren.
- Schritte 4 und 5 wiederholen.
- In jedes Well 100 µl Substrat geben.
- 30 ± 5 Minuten bei 18 °C bis 25 °C inkubieren. **Nicht dekantieren.**
- In derselben Reihenfolge und derselben Geschwindigkeit wie bei der Zugabe des Substrats 100 µl Stopplösung in jedes Well geben. Wells zum Durchmischen behutsam beklopfen. Sicherstellen, dass keine sichtbaren Bläschen vorliegen.
- Streifen bei 450 nm auslesen.
- Assay innerhalb von 60 Minuten nach Abschluss des Tests auslesen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Berechnung und Interpretation der Ergebnisse muss für jeden Assay separat durchgeführt werden.

Qualitatives Protokoll

Für jede Positivkontrolle, Negativkontrolle und Probe den Quotienten aus dem mittleren Extinktionswert (optische Dichte) und dem mittleren Extinktionswert der Referenzkontrolle berechnen:

$$\text{Extinktionsquotient} = \frac{\text{Mittlerer Extinktionswert der Probe oder der Kontrolle}}{\text{Mittlerer Extinktionswert der Referenzkontrolle}}$$

Der Anwender muss einen für seine Patientenpopulationen spezifischen Cut-off-Wert für die Trennung von positiven und negativen Proben ermitteln. Die mit den Patientenpopulationen aus der von Hycor durchgeführten klinischen Studie erzielten Ergebnisse legen den folgenden Cut-off-Wert nahe:

<u>Extinktionsquotient</u>	<u>Interpretation des Ergebnisses</u>
< 0,95	Negativ
≥ 0,95 bis ≤ 1,0	Grenzwertig – Testwiederholung empfohlen
> 1,0	Positiv

Semiquantitatives Protokoll

Der mittlere Extinktionswert der Kalibratoren wird auf geeignetem Logarithmenpapier gegen \log_{10} der Konzentration des jeweiligen Kalibrators aufgetragen. Aus der so erhaltenen Kalibrierungskurve kann dann die mittlere Konzentration der Positiv- und Negativkontrolle und der Proben abgelesen werden. Das nachstehende Diagramm einer typischen Kalibrierungskurve dient nur zur Illustration des Vorgehens und darf nicht für die Interpretation von Ergebnissen verwendet werden. Eine Kurvenanpassung mittels 4-Parameter-Logistik (4-PL) oder kubischen Splines ist ausreichend, von der Verwendung anderer Kurvenanpassungsmodelle wird abgeraten.

Proben mit einem über dem von Kalibrator 6 (300 U/ml) liegenden Extinktionswert liegen außerhalb des Messbereichs des Assays und müssen als > 300 U/ml angegeben, verdünnt und erneut getestet werden, wobei bei der anschließenden Berechnung dieser zusätzliche Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen ist.

Hinsichtlich der Interpretation semiquantitativer Ergebnisse empfiehlt sich auf Grundlage der Axis-Shield Referenzpopulationsdaten* das folgende Schema:

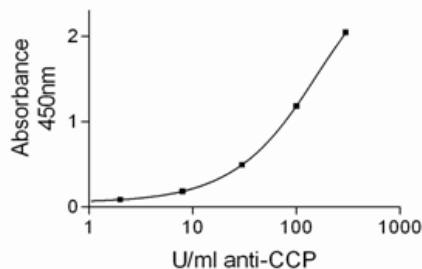
<u>Mittleres Ergebnis der Probe</u>	<u>Interpretation der Probe</u>
≤ 5 U/ml	Negativ
> 5 U/ml	Positiv

*Dieses Schema ist nur als Vorschlag zu betrachten. Dem Anwender wird die Festlegung eines eigenen, für die jeweilige Population spezifischen Referenzbereichs angeraten.

Bitte beachten Sie: Wie jedes andere Assay zur Bestimmung von Antikörpern auch bestimmt dieses Assay die Aktivität der in der Probe vorliegenden Antikörper und nicht deren Konzentration. Die Aktivität kann durch die verschiedensten Faktoren beeinflusst werden, beispielsweise durch die Avidität des Antikörpers.

<u>Kalibratorkonzentrationen</u>	
<u>Kalibratornummer</u>	<u>Konzentration [U/ml]</u>
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Typische Kalibrierungskurve



QUALITÄTSKONTROLLE

Es ist sicherzustellen, dass das Plattenlesegerät entsprechend der Herstelleranweisungen adäquat gewartet und kalibriert wird und dass die richtige Wellenlänge angewendet wird. Der Anwender muss sicherstellen, dass er mit den Anweisungen für den Assay – insbesondere den Abschnitten „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ und „Anmerkungen zu Handhabung und Vorgehensweise“ – vollumfänglich vertraut ist. Vor der Anwendung des Assays auf Patientenproben muss der Anwender nachweisen, dass er

die vom Hersteller festgelegten Leistungsspezifikationen hinsichtlich Präzision und Messbereich erbringen kann. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens wird empfohlen, die vorverdünnten Positiv- und Negativkontrollen in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen zu lassen. Bei allen qualitativen Tests muss die gebrauchsfertige Referenzkontrolle als Doppelbestimmung mitlaufen. Sofern die vom Hersteller vorgegebenen Präzisionspezifikationen erfüllt sind, ist der Assay als ungültig anzusehen, wenn das Ergebnis einer der Kontrollen außerhalb des nachstehend angegebenen Spezifikationsbereichs liegen sollte. In diesem Fall dürfen die mit diesem Assay ermittelten Patientenergebnisse nicht herausgegeben werden. Nach Überprüfung der Verfahrensschritte kann der Assay wiederholt werden, alternativ kann der Distributor/Hersteller zu Rate gezogen werden. Für die Wiederholung des Assays ist eine frische Verdünnung aller Kontrollen und Proben herzustellen. Kontrollen dieser Art bei oder unter -20 °C lagern und wiederholtes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Konservierungsmittel wie Natriumazid (0,1 % Massenkonzentration) haben keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Proben. Bei den bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesenen Konzentrationen von Analyten handelt es sich um Angaben, die vom Hersteller für bestimmte Populationen vorgegeben wurden. Diese stimmen nicht notwendigerweise mit den Angaben in der einschlägigen Literatur überein. Indizengrade, ihr Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen, Referenzbereiche und angemessene Cut-off-Werte müssen vom Anwender für die spezifische betreute Population berechnet werden.

Spezifikationen der Kontrollen

<u>Protokoll</u>	<u>Specifications</u>
Qualitativ (Quotienten)	$\frac{\text{Extinktionswert der Positivkontrolle}}{\text{Extinktionswert der Referenzkontrolle}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Extinktionswert der Negativkontrolle}}{\text{Extinktionswert der Referenzkontrolle}} < 0,95$
Semiquantitativ	Siehe der Positivkontrolle zulässigen erwarteten Bereich [U/ml] Konzentration der Negativkontrolle < 2 U/ml

ERWARTETE WERTE

200 Serumproben von asymptomatischen und augenscheinlich gesunden Spendern im Alter zwischen 18 und 72 Jahren mit einer in etwa ausgeglichenen Geschlechterverteilung (105 Männer / 95 Frauen) wurden getestet. Dabei wurden keinerlei geschlechts- oder altersspezifische (Stratifizierung nach ≤ 40 Jahren [n = 115] und > 40 Jahren [n=85]) Abweichungen festgestellt. Die über die gesamte Population gemittelte Anti-CCP-Konzentration lag bei $0,630 \pm 0,419$ U/ml (Bereich: 0,05 – 3,80 U/ml). Auf Grundlage der Daten dieser Referenzpopulation und denen einer klinischen Population ergibt sich der folgende vorgeschlagene Cut-off-Wert:

Referenzbereich

- ≤ 5 U/ml = negativ
- > 5 U/ml = positiv

Dieser Referenzbereich soll nur als Anhalt dienen. Jedes Labor muss einen auf seine Patientenpopulation – samt ggf. zu beachtender Einflussfaktoren (geographische Lage, Patiententyp, Ernährung, Umweltfaktoren) – und klinischen Verfahren abgestimmten Referenzbereich ermitteln. Bitte beachten Sie, dass die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis bei Frauen doppelt so hoch liegt wie bei Männern.

LEISTUNGSDATEN

Der Hycor Anti-CCP-Assay soll über den gesamten Messbereich von der Nachweisgrenze (LOD) bis 300 U/ml linear sein.

Im Rahmen einer Evaluierung gemäß dem CLSI-Dokument EP6-A²³ wurde die Linearität des Hycor Anti-CCP-Assays zwischen 1,04 U/ml und 300 U/ml nachgewiesen.*

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Proben mit einer Konzentration von mehr als 300 U/ml zeigten nach Verdünnung in den Messbereich des Assays und Anwendung des korrekten Verdünnungsfaktors eine mittlere Wiederfindung von $\leq 100 \% \pm 15 \%$ des erwarteten Ergebnisses.

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Klinische Sensitivität und Spezifität

Für die Bestimmung der klinischen Sensitivität des Hycor Anti-CCP-Assays wurden 229 Proben von Patienten mit abgesicherter RA herangezogen, die Bestimmung der klinischen Spezifität erfolgte unter Verwendung von 285 Proben von RA-freien Spendern (135 Patienten mit anderen rheumatischen und nicht rheumatischen Erkrankungen sowie 150 asymptomatische und augenscheinlich gesunde Personen). Bei Zugrundelegung eines Cut-off-Werts von 5,0 U/ml ergaben sich die Sensitivität zu 78 % und die Spezifität zu 99 %. Die nachstehenden Tabellen fassen diese Ergebnisse zusammen.*

Probenkategorie	Gesamt n	Positiv n	Sensitivität %
RA gesamt	229	179	78

Probenkategorie	Gesamt n	Positiv n	Spezifität %
Nicht-RA-Proben gesamt	285	4	98.6
Nicht-RA-Proben von asymptomatischen Gesunden	150	1	99.3
Proben von Patienten mit anderen Erkrankungen als RA*	135	3	97.8

Klinische Spezifität für 135 Proben von Patienten mit anderen rheumatischen und nicht rheumatischen Erkrankungen (Aufschlüsselung nach den einzelnen Erkrankungen siehe nachstehende Tabelle).

Proben von Patienten mit anderen Erkrankungen als RA	Total n	Positiv n	Spécificité clinique (%)
Gesamt	135	3	97.8
Entzündliche Polyarthritis	41	1	97.6
EBV IgG-positiv	18	1	94.4
Hashimoto-Thyreoiditis	17	0	100
Sjögren-Syndrom	16	1	93.8
Lupus erythematodes	16	0	100
Vaskulitis	5	0	100
Sklerodermie	5	0	100
Arthrose	4	0	100
Morbus Crohn	3	0	100
Morbus Raynaud	3	0	100
Colitis ulcerosa	2	0	100
Psoriasisarthritis	2	0	100
Reaktive Arthritis	1	0	100
Spondylitis ankylosans und Polymyositis	2	0	100

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Methodenvergleich

Der Hycor Anti-CCP-Assay soll für RA- und Nicht-RA-Proben gleichermaßen eine Korrelation von $\geq 99\%$ mit dem zum Vergleich herangezogenen Anti-CCP-Assay aufweisen. Für den Vergleich des Hycor Anti-CCP-Assays mit dem Anti-CCP-Assay wurden die im Abschnitt „Sensitivität und Spezifität“ beschriebenen RA- und Nicht-RA-Proben herangezogen. Für den Anti-CCP-Assay gelangte der in der Packungsbeilage des Herstellers angegebene Cut-off-Wert 5,0 U/ml zur Anwendung. Bei Verwendung eines Cut-off-Werts von 5,0 U/ml für den Hycor Anti-CCP-Assay ergab sich rechnerisch eine Korrelation von 99 %. Die nachstehenden Tabellen fassen diese Ergebnisse zusammen.*

Alle Proben (514)

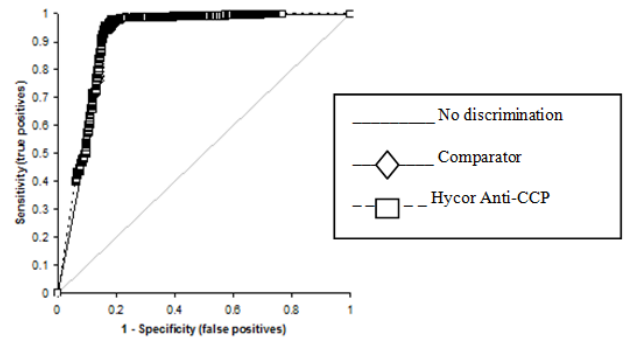
Hycor		Komparator	
		Positiv	Negativ
	Positiv	179	4
	Negativ	1	330

Methodenvergleich	Hycor comparé à Komparator
Anzahl der Proben	65
Steigung der Regressionsgeraden	0.910
y-Achsen-Abschnitt	1.226
Korrelationskoeffizient	0.94

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Für die für die beiden Assays ermittelten Daten wurde eine ROC-Analyse (Receiver Operator Characteristic) durchgeführt. Dabei ergab sich für den Hycor Anti-CCP-Assay eine „Fläche unter der Kurve“ von 0,910 (95%-Konfidenzintervall: 0,881 – 0,940) bzw.

von 0,903 (95%-Konfidenzintervall: 0,871 – 0,934) für den zum Vergleich herangezogene Anti-CCP-Assay. Somit lässt sich konstatieren, dass die beiden Assays hinsichtlich der klinischen Differenzierung als gleichwertig anzusehen sind. Die ROC-Kurve ist nachstehend abgebildet.*



*Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurde eine Evaluierung gemäß dem CLSI-Dokument (früher: NCCLS) EP5-A2 durchgeführt.²⁴ Zwei Anti-CCP-Kontrollen, sechs Qualitätskontrollen und eine Humanserumprobe wurden über 20 Tage zweimal täglich zu unterschiedlichen Uhrzeiten mit zwei Chargen Reagenzien in Doppelbestimmung getestet (n = 80). Die nachstehende Tabelle fasst die Ergebnisse dieser Evaluierung summarisch zusammen (gerundet auf eine Nachkommastelle).

Probe	Kit Charge	n	MW (U/ml)	Innerhalb Einer Serie		Zwischen Serien		Zwischen Tagen		Gesamt	
				SD	%C v	SD	%C v	SD	%C v	SD	%C v
Poskon	001	80	20.30	1.05	5.2	1.24	6.1	0.00	0.0	1.63	8.0
	003	80	20.62	0.43	2.1	1.20	5.8	0.00	0.0	1.27	6.2
QK 1	001	80	3.72	0.33	8.8	0.17	4.5	0.13	3.6	0.39	10.5
	003	80	3.92	0.23	5.8	0.35	8.9	0.04	1.1	0.42	10.7
QK 2	001	80	8.17	0.34	4.2	0.72	8.8	0.00	0.0	0.80	9.8
	003	80	8.47	0.30	3.6	0.70	8.3	0.25	2.9	0.80	9.5
QK 3	001	80	15.30	0.37	2.4	0.93	6.0	0.30	1.9	1.04	6.8
	003	80	15.98	0.36	2.2	0.92	5.8	0.00	0.0	0.99	6.2
QK 4	001	80	53.55	2.30	4.3	3.19	6.0	1.71	3.2	4.29	8.0
	003	80	55.49	2.36	4.2	3.35	6.0	0.00	0.0	4.09	7.4
QK 5	001	80	94.26	3.17	3.4	7.31	7.8	2.01	2.1	8.22	8.7
	003	80	97.15	2.61	2.7	5.56	5.7	4.79	4.9	7.79	8.0
QK 6	001	80	134.77	4.58	3.4	5.84	4.3	5.74	4.3	9.38	7.0
	003	80	142.41	5.69	4.0	9.02	6.3	0.00	0.0	10.67	7.5
Refkon	001	80	5.18	0.34	6.6	0.24	4.6	0.21	4.0	0.46	9.0
	003	80	5.09	0.26	5.1	0.21	4.1	0.21	4.2	0.39	7.7
Pro be 1	001	80	4.83	0.16	3.3	0.38	7.9	0.24	5.0	0.48	9.9
	003	80	4.77	0.20	4.1	0.37	7.8	0.25	5.2	0.49	10.2

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) des Hycor Anti-CCP-Assays wurde in Übereinstimmung mit dem CLSI-Dokument (früher NCCLS) EP17-A²⁵ mit 1,04 U/ml bestimmt.*

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte unter Verwendung einer Anti-CCP-negativen Probe (60 Durchläufe) und sechs Anti-CCP-Proben mit geringer Konzentration (jeweils 15 Durchläufe).

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Hook-Effekt

Hook-Effekt ist die Bezeichnung für ein Phänomen, bei dem Proben mit sehr hoher Konzentration fälschlicherweise ein innerhalb des dynamischen Messbereichs des Assays liegendes Ergebnis liefern. Beim Hycor Anti-CCP-Assay konnte bei der Messung einer Probe mit einer Anti-CCP-Antikörperkonzentration von etwa 3000 U/ml kein Hook-Effekt beobachtet werden.*

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

Störeinflüsse

Die maximale Abweichung der mit dem Hycor Anti-CCP-Assay bestimmten Anti-CCP-Antikörper-Konzentration soll bei gleichzeitigem Vorliegen der unten aufgeführten potenziell störenden Substanzen in der Probe betragen:

- $\pm 15\%$ bei Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen $\geq 10,0$ U/ml
- $\pm 10\%$ bei Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen $\geq 4,0$ U/ml und $< 10,0$ U/ml
- $< 0,75$ U/ml bei Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen $< 4,0$ U/ml

Zur Bestimmung der Auswirkungen von Störeinflüssen wurde eine Evaluierung gemäß dem CLSI-Dokument (früher: NCCLS) EP7-A2²⁶ durchgeführt. Sechs Proben mit innerhalb des Messbereichs liegenden Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen wurden die in der nachstehenden Tabelle aufgeführten potenziell störenden Substanzen zugegeben. Bei diesen Messungen zeigten sich Abweichungen von der tatsächlichen Anti-CCP-Antikörper-Konzentration von maximal:

- -9,4 % bis 3,3 % bei Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen $\geq 10,0$ U/ml
- -7,3 % bis 4,8 % bei Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen $\geq 4,0$ U/ml und $< 10,0$ U/ml
- -0,6 U/ml bis 0,05 U/ml bei Anti-CCP-Antikörper-Konzentrationen $< 4,0$ U/ml*

Potenziell störende Substanz	Konzentration, bis zu der keine Störeinflüsse nachweisbar waren
Hämoglobin	4 mg/mL
Bilirubin	0,2 mg/mL
Triglyceride (Intralipidlösung)	15 mg/mL
Rheumafaktor	200 IU/mL
Gesamtprotein (Antikörper)	120 mg/mL

* Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

ANWENDUNGSGRENZEN

1. Wiewohl das Vorliegen von Anti-CCP-Antikörpern mit rheumatoider Arthritis assoziiert ist, besitzt ein positives Ergebnis für sich allein keine diagnostische Aussagekraft, sondern muss stets in Synopsis mit anderen klinischen und Laborbefunden betrachtet werden.
2. Bei manchen Personen kann eine hohe Konzentration von Anti-CCP-Antikörpern bei gleichzeitig nur geringen oder zu Gänze fehlenden klinischen Erkrankungszeichen vorliegen. Auf der anderen Seite können bei manchen aktiv Erkrankten nicht nachweisbare Konzentrationen dieser Antikörper vorliegen. Die klinische Bedeutung dieses Umstands ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.
3. Das Ergebnis eines Anti-CCP-Assays darf nicht als definitiver diagnostischer Nachweis oder Ausschluss des Vorliegens einer klinischen Erkrankung angesehen werden. Die Aufnahme einer Therapie auf alleiniger Grundlage eines positiven Anti-CCP-Tests ist nicht zulässig.
4. Aufnahme oder Umstellung einer Behandlung dürfen nicht auf Veränderungen der gemessenen Anti-CCP-Antikörper-Konzentration beruhen, sondern nur auf klinischen Beobachtungen.
5. Hinsichtlich des klinischen Nutzens der Überwachung der Anti-CCP-Antikörper-Konzentration als Indikator für Progression/Remission der rheumatoiden Arthritis liegen keine Erkenntnisse vor.
6. Hinsichtlich des Nutzens der Bestimmung der Anti-CCP-Antikörper-Konzentration bei juveniler Arthritis liegen keine Erkenntnisse vor.
7. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Interaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern wird nicht die Konzentration des Antikörpers bestimmt, sondern seine Aktivität. Das Serum mancher Patienten kann heterogene Antikörperpopulationen aufweisen, manche Proben können – insbesondere bei sehr starker Verdünnung – eine Nichtlinearität zeigen.

USO PREVISTO

Il test anti-CCP di Hycor è un dosaggio semi-quantitativo/qualitativo immunoenzimatico (ELISA) per determinare la classe IgG degli autoanticorpi specifici contro il peptide ciclico citrullinato (CCP) nel siero (comprese le provette con separatore di siero) o nel plasma (EDTA, litio-eparina o citrato di sodio) umano. La determinazione degli anticorpi anti-CCP è utilizzata per contribuire alla diagnosi di artrite reumatoide (AR), e dovrebbe essere impiegata unitamente ad altre informazioni cliniche. I livelli di autoanticorpi rappresentano solo uno dei parametri nel processo diagnostico basato su più criteri, comprendenti sia valutazioni cliniche che di laboratorio. Per uso diagnostico in vitro.

INTRODUCTION

L'artrite reumatoide (AR) è una comune patologia sistemica autoimmune che colpisce lo 0,5-1,0% della popolazione adulta. L'AR è caratterizzata dall'infiammazione cronica della membrana sinoviale, che può portare alla progressiva distruzione dell'articolazione e, in molti casi, alla disabilità e alla riduzione della qualità della vita.¹ Generalmente si ritiene che l'intervento precoce sia fondamentale per prevenire il danno irreversibile a carico delle articolazioni, pertanto è importante diagnosticare l'AR prima possibile nel corso della malattia.^{2,3} La diagnosi di AR si basa fondamentalmente su caratteristiche cliniche, radiologiche e immunologiche. L'esame sierologico più frequente è la misurazione del fattore reumatoide (FR).⁴ Sebbene l'esame dell'FR possieda una buona sensibilità, non è specifico per l'AR, in quanto è spesso presente in soggetti sani e in pazienti con altre patologie reumatiche o infiammatorie, malattie autoimmuni o infezioni croniche.⁵ Parecchi anni si scoprì che gli anticorpi diretti contro il fattore perinucleare (APF) e l'antichieratina (AKA) sono altamente specifici per l'AR. In seguito è stato riportato che entrambi gli anticorpi reagiscono con la filaggrina nativa, per questo ora sono noti come anticorpi anti-filaggrina (AFA).^{6,7,8} Evidenze recenti hanno mostrato che tutti questi anticorpi sono diretti contro gli epitopi contenenti citrullina.⁹ La citrullina è un amminoacido non standard, in quanto non viene incorporato nelle proteine durante la sintesi proteica. Tuttavia, essa può essere prodotta tramite modificazione post-transazionale dei residui di arginina da parte dell'enzima peptidil-arginina deaminasi (PAD).¹⁰ Nel 1998, Schellekens et coll. hanno riportato che gli autoanticorpi reattivi con i peptidi sintetici lineari contenenti citrullina erano altamente specifici per l'AR in un dosaggio ELISA.¹¹ Studi successivi hanno dimostrato che le varianti cicliche di questi peptidi lineari, denominati peptidi citrullinati ciclici (CCP), erano altrettanto specifiche per l'AR, ma con una maggiore sensibilità rispetto ai peptidi lineari.¹² Nel tentativo di migliorare ulteriormente la sensibilità del test CCP, è stata esaminata con sieri AR un'intera libreria di peptidi contenenti citrullina ed è stata scoperta una nuova serie di peptidi (CCP2) in grado di offrire prestazioni superiori rispetto al test CCP1.¹³ Negli ultimi anni sono stati pubblicati molti rapporti che confermano la valenza diagnostica del test CCP2.¹⁴ Gli anticorpi anti-CCP, spesso detti anticorpi antipeptidi citrullinati (ACPA), sono risultati presenti in uno stadio molto precoce della malattia, spesso in assenza di sintomi clinici, e molti studi indicano che elevati livelli di anti-CCP possono essere indicativi dello sviluppo di malattie erosive.^{15,16,17,18,19,20} Questi risultati suggeriscono un ruolo importante dei peptidi ciclici citrullinati nella diagnosi di AR in uno stadio precoce della malattia.

Nel 2010 sono stati pubblicati i *Criteri ACR / EULAR di Classificazione dell'Artrite Reumatoide*, che hanno sostituito i "vecchi" criteri ACR del 1987 ampiamente ritenuti inadeguati alla diagnosi precoce dell'AR. I nuovi criteri di classificazione, pubblicati congiuntamente dall'American College of Rheumatology (ACR) e dall'European League Against Rheumatism (EULAR), raccomandano un sistema di scoring da 0 a 10. I nuovi criteri di classificazione vanno applicati ad ogni soggetto che presenti una sinovite definitiva (artrite infiammatoria indifferenziata). Gli altri quattro criteri sono: numero di articolazioni interessate, anomalie sierologiche, aumento degli indici di fase acuta e durata dei sintomi nelle articolazioni interessate. Per la prima volta i criteri sierologici comprendono la misurazione degli ACPA, come gli anti-CCP, e la definizione di una debole e di una forte positività del risultato sierologico.²¹ Il dosaggio Anti-CCP di Hycor è un test ELISA basato sulla rilevazione di autoanticorpi nel siero o nel plasma umano diretti contro un peptide sintetico ciclico contenente residui di arginina modificata (peptidi CCP2). Il test rappresenta un ulteriore strumento nella diagnosi di pazienti con AR.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con un peptide citrullinato ciclico sintetico altamente purificato, contenente residui di arginina modificata. Durante la prima incubazione, gli autoanticorpi specifici nel siero o plasma diluito si legano alla superficie rivestita con antigene. I pozzetti vengono quindi lavati per eliminare i componenti non legati. Nella seconda incubazione, il coniugato, un anticorpo policlonale marcato con un enzima verso l'IgG umano, si lega a qualsiasi autoanticorpo legato alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, gli autoanticorpi specifici vengono tracciati per incubazione con il substrato. L'aggiunta di soluzione di arresto pone fine alla reazione, dando luogo ad 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 confrontata con quella legata dal controllo di riferimento. Nel protocollo semi-quantitativo, la concentrazione degli autoanticorpi anti-CCP può essere valutata per interpolazione da una curva dose-risposta basata sui calibratori.

COMPONENTI DEL KIT

CONJ	1 x 15 ml	Anticorpo policlonale di capra marcato con perossidasi del rafano anti-IgG umano, 0,1% (p/vol) acido p-idrossifenilacetico, 0,15% (p/vol) proclina e 1% stabilizzante delle proteine (bovino) (p/vol) in un tampone HEPES. Pronto per l'uso. N.B. IRRITANTE ☒
SUBS	1 x 15 ml	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce. N.B. NOCIVO ☒ ☒
SOLN STOP	1 x 15 ml	Acido solforico 0,25 mol/L soluzione acquosa Pronto per l'uso.
BUF WASH 10 X	3 x 25 ml	Tampone fosfato salino, 1,3% (v/v) Tween 20 Diluire prima dell'uso.
MT PLATE	8 strip di microtitolazione x 12 pozzetti (separate)	Beschichtet mit synthetischem zyklischem citrulliniertem Peptid, in wiederverschließbarer Folienverpackung mit Trockenmittel.
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25 ml	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine (bovino), 0,5% (p/vol) sodio azide. Diluire prima dell'uso. N.B. NOCIVO ☒
CAL 1	1 x 1ml	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine (bovino), < 0,1% (p/vol) sodio azide. 0 U/mL. Pronto per l'uso.
CAL 2 - CAL 6	5 x 1 ml	Plasma umano, tampone fosfato, stabilizzante delle proteine (bovino), < 0,1% (p/vol) sodio azide. 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Pronto per l'uso.
CONTROL REF	1 x 1.5 ml	Plasma umano, tampone, < 0,1% (p/vol) sodio azide. Pronto per l'uso.
CONTROL +	1 x 0.3 ml	Plasma umano, < 0,1% (p/vol) sodio azide. Diluire 1:100 con diluente per campioni diluito prima dell'uso, come per i campioni.
CONTROL -	1 x 0.3 ml	Plasma umano, < 0,1% (p/vol) sodio azide. Diluire 1:100 con diluente per campioni diluito prima dell'uso, come per i campioni.

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Stabilità del kit aperto

Un kit è stato aperto e riutilizzato in tre occasioni in periodo di tempo di tre mesi senza alcun effetto negativo sulle prestazioni. Dopo l'uso, i componenti devono essere nuovamente conservati a 2-8°C.

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit ad una temperatura di 2-8°C ed utilizzarli entro la data di scadenza indicata sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.
2. Non mescolare numeri di lotto diversi.
3. Non congelare i kit.
4. Il tampone di lavaggio concentrato, il diluente per campioni concentrato e i controlli positivo e negativo devono essere diluiti prima dell'uso. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Evitare la contaminazione microbica del tampone di lavaggio diluito e del diluente per campioni diluito e riportare a 2-8°C dopo aver eseguito il test.
6. Riporre le strip di microtitolazione in eccesso (inutilizzate) nella busta di alluminio con l'essiccante. Controllare che la sigillatura sia completa e riportare a 2-8°C, fino al nuovo utilizzo.
7. Conservare il substrato al riparo dalla luce.
8. Evitare la contaminazione dei reagenti. Utilizzare un nuovo puntale monouso del pipettatore per ogni reagente o manipolazione di campione.

Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere incolore oppure presentare una colorazione che arriva fino all'azzurro molto pallido. La presenza di torbidità o precipitazione in qualsiasi componente indica deterioramento, quindi il componente deve essere scartato. Se nel diluente per campioni o lavaggio sono visibili dei cristalli al momento del prelievo dal luogo di conservazione (al freddo), questi scompariranno capovolgendo il diluente e riportandolo a temperatura ambiente.

Prelievo e conservazione dei campioni

Il dosaggio è raccomandato per campioni sierici (compresa provetta con separatore di siero SST) o di plasma umano (EDTA, litio-eparina o citrato di sodio). Non sono stati testati altri tipi di provetta per l'uso nel dosaggio. Non utilizzare campioni emolizzati grossolanamente o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del dosaggio ed evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelamento. Non inattivare i campioni con il calore; questa procedura può produrre falsi risultati positivi. Per la preparazione per l'analisi seguire le istruzioni del produttore per le provette di prelievo. I campioni possono essere conservati non diluiti a 2-8°C per quattro settimane; per periodi più lunghi la temperatura deve essere di -20°C o inferiore. I campioni diluiti a

1:100 nel diluente per campioni diluito devono essere utilizzati entro 24 ore dalla diluizione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.

Precauzioni di sicurezza

- Attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite nel presente foglietto illustrativo, soprattutto relativamente alle condizioni di manipolazione e conservazione.
- I calibratori e i controlli contengono plasma umano testato con dosaggi approvati dalla FDA e trovato non reattivo/negativo per HBsAg, HIV-1 RNA o HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 e anti-HCV o HCV RNA. Dato che nessun test garantisce totalmente l'assenza di agenti infettivi, i calibratori e i controlli devono essere considerati potenzialmente infetti e pertanto manipolati con le stesse precauzioni utilizzate per qualsiasi altro materiale potenzialmente biopercoloso. Le linee guida approvate del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) "Protezione degli operatori di laboratorio dalle infezioni contratte sul lavoro" (M29-A3 – terza edizione),²² descrivono come manipolare questi materiali in conformità con la Buona Pratica di Laboratorio.
- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree in cui si manipolano kit e campioni.
- Proteggere adeguatamente eventuali affezioni cutanee, tagli, abrasioni e altre lesioni della pelle.
- I calibratori, i controlli e il diluente per campioni concentrato contengono sodio azide, che può reagire con le tubature in piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Per lo smaltimento, far defluire i materiali con abbondante acqua per impedire la formazione di azidi.
- Le schede tecniche di sicurezza dei materiali per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit possono essere richieste ad Hycor Biomedical.

CONJ



Irritante

R43: Può causare sensibilizzazione a contatto con la pelle.

S24: Evitare il contatto con la pelle.

S29/35: Non gettare i residui nelle condotte fognarie; non smaltire il prodotto e il recipiente senza aver preso tutte le precauzioni indispensabili.

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

SUBS



Nocivo

R20/21/22: Nocivo per inalazione, ingestione e contatto con la pelle.

R36/37/38: Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle.

S23: Non respirarne i gas e i vapori.

S24/25 Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.

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

S29/35: Non gettare i residui nelle condotte fognarie; non smaltire il prodotto e il recipiente senza aver preso tutte le precauzioni indispensabili.

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

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

SAMPLE DIL 5 X



Nocivo

R22: Nocivo in caso di ingestione.

R32: A contatto con un acido sviluppa gas molto tossico.

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

S29/35: Non gettare i residui nelle condotte fognarie; non smaltire il prodotto e il recipiente senza aver preso tutte le precauzioni indispensabili.

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

S46: I caso di ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta

PREPARAZIONE

Materiali/Attrezzature richieste ma non fornite

- Letto di micropiastre/strip da 96 pozzetti con filtro 450 nm.
- Pipette di precisione per dispensare 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipetta automatica per dispensare 100 µL. Pipetta automatica per dispensare 300 µL per il lavaggio manuale; lavatore automatico per micropiastre opzionale.
- Cilindri graduati in vetro/plastica: 1x100 mL, 1x500 mL.
- Contenitori da 1 mL.
- Acqua distillata/deionizzata.
- Salviette di carta.
- Timer per intervalli da 30 e 60 minuti.

Preparazione per il dosaggio

Prima dell'uso portare tutti i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, a 18-25°C nel giro 30-60 minuti. Miscelare i reagenti capovolgendoli delicatamente.

Non diluire il controllo di riferimento.

Diluire i reagenti seguenti e miscelare accuratamente.

Reagente	Quantità	Aggiungere
Tampone lavaggio concentrato	1 flaconcino	225 ml di acqua distillata/deionizzata
Diluente per campioni concentrato	1 flaconcino	100 ml di acqua distillata/deionizzata
Controlli positivo e negativo/campioni	10 µl	1 ml di diluente per campioni diluito

Calcolare il numero di strip di microtitolazione necessarie per il dosaggio da effettuare e assicurarle nel supporto strip di microtitolazione. Riporre le strip restanti nella busta di alluminio risigillabile con l'essiccante e conservare a 2-8°C fino al nuovo utilizzo. Assicurarsi che tutte le strip siano saldamente trattenute nell'apposito supporto. Se lo desiderano, gli operatori possono numerare ciascuna strip sul bordo superiore per facilitarne l'identificazione. Conservare il supporto delle strip di microtitolazione per gli usi successivi.

PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Protocollo qualitativo: dosaggio controllo di riferimento, controlli positivo e negativo e campioni.

Protocollo semi-quantitativo: dosaggio calibratori (1-6), controlli positivo e negativo, e campioni.

- Stabilire il riferimento dei pozzetti per l'identificazione.
- Pipettare 100 µL di controllo di riferimento/calibratori in duplicato, i controlli positivo e negativo prediluiti (1:100) in duplicato, e i campioni paziente prediluiti (1:100) in duplicato nei relativi pozzetti. Ricordarsi di cambiare il puntale del pipettatore tra le operazioni. Questa fase non deve superare i **10 minuti** per ciascun set di calibratori/controlli/campioni.
- Incubare per 60 ± 10 minuti a 18-25°C.
- Decantare il contenuto delle strip capovolgendole rapidamente su un lavabo idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il rischio potenziale di infezione dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta.
- Lavare i pozzetti **quattro volte** con almeno 300 µL di tampone di lavaggio diluito. **Decantare e asciugare dopo ciascuna fase di lavaggio.**
- Aggiungere 100 µL di coniugato a ciascun pozzetto.
- Incubare per 30 ± 5 minuti a 18-25°C.
- Ripetere le fasi 4 e 5.
- Aggiungere 100 µL di substrato a ciascun pozzetto.
- Incubare per 30 ± 5 minuti a 18-25°C. **Non decantare.**
- Aggiungere 100 µL di soluzione di arresto a ciascun pozzetto, nello stesso ordine e con gli stessi tempi di aggiunta del substrato. Picchiettare leggermente sui pozzetti per miscelare ed assicurarsi che non vi siano bolle visibili.
- Leggere le strip a 450 nm.
- Leggere il dosaggio entro 60 minuti dalla fine del test.

CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per il calcolo e l'interpretazione dei risultati considerare ciascun dosaggio separatamente.

Protocollo Qualitativo

Calcolare il rapporto tra valore medio di assorbanza (densità ottica) dei controlli positivo e negativo e di ciascun campione e il valore medio di assorbanza dei controlli di riferimento:

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{Valore medio di assorbanza campioni o controlli}}{\text{Valore medio di assorbanza controlli di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare un cut-off tra campioni positivi e negativi, che sia specifico per la loro popolazione di pazienti. I risultati della popolazione di pazienti impiegata per la sperimentazione clinica Hycor suggeriscono il cut-off seguente:

Rapporto di assorbanza

< 0,95
≥ 0,95 - ≤ 1,0
> 1,0

Interpretazione dei risultati

Negativo
Borderline - si consiglia di ripetere il test
Positivo

Protocollo Semi-quantitativo

Riportare l'assorbanza media di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione calibratore log₁₀ (v. tabella seguente) su carta millimetrata. Leggere quindi le concentrazioni medie dei controlli positivi e negativi e dei campioni sulla curva di calibrazione. Una curva di calibrazione tipica è riportata di seguito come esempio e non deve essere quindi utilizzata per interpretare i risultati. È possibile anche adottare un sistema di fitting a 4 parametri (4PL) e il cubic spline. Si consiglia di non utilizzare altri sistemi.

I campioni con assorbanza superiore al calibratore 6 (300 U/mL) non rientrano nel range di dosaggio, e devono essere riportati come > 300 U/mL, diluiti e ridosati, correggendo per questo ulteriore fattore di diluizione.

Per l'interpretazione dei risultati Semi-quantitativi e sulla base dei dati della popolazione di riferimento* Hycor, si suggerisce quanto segue:

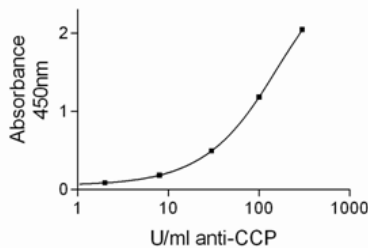
Risultato Medio Campioni	Interpretazione del Risultato
≤ 5 U/mL	Negativo
> 5 U/mL	Positivo

* Quanto sopra rappresenta una semplice linea guida. Si raccomanda che gli utilizzatori stabiliscano un range di riferimento specifico della popolazione.

NB: Come in tutte le misurazioni di anticorpi, questo dosaggio determina l'attività dell'anticorpo presente nel campione piuttosto che la concentrazione. L'attività può essere influenzata da vari parametri, come ad esempio l'avidità degli anticorpi.

Concentrazioni dei calibratori	
Numero calibratore	Concentrazione U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Curva di calibrazione tipica



CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Assicurarsi che la manutenzione e la taratura del lettore di micropiastre siano state eseguite conformemente alle istruzioni del produttore e che venga utilizzata la lunghezza d'onda corretta.

Gli operatori devono avere una conoscenza completa e approfondita delle istruzioni del dosaggio, in particolare della sezione Avvertenze e Precauzioni e delle Note sulla Manipolazione e sulla Procedura. Gli operatori devono inoltre dimostrare, prima di riferire i risultati dei test del paziente, di essere in grado di ottenere prestazioni di precisione e di range riportabile dei risultati paragonabili a quelle stabilite dal produttore. Si consiglia di testare i controlli negativo e positivo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi per controllare la qualità della procedura del test. Testare il controllo di riferimento pronto per l'uso in duplicato in tutti i dosaggi qualitativi.

Presumendo che le specifiche di precisione descritte dal produttore vengano rispettate, se un controllo non soddisfa le specifiche del rapporto di controllo sotto riportate il dosaggio non è valido e i risultati del paziente non devono essere riportati. Una volta rivista la procedura, l'operatore può ripetere il dosaggio o contattare il distributore/produttore. Se si ripete il dosaggio, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. I laboratori possono decidere di includere dei controlli interni in ciascuna sessione di dosaggio. Conservare il materiale di controllo ad una temperatura pari o inferiore a 20°C ed evitare ripetuti congelamenti/scongelamenti. I conservanti, come il sodio azide allo 0,1% (p/v), non influenzano i risultati dei campioni. I livelli degli analiti identificati in particolari patologie sono quelli stabiliti dal produttore per popolazioni specifiche, e possono non riflettere necessariamente la letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, i range di riferimento e i corretti punti di cut-off devono essere calcolati per le popolazioni specifiche di cui si occupano gli operatori.

Specifiche del rapporto di controllo

Protocollo	Specifiche
Qualitativo (rapporti)	Assorbanza controllo positivo ≥ 1.1
	Assorbanza controllo di riferimento Assorbanza controllo negative < 0.95 Assorbanza controllo di riferimento
Semi-quantitativo	Vedere controllo positivo range di accettazione previsto (U/mL) Concentrazione controllo negativo < 2 U/mL

VALORI ATTESI

200 campioni sierici da donatori asintomatici apparentemente sani, di età compresa tra 18 e 72 anni, comprendenti un numero di maschi [n = 105] e femmine [n = 95] pressoché uguale, sono stati sottoposti a test.

Non sono state osservate differenze attribuibili al sesso o all'età (calcolate confrontando i range di età di ≤ 40 anni [n = 115] e > 40 anni [n = 85]).

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

Sulla base di questi dati della popolazione di riferimento e di quelli di una popolazione clinica, il cut-off di dosaggio consigliato è:

Range di riferimento

≤ 5 U/ml = Negativo

> 5 U/ml = Positivo

Si consiglia questo range di riferimento solo come indicazione di massima e ciascun laboratorio dovrà stabilire un range di riferimento specifico per la popolazione che prende in esame, a seconda del fattore geografico, dietologico, ambientale o della pratica clinica. Si ricorda che la prevalenza dell'Artrite Reumatoide nelle femmine è doppia rispetto ai maschi.

DATI DI PRESTAZIONE

Linearità di diluizione

Il dosaggio Anti-CCP di Hycor è stato sviluppato per essere lineare nell'intervallo di misurazione da LOD a 300 U/mL.

Basato su uno studio condotto secondo le linee guida del documento CLSI EP6-A,²³ il dosaggio Anti-CCP di Hycor ha dimostrato linearità da 1,04 U/mL a 300 U/mL.*

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

I campioni > 300 U/mL presentano un recupero medio del ≤100% ± 15%* del risultato atteso in caso di diluizione nel range di dosaggio e di utilizzo del fattore di diluizione corretto.

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Sensibilità e specificità clinica

È stata determinata la sensibilità clinica del dosaggio Anti-CCP Hycor in 229 soggetti con diagnosi confermata di AR e la specificità clinica in 285 campioni di soggetti non affetti da AR (135 di pazienti con altre malattie reumatiche e non reumatiche e 150 di soggetti asintomatici apparentemente sani). Adottando un cut-off di 5,0 U/mL, la sensibilità è risultata del 78% con una specificità del 99%. I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.*

Categoria di campioni	Totale n	Positivo n	% sensibilità
AR	229	179	78

Categoria di campioni	Totale n	Positivo n	% specificità
Campioni di non AR in totale	285	4	98,6
Campioni di non AR sani asintomatici	150	1	99,3
Campioni di patologie non AR ⁺	135	3	97,8

⁺ La specificità clinica di 135 campioni di pazienti con altre patologie reumatiche o non reumatiche è classificata nella tabella seguente.*

Campioni di Patologie non AR	Totale n	Positivi n	Specificità clinica
Totale	135	3	97,8
Poliartrite infiammatoria	41	1	97,6
Positività EBV IgG	18	1	94,4
Tiroidite di Hashimoto	17	0	100
Sindrome di Sjörgen	16	1	93,8
Lupus Eritematoso Sistemico	16	0	100
Vasculite	5	0	100
Sclerodermia	5	0	100
Osteoartrite	4	0	100
Morbo di Crohn	3	0	100
Fenomeno di Raynaud	3	0	100
Colite ulcerosa	2	0	100
Artrite psoriasica	2	0	100
Artrite reattiva	1	0	100
Spondilite anchilosante e polimiosite	2	0	100

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Metodo di comparazione

Il dosaggio Anti-CCP di Hycor è concepito per avere una concordanza del $\geq 99\%$ dei campioni AR e non AR quando questi sono comparati con il dosaggio comparatore anti-CCP. I campioni AR e non AR descritti nella sezione Sensibilità e Specificità Clinica sono stati utilizzati per confrontare il dosaggio anti-CCP di Hycor e il dosaggio anti-CCP di comparatore. Il cut-off adottato per il dosaggio anti-CCP di comparatore era 5,0 U/mL, come indicato nel foglietto illustrativo del produttore. Impiegando un cut-off di 5,0 U/mL per il dosaggio anti-CCP di Hycor è stata calcolata una concordanza del 99%. I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.*

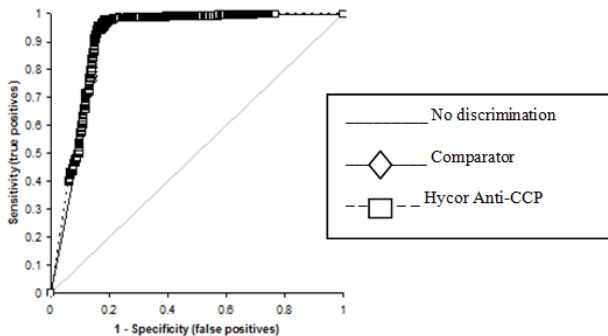
Tutti i campioni (514)

Hycor	Comparatore	
	Positivo	Negativo
Positivo	179	4
Negativo	1	330

Metodo di comparazione	Hycor vs Comparatore
Numero di campioni	65
Pendenza della linea di regressione	0.910
Intercetta Y	1.226
Coefficiente di correlazione	0.94

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

È stata effettuata un'analisi ROC utilizzando i dati sopra indicati ottenuti dai due dosaggi. L'area sottesa dalla curva (AUC) per il dosaggio anti-CCP di Hycor era 0,910 (95% intervallo di confidenza: 0,881-0,940) e 0,903 (95% intervallo di confidenza: 0,871-0,934) per il dosaggio anti-CCP di del comparatore indicando così che entrambi i dosaggi sono paragonabili tenendo conto della loro differenziazione clinica. La curva d'analisi ROC è riportata di seguito.*



* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Precisione

È stato effettuato uno studio secondo le linee guida del documento CLSI (formalmente NCCLS) EP5-A2.²⁴ Due controlli anti-CCP, sei pannelli QC e un campione di siero umano sono stati analizzati usando due lotti di reagenti, in due replicati e in due diverse determinazioni al giorno per 20 giorni (n=80). I dati di questo studio sono sintetizzati nella tabella seguente come dati rappresentativi (arrotondati a 1 decimale):

Campione	Kit Lotto	n	Media (U/ml)	Nella sessione		Tra sessione		Tra giorni		Totale	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Contr	001	80	20.30	1.05	5.2	1.24	6.1	0.00	0.0	1.63	8.0
	003	80	20.62	0.43	2.1	1.20	5.8	0.00	0.0	1.27	6.2
QC 1	001	80	3.72	0.33	8.8	0.17	4.5	0.13	3.6	0.39	10.5
	003	80	3.92	0.23	5.8	0.35	8.9	0.04	1.1	0.42	10.7
QC 2	001	80	8.17	0.34	4.2	0.72	8.8	0.00	0.0	0.80	9.8
	003	80	8.47	0.30	3.6	0.70	8.3	0.25	2.9	0.80	9.5
QC 3	001	80	15.30	0.37	2.4	0.93	6.0	0.30	1.9	1.04	6.8
	003	80	15.98	0.36	2.2	0.92	5.8	0.00	0.0	0.99	6.2
QC 4	001	80	53.55	2.30	4.3	3.19	6.0	1.71	3.2	4.29	8.0
	003	80	55.49	2.36	4.2	3.35	6.0	0.00	0.0	4.09	7.4
QC 5	001	80	94.26	3.17	3.4	7.31	7.8	2.01	2.1	8.22	8.7
	003	80	97.15	2.61	2.7	5.56	5.7	4.79	4.9	7.79	8.0
QC 6	001	80	134.77	4.58	3.4	5.84	4.3	5.74	4.3	9.38	7.0
	003	80	142.41	5.69	4.0	9.02	6.3	0.00	0.0	10.6	7.5
Rif Cont	001	80	5.18	0.34	6.6	0.24	4.6	0.21	4.0	0.46	9.0
	003	80	5.09	0.26	5.1	0.21	4.1	0.21	4.2	0.39	7.7
Camp 1	001	80	4.83	0.16	3.3	0.38	7.9	0.24	5.0	0.48	9.9
	003	80	4.77	0.20	4.1	0.37	7.8	0.25	5.2	0.49	10.2

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (LOD) del dosaggio anti-CCP di Hycor secondo il documento CLSI (formalmente NCCLS) EP17-A²⁵ è risultato pari a 1,04 U/mL*.

Le determinazioni del LOD sono state effettuate utilizzando un campione anti-CCP negativo (60 replicati) e sei campioni con bassi livelli di anti-CCP (15 replicati ciascuno).

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Effetto gancio ad alte dosi

L'effetto gancio ad alte dosi è un fenomeno per effetto del quale campioni con livelli molto elevati possono rientrare nel range dinamico del dosaggio. Per il dosaggio anti-CCP di Hycor, non è stato osservato alcun effetto gancio analizzando un campione contenente circa 3000 U/mL di anticorpi anti-CCP.*

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Interferenza

Il dosaggio anti-CCP di Hycor è concepito in modo da subire uno scostamento massimo della concentrazione di anti-CCP da parte dei seguenti composti potenzialmente interferenti entro:

- $\pm 15\%$ per concentrazioni di anti-CCP $\geq 10,0$ U/mL
- $\pm 10\%$ per concentrazioni di anti-CCP $\geq 4,0$ U/mL - $< 10,0$ U/mL
- $< 0,75$ U/mL per concentrazioni di anti-CCP $< 4,0$ U/mL

È stato condotto uno studio basato sulle linee guida del documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2²⁶ per il dosaggio anti-CCP Hycor. A sei campioni con livelli di anti-CCP su tutto l'intervallo di dosaggio sono stati aggiunti i composti potenzialmente interferenti elencati nella tabella sotto riportata. La deviazione massima di concentrazione di anti-CCP osservata nei campioni nel corso di questi studi è stata la seguente:

- -9,4% - 3,3% per concentrazioni di anti-CCP $\geq 10,0$ U/mL
- -7,3% - 4,8% per concentrazioni di anti-CCP $\geq 4,0$ U/mL - $< 10,0$ U/mL
- -0,6 U/mL - 0,05 U/mL per concentrazioni di anti-CCP $< 4,0$ U/mL*

Sostanza potenzialmente interferente	Nessuna interferenza riscontrata fino alla concentrazione seguente
Emoglobina	4 mg/mL
Bilirubina	0.2 mg/mL
Trigliceridi (soluzione intralipidi)	15 mg/mL
Fattore Reumatoide	200 IU/mL
Proteina totale (gammaglobuline)	120 mg/mL

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

LIMITAZIONI D'USO

1. Sebbene la presenza di anticorpi anti CCP sia associata all'Artrite Reumatoide, un risultato positivo non è diagnostico in sé; i dati devono essere considerati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. Alcuni soggetti possono presentare livelli elevati di anticorpi anti-CCP con scarsa o nessuna evidenza di patologia clinica. Al contrario, alcuni pazienti con patologia attiva possono presentare livelli non rilevabili di questi anticorpi. Il significato clinico di queste informazioni non è attualmente chiaro.
3. Dato che l'esito di un dosaggio di anti-CCP non costituisce una prova diagnostica della presenza o assenza di una patologia clinica, la terapia non dovrà iniziare sulla sola base di un risultato anti-CCP positivo.
4. L'introduzione o le eventuali variazioni della terapia non dovranno dipendere dalle variazioni della concentrazione di autoanticorpi anti-CCP, bensì dall'osservazione clinica.
5. Non è stata definita l'efficacia clinica del monitoraggio dei livelli di autoanticorpi CCP quale indicazione della progressione/remissione dell'Artrite Reumatoide.
6. Il valore degli anti-CCP nell'Artrite Giovanile non è stato determinato.
7. Date le caratteristiche specifiche delle interazioni di antigeni/anticorpi, non è la concentrazione di anticorpo ad essere determinata, ma l'attività. Poiché i sieri dei pazienti contengono popolazioni di anticorpi eterogenee, alcuni campioni possono presentare una non-linearità, soprattutto a diluizioni del campione molto elevate.

USO PREVISTO

La prueba anti-PCC de Hycor es un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) semicuantitativo/cualitativo para la detección de la clase IgG de los anticuerpos específicos del péptido citrulinado cíclico (PCC) en el suero (incluido el tubo separador de suero) o plasma (EDTA, heparina de litio o citrato de sodio) humanos. La detección de los anticuerpos anti-PCC se utiliza para ayudar en el diagnóstico de la artritis reumatoide (AR), y debe utilizarse juntamente con otra información clínica. Los niveles de autoanticuerpos representan un parámetro en un proceso diagnóstico con múltiples criterios, que engloba evaluaciones tanto clínicas como analíticas. Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica frecuente que afecta entre el 0,5% y el 1,0% de la población adulta. La AR se caracteriza por la inflamación crónica del sinovio, que puede desembocar en la destrucción progresiva de la articulación y, en muchos casos, provocar la discapacidad y la reducción de la calidad de vida.¹ Por lo general, se acepta que la intervención precoz resulta fundamental en la prevención del daño articular irreversible y, para ello, resulta importante diagnosticar la AR en la fase más temprana posible dentro de la evolución de la enfermedad.^{2,3} El diagnóstico de la AR se basa principalmente en características clínicas, radiológicas e inmunológicas. La prueba serológica más frecuente es la medición del factor reumatoide (FR).⁴ Aunque la prueba del FR tiene una buena sensibilidad, no es específica para la AR, ya que está presente a menudo en personas sanas y en pacientes con otras enfermedades reumáticas o inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias o infecciones crónicas.⁵

Durante varios años, se ha reconocido que los anticuerpos del factor antiperinuclear (APF) y de la keratina (AKA) son altamente específicos para la AR. Posteriormente, se ha informado que estos dos anticuerpos reaccionan con la filagrina nativa y ahora son conocidos como anticuerpos antifilagrina (AFA).^{6,7,8} Algunos datos recientes han demostrado que estos anticuerpos están dirigidos a los epítomos que contienen citrulina.⁹ La citrulina es un aminoácido poco común, ya que no se incorpora a las proteínas durante la síntesis proteica. No obstante, puede generarse mediante modificación postranslacional de los residuos de arginina por parte de la enzima peptidilarginina deiminasa (PAD).¹⁰ En 1998, Schellekens y cols. informaron que los anticuerpos reactivos con los péptidos sintéticos lineales que contenían citrulina eran altamente específicos para la AR en un ensayo basado en ELISA.¹¹ En estudios posteriores se ha demostrado que las variantes cíclicas de estos péptidos lineales, llamados péptidos citrulinados cíclicos (PCC) eran igual de específicos para la AR, pero con una sensibilidad mayor que los péptidos lineales.¹² En un esfuerzo para mejorar aún más la sensibilidad de PCC, se hizo el cribaje de un banco dedicado de péptidos con citrulina con sueros de AR y se descubrió un conjunto nuevo de péptidos (PCC2) que aportó un rendimiento superior en comparación con la prueba PCC1.¹³ En los últimos años, muchos informes publicados han confirmado el rendimiento diagnóstico del análisis PCC2.¹⁴ Se ha observado que los anticuerpos anti-PCC, que a menudo se los conoce también como anticuerpos anti-proteínas/péptidos citrulinados (ACPA), están presentes en fases muy tempranas de la enfermedad, con frecuencia en ausencia de síntomas clínicos y muchos informes indican que las concentraciones elevadas de anticuerpos anti-PCC pueden prever el desarrollo de enfermedad erosiva.^{15,16,17,18,19,20} Estos resultados sugieren una función importante para los péptidos citrulinados cíclicos en el diagnóstico de la AR en una fase temprana de la evolución de la enfermedad.

En 2010 se publicaron los *Criterios de Clasificación de la Artritis Reumatoide de ACR/EULAR*, que sustituyeron los criterios "antiguos" de ACR de 1987, que muchos consideraban que no eran adecuados para el diagnóstico precoz de la AR. Estos criterios de clasificación revisados, publicados conjuntamente por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y por la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR), recomiendan un sistema de puntuación de entre 0 y 10. Los nuevos criterios de clasificación se deben aplicar a las personas que presenten sinovitis definitiva (artritis inflamatoria indiferenciada). Los cuatro criterios adicionales fueron el número de articulaciones afectadas, presencia de anomalías serológicas, respuesta en la fase aguda y duración de los síntomas en las articulaciones afectadas. Por primera vez, los criterios serológicos incluyeron la medición de las ACPA, como los anti-PCC, así como una definición de un resultado serológico positivo bajo y positivo alto.²¹ El ensayo anti-PCC de Hycor es un ELISA basado en la detección de autoanticuerpos en el suero o plasma humanos hacia un péptido cíclico sintético que contiene residuos de arginina modificados (péptidos PCC2). El análisis proporciona un instrumento adicional para el diagnóstico de los pacientes con AR.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los pocillos de las tiras de microtitulación están recubiertos con un péptido citrulinado cíclico sintético altamente purificado que contiene residuos de arginina modificada. Durante la primera incubación, anticuerpos específicos en el suero o plasma diluidos se unen a la superficie recubierta con el antígeno. Entonces, se lavan los pocillos para eliminar los componentes no unidos. En una segunda incubación, el conjugado, un anticuerpo policlonal marcado con enzimas a la IgG humana, se une a cualquier autoanticuerpo unido a la superficie. Después de volver a lavar, se trazan los autoanticuerpos específicos mediante incubación con el sustrato. Se añade la solución de parada para detener la reacción, lo que produce un producto final de color, y se determina la cantidad de conjugado unido en unidades de absorbancia. En el protocolo cualitativo, la cantidad de conjugado unido por la muestra se compara con aquel unido por el control de referencia. En el protocolo semicuantitativo, se puede estimar la

concentración de autoanticuerpo anti-PCC mediante interpolación de una curva dosis-respuesta basada en calibradores.

COMPONENTES DEL KIT

CONJ	1 x 15 ml	Anticuerpo policlonal de cabra marcado con peroxidasa de rábano a la IgG humana, ácido p-hidroxifenilacético al 0,1% (p/v), Proclina al 0,15% (p/v) y estabilizador de proteína (bovina) al 1% (p/v) en un tampón de HEPES. Listo para usar. Nota: IRRITANTE
SUBS	1 x 15 ml	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, solución amortiguadora. Listo para usar No exponer a la luz durante el almacenamiento. Nota: NOCIVO
SOLN STOP	1 x 15 ml	Ácido sulfúrico 0,25 mol/l, solución acuosa. Listo para usar.
BUF WASH 10 X	3 x 25 ml	Tampón fosfato salino, 1,3% (v/v), Tween 20 Diluir antes de usar.
MT PLATE	8 x 12 tiras con pocillos de microtitulación (separables)	Recubiertos con péptido citrulinado cíclico sintético, en un envase de papel de aluminio resellable con desecante.
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25 ml	Tampón fosfato, estabilizador de proteína (bovina), 0,5% (p/v), azida sódica. Diluir antes de usar. Nota: NOCIVO
CAL 1	1 x 1ml	Tampón fosfato, estabilizador de proteína (bovina), <0,1% (p/v), azida sódica. 0 U/ml. Listo para usar
CAL 2 - CAL 6	5 x 1 ml	Plasma humano, tampón fosfato, estabilizador de proteína (bovina), <0,1% (p/v) azida sódica. 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. Listo para usar
CONTROL REF	1 x 1.5 ml	Plasma humano, tampón, <0,1% (p/v), azida sódica. Listo para usar
CONTROL +	1 x 0.3 ml	Plasma humano, tampón, <0,1% (p/v), azida sódica. Diluir 1:100 con diluyente de muestra diluido antes del uso, como con las muestras.
CONTROL -	1 x 0.3 ml	Plasma humano, tampón, <0,1% (p/v), azida sódica. Diluir 1:100 con diluyente de muestra diluido antes del uso, como con las muestras.

ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Estabilidad del kit una vez abierto

Se abrió y reutilizó un kit en tres ocasiones durante un periodo de tres meses sin ningún efecto adverso sobre su rendimiento. Después de su uso, los componentes deben conservarse de nuevo a una temperatura de 2-8°C.

Notas sobre la manipulación y el procedimiento

1. Guardar los componentes del kit a una temperatura entre 2°C y 8°C y utilizarlos 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 tampón de lavado, el concentrado de diluyente de muestra y los controles positivos y negativos deben diluirse antes de su uso. Todos los demás reactivos están listos para usar.
5. Asegurarse que se evita la contaminación microbiana del tampón de lavado diluido y del diluyente de muestra diluido y volver a guardarlos a una temperatura de entre 2°C y 8°C después del análisis.
6. Volver a colocar las tiras de microtitulación sobrantes (sin utilizar) en el envase de papel de aluminio con el desecante. Asegurarse de que el sellado es integral y volver a guardarlas a una temperatura de entre 2°C y 8°C, hasta que sea necesario.
7. No exponer el sustrato a la luz durante el almacenamiento.
8. Evitar la contaminación de los reactivos. Utilizar una punta de pipeta desechable nueva para cada manipulación de reactivos o muestras.

Indicios de deterioración

El sustrato debe ser entre incoloro y de un color azul muy pálido. La turbidez o precipitación de cualquier componente indica deterioro, por lo que se deberá desechar el componente.

Si hay cristales visibles en el diluyente de lavado o de la muestra al sacarlo del almacenaje en frío, éstos se disolverán con la inversión y al volver a temperatura ambiente.

Recogida y conservación de muestras

El análisis está recomendado para muestras de suero (incluido tubo separador de suero [TSS]) o plasma (EDTA, heparina de litio o citrato de sodio) humanos. No se han analizado otros tipos de tubos para su uso en este análisis. No utilizar muestras fuertemente hemolizadas o turbidas. Mezclar completamente las muestras descongeladas antes del análisis y evitar repetir el ciclo de congelado/descongelado. No inactivar las muestras por calor, podría dar resultados falsos positivos.

Para la preparación para el análisis, seguir las instrucciones del fabricante del tubo para los tubos de recogida. Las muestras pueden conservarse sin diluir a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante cuatro semanas; para un almacenamiento más prolongado deben conservarse a una temperatura de -20°C o inferior. Las muestras diluidas a 1:100 en diluyente de muestra diluido deben utilizarse en el plazo de 24 horas desde la dilución.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Sólo para uso en diagnóstico in vitro

Precauciones de seguridad

- Seguir estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento.
- Los calibradores y controles contienen plasma humano analizado con ensayos aprobados por la FD para HBsAg, ARN de VIH-1 o Ag de VIH-1, anti-VIH-1/VIH-2 y anti-VHC o ARN de VHC, que resultaron no reactivo/negativo. Como no hay ninguna prueba que ofrezca la seguridad total de la ausencia de agentes infecciosos, los calibradores y los controles deberán considerarse potencialmente infecciosos y manipularse con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. Las pautas "Protección de los trabajadores de laboratorio de infecciones adquiridas en el trabajo" (M29-A3 - Tercera edición),²² aprobadas por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) describen cómo deben manipularse estos materiales de conformidad con la Buena Práctica Clínica.
- No pipetear con la boca.
- No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- Se deben proteger debidamente todos los problemas cutáneos, cortes, abrasiones y otras lesiones cutáneas.
- Los calibradores, controles y concentrado de diluyente de muestra contienen azida sódica que puede reaccionar con el plomo y el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar los residuos, usar abundante agua para evitar la formación de estas azidas.
- Las hojas de datos de seguridad de los materiales de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición a Hycor Biomedical.

CONJ



Irritante

R43: Puede causar sensibilización en contacto con la piel.

S24: Evítase el contacto con la piel.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe. Desechar este material y su contenedor de forma segura.

S36/37/39: Llevar ropa protectora adecuada, guantes, gafas y máscara de protección.

SUBS



Nocivo

R20/21/22: Nocivo por inhalación, en contacto con la piel y por ingestión.

R36/37/38: Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.

S23: No inhalar los vapores.

S24/25: Evitar el contacto con la piel y los ojos.

S26: En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar asistencia médica.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe. Desechar este material y su contenedor de forma segura.

S36/37/39: Llevar ropa protectora adecuada, guantes, gafas y máscara de protección.

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

SAMPLE DIL 5 X



Nocivo

R22: Nocivo por ingestión.

R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

R52/53: Nocivo para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos de larga duración en el entorno acuático.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe. Desechar este material y su contenedor de forma segura.

S36/37/39: Llevar ropa protectora adecuada, guantes, gafas y máscara de protección.

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

PREPARACIÓN

Materiales/Equipo necesarios pero no incluidos en el kit

- Lector de placa/tira de 96 pocillos con filtro de 450 nm.
- Pipetas de precisión para dispensar 10 µl, 100 µl, 1 ml. Pipeta automática para dispensar 100 µl. Pipeta automática para dispensar 300 µl para lavado manual; lavador automático de placas opcional.
- Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1×100 ml, 1×500 ml.
- Contenedores de 1 ml de volumen.
- Agua destilada/desionizada.
- Toallas de papel.
- Temporizador para intervalos de 30 y 60 minutos.

Preparación para el análisis

Dejar que todos los componentes del kit, incluidas las tiras de microtitulación, se calienten hasta entre 18°C y 25°C durante 30-60 minutos antes de su uso. Mezclar los reactivos invirtiéndolos suavemente.

No diluya el control de referencia.

Diluir los siguientes reactivos y mezclarlos completamente.

Reactivo	Volumen	Añadir
Concentrado de tampón de lavado	1 vial	225 ml agua destilada/desionizada
Concentrado de diluyente de muestra	1 vial	100 ml agua destilada/desionizada
Controles positivos y negativos/muestras	10 µl	1 ml de diluyente de muestra diluido

Calcular el número de tiras de microtitulación que necesita para el ensayo y conservar las demás en el soporte para tiras de microtitulación. Devolver las tiras sobrantes al envase de papel de aluminio resellable con el desecante y conservarlas a entre 2°C y 8°C, hasta que sea necesario. Asegurarse de que todas las tiras quedan bien fijadas dentro del soporte para tiras de microtitulación. Los usuarios pueden numerar cada tira en la extremo superior para ayudar la identificación. Conservar el soporte para tiras de microtitulación para utilizarlo más veces.

PROTOCOLO DEL ANÁLISIS

Protocolo cualitativo: control de referencia, controles positivos y negativos y muestras del análisis.

Protocolo semicuantitativo: calibradores (1-6), controles positivos y negativos y muestras del análisis.

- Establecer referencias en los pocillos para su identificación.
- Pipetear 100 µl de control de referencia/calibradores por duplicado, controles positivos y negativos prediluidos (1:100) por duplicado y muestras de paciente prediluidas (1:100) por duplicado en los pocillos pertinentes. Recordar cambiar las puntas de las pipetas entre adiciones. Este paso no debería superar los **10 minutos** para cada uno de los conjuntos de calibradores/controles/muestras.
- Incubar durante 60 ± 10 minutos a 18°C-25°C.
- Decantar el contenido de la tira mediante inversión rápida sobre una pila adecuada para desechar materiales biológicos, teniendo en cuenta el potencial peligro infeccioso de las muestras. Secar las tiras invertidas bien con toallas de papel.
- Lavar los pocillos **cuatro veces** con un mínimo de 300 µl de tampón de lavado diluido. **Decantar y secar después de cada paso de lavado.**
- Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo.
- Incubar durante 30 ± 5 minutos a 18°C-25°C.
- Repetir los pasos 4 y 5.
- Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo.
- Incubar durante 30 ± 10 minutos a 18°C-25°C. **No decantar.**
- Añadir 100 µl de solución de parada a cada pocillo, en el mismo orden y velocidad que la adición del sustrato. Golpear suavemente los pocillos para mezclar y asegurarse de que no hay burbujas visibles.
- Leer las tiras a 450 nm.
- Leer la prueba 60 minutos después de finalizar el análisis.

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Al calcular e interpretar los resultados se debe tener en cuenta cada prueba por separado.

Protocolo cualitativo

Calcular la proporción del valor de absorbancia medio (densidad óptica) para los controles positivos y negativos y para cada muestra hasta el valor de absorbancia del control de referencia medio:

$$\text{Proporción de absorbancia} = \frac{\text{Valor de absorbancia medio de muestra o control}}{\text{Valor de absorbancia de control de referencia medio}}$$

Los usuarios deben calcular un límite entre las muestras positivas y las negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes utilizadas en el ensayo clínico de Hycor sugieren el siguiente límite:

Proporción de absorbancia

< 0,95
 ≥ 0,95 a ≤ 1,0
 > 1,0

Interpretación del resultado

Negativo
 Límite - se recomienda repetir la prueba
 Positivo

Trazar el valor de absorbancia medio de cada calibrador en comparación con la concentración del calibrador log₁₀ (ver la tabla siguiente) sobre el papel de gráfico pertinente. Entonces se pueden leer las concentraciones medias de los controles positivos y negativos y las muestras a partir de la curva de calibración; a continuación se muestra un trazado de la curva de calibración típica como referencia, no se debe utilizar para interpretar los resultados. Resultan satisfactorios los ajustes de curvas de logística de 4 parámetros y spline cúbico. No se recomienda el uso de otros modelos de ajuste de curvas.

Las muestras con absorbancias por encima del calibrador 6 (300 U/ml) están fuera del intervalo del análisis y deberán señalarse como > 300 U/ml, diluido y nuevamente analizado, con corrección de este otro factor de dilución.

Para la interpretación de los resultados semicuantitativos y basándose en los datos de la población de referencia* de Hycor, se sugiere:

Resultado medio de muestra

≤ 5 U/ml
 > 5 U/ml

Interpretación del resultado

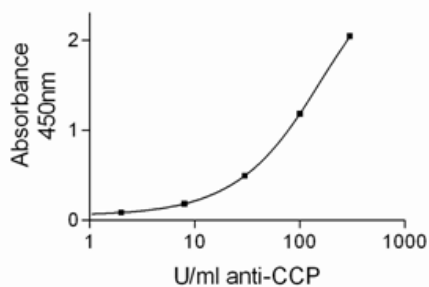
Negativo
 Positivo

*Sólo es una sugerencia de orientación. Se recomienda que los usuarios establezcan un intervalo de referencia, que puede ser exclusivo de la población.

Nota: Como en todos los análisis que miden anticuerpos, este análisis determina la actividad del anticuerpo presente en la muestra, y no la concentración. La actividad puede verse afectada por cierto número de parámetros, por ejemplo, la avidez de los anticuerpos.

Concentraciones del calibrador	
Número de calibrador	Concentración U/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Curva de calibración 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. Antes de notificar los resultados de la prueba del paciente, los usuarios deberían demostrar que pueden obtener unas especificaciones de funcionamiento de precisión e intervalo notificable de los resultados de la prueba comparables con las establecidas por el fabricante. Se recomienda que los Controles Positivos y Negativos prediluidos se realicen por duplicado en todos los ensayos para vigilar 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 hecho que un control no cumpla 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, preparar una dilución nueva de cada control y muestra. Los laboratorios pueden querer incluir controles internos en cada realización del análisis. Almacene este material de control a una temperatura de -20°C o inferior y evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación. Los conservantes, como p. ej. la azida sódica al 0,1% (w/v), no afectarán a los resultados de las muestras.

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

Especificaciones de Tasa de Control

Protocolo	Especificaciones
Cualitativo (proporciones)	$\frac{\text{Absorbancia de control positivo}}{\text{Absorbancia de control de referencia}} \geq 1.1$ $\frac{\text{Absorbancia de control negativo}}{\text{Absorbancia de control de referencia}} < 0.95$
Semicuantitativo	Véase Control Positivo 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]. No se observaron diferencias atribuibles al sexo 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 ± 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 límite sugerido para el análisis es:

Intervalo de valores de referencia

≤ 5 U/ml = negativo
 > 5 U/ml = positivo

Este intervalo de referencia se sugiere únicamente como guía y cada laboratorio debe determinar un intervalo de referencia adecuado para la población a la que atiende, en función de los factores geográficos, de los pacientes, alimenticios, medioambientales y de la práctica clínica. Hay que señalar que la artritis reumatoide tiene una prevalencia casi doble en mujeres que en hombres.

DATOS SOBRE EL RENDIMIENTO

Linealidad de la dilución

El análisis anti-PCC Hycor está diseñado para ser lineal en todo el intervalo de medición desde el LDD hasta 300 U/ml.

Basándose en un estudio realizado con la guía del Documento EP6-A del CLSI,²³ el análisis anti-PCC de Hycor demostró linealidad de 1,04 U/ml a 300 U/ml.*

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Las muestras > 300 U/ml presentan una recuperación media del ≤ 100% ± 15%* del resultado previsto cuando se diluyen dentro del intervalo del ensayo y se utiliza el factor de dilución correcto.

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Sensibilidad y especificidad clínicas

Se determinó la sensibilidad clínica del análisis anti-PCC de Hycor para 229 personas con AR confirmada y se determinó la especificidad clínica para 285 muestras no AR (135 de pacientes con otros trastornos reumáticos y no reumáticos y 150 de pacientes aparentemente sanos asintomáticos). Utilizando un límite de 5,0 U/ml, se calculó la sensibilidad en el 78% con una especificidad del 99%. En las tablas siguientes se resumen los resultados.*

Categoría de la muestra	Total n	Positivo n	% Sensibilidad
AR	229	179	78

Categoría de la muestra	Total n	Positivo n	% Especificidad
Muestras no AR en total	285	4	98.6
Asintomáticos sanos no AR	150	1	99.3
Muestras de enfermedad no AR*	135	3	97.8

* En la siguiente tabla se categoriza la especificidad clínica de las 135 muestras de pacientes con otros trastornos reumáticos y no reumáticos.*

Muestras de enfermedades no AR	Total n	Positivo n	Especificidad clínica
Total	135	3	97.8
Poliartritis inflamatoria	41	1	97.6
IgG positiva para VEB	18	1	94.4
Tiroiditis de Hashimoto	17	0	100
Síndrome de Sjögren	16	1	93.8
Lupus eritematoso sistémico	16	0	100
Vasculitis	5	0	100
Escleroderma	5	0	100
Artrosis	4	0	100
Enfermedad de Crohn	3	0	100
Fenómeno de Raynaud	3	0	100
Colitis ulcerosa	2	0	100
Artritis psoriásica	2	0	100
Artritis reactiva	1	0	100
Espondilitis anquilosante y polimiositis	2	0	100

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Comparación de métodos

El análisis anti-PCC de Hycor está diseñado para tener una concordancia de $\geq 99\%$ para muestras de AR y no AR en comparación con un análisis anti-PCC de referencia. Las muestras de AR y no AR que se describen en el apartado de sensibilidad y especificidad clínicas se utilizaron para comparar el análisis anti-PCC de Hycor con el análisis anti-PCC de referencia. El límite empleado para el análisis anti-PCC de referencia fue de 5,0 U/ml, tal como se indica en el prospecto del fabricante. Con un límite de 5,0 U/ml para el análisis anti-PCC de Hycor, se calculó que la concordancia era del 99%. En las tablas siguientes se resumen los resultados.*

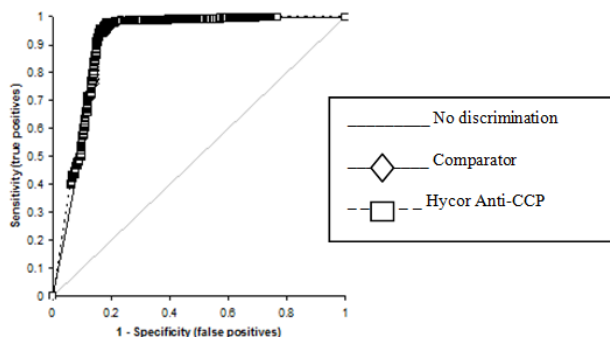
Todas las muestras (514)

Hycor		Referencia	
		Positivo	Negativo
Hycor	Positivo	179	4
	Negativo	1	330

Método de comparación	Hycor vs Referencia
Número de muestras	65
Curva de regresión	0.910
Intercepción de Y	1.226
Coefficiente de correlación	0.94

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Se efectuó un análisis de la característica operativa del receptor (ROC, Receiver Operator Characteristic) utilizando los datos anteriores para ambos análisis. El área bajo la curva (AUC) para el análisis anti-PCC de Hycor fue de 0,910 (intervalo de confianza 95%: 0,881-0,940) y 0,903 (intervalo de confianza 95%: 0,871-0,934) para el análisis anti-PCC de referencia, lo que indica que ambos análisis son equiparables en cuanto a la diferenciación clínica. A continuación se muestra la curva del análisis ROC.*



* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Precisión

Se realizó un estudio siguiendo el Documento EP5-A2 del CLSI (antes NCCLS).²⁴ Se analizaron dos controles anti-PCC, seis miembros del panel de CC y una muestra de suero humano utilizando dos lotes de reactivos, en réplicas de dos, en dos momentos del día diferentes durante 20 días (n=80). Los datos de este estudio se resumen en la tabla siguiente como datos representativos (redondeados a 1 decimal):

Muestra	Lote del kit	n	Media (U/ml)	Intraensayo		Interensayo		Interdía		Total	
				DE	%C V	DE	%C V	DE	%C V	SD	%CV
Control +	001	80	20.30	1.05	5.2	1.24	6.1	0.00	0.0	1.63	8.0
	003	80	20.62	0.43	2.1	1.20	5.8	0.00	0.0	1.27	6.2
CC 1	001	80	3.72	0.33	8.8	0.17	4.5	0.13	3.6	0.39	10.5
	003	80	3.92	0.23	5.8	0.35	8.9	0.04	1.1	0.42	10.7
CC 2	001	80	8.17	0.34	4.2	0.72	8.8	0.00	0.0	0.80	9.8
	003	80	8.47	0.30	3.6	0.70	8.3	0.25	2.9	0.80	9.5
CC 3	001	80	15.30	0.37	2.4	0.93	6.0	0.30	1.9	1.04	6.8
	003	80	15.98	0.36	2.2	0.92	5.8	0.00	0.0	0.99	6.2
CC 4	001	80	53.55	2.30	4.3	3.19	6.0	1.71	3.2	4.29	8.0
	003	80	55.49	2.36	4.2	3.35	6.0	0.00	0.0	4.09	7.4
CC 5	001	80	94.26	3.17	3.4	7.31	7.8	2.01	2.1	8.22	8.7
	003	80	97.15	2.61	2.7	5.56	5.7	4.79	4.9	7.79	8.0
CC 6	001	80	134.77	4.58	3.4	5.84	4.3	5.74	4.3	9.38	7.0
	003	80	142.41	5.69	4.0	9.02	6.3	0.00	0.0	10.6	7.5
Con. De Ref	001	80	5.18	0.34	6.6	0.24	4.6	0.21	4.0	0.46	9.0
	003	80	5.09	0.26	5.1	0.21	4.1	0.21	4.2	0.39	7.7
Muestra 1	001	80	4.83	0.16	3.3	0.38	7.9	0.24	5.0	0.48	9.9
	003	80	4.77	0.20	4.1	0.37	7.8	0.25	5.2	0.49	10.2

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Límite de detección

Se encontró que el límite de detección (LDD) del análisis anti-PCC de Hycor según el Documento EP17-A²⁵ del CLSI (antes NCCLS) era de 1,04 U/ml.*

Las determinaciones del LDD se realizaron utilizando una muestra anti-PCC negativa (60 réplicas) y seis muestras anti-PCC de nivel bajo (15 réplicas cada una).

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

"High Dose Hook"

El efecto High Dose Hook es un fenómeno por el cual muestras con concentraciones muy elevadas pueden dar una lectura dentro del intervalo dinámico del ensayo. Para el análisis anti-PCC de Hycor, no se observó ningún efecto High Dose Hook al analizar una muestra que contenía aproximadamente 3000 U/ml de anticuerpo anti-PCC.*

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

Interferencia

El análisis anti-PCC de Hycor está diseñado para tener una desviación máxima en la concentración anti-PCC de los siguientes componentes con capacidad potencial de interferir dentro de:

- $\pm 15\%$ para concentraciones anti-PCC $\geq 10,0$ U/ml
- $\pm 10\%$ para concentraciones anti-PCC $\geq 4,0$ U/ml a $< 10,0$ U/ml
- $< 0,75$ U/ml para concentraciones anti-PCC $< 4,0$ U/ml

Se llevó a cabo un estudio basado en las pautas del Documento EP7-A2²⁶ del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) para el análisis anti-PCC de Hycor. Se complementaron seis muestras con niveles anti-PCC de todo el intervalo del análisis con los compuestos con capacidad potencial de interferir enumerados en la tabla siguiente. Durante estos estudios, la desviación máxima observada en las muestras de la concentración anti-PCC osciló entre:

- -9,4% y 3,3% para concentraciones anti-PCC $\geq 10,0$ U/ml
- -7,3% y 4,8% para concentraciones anti-PCC $\geq 4,0$ U/ml a $< 10,0$ U/ml
- -0,6 U/ml y 0,05 U/ml para concentraciones anti-PCC $< 4,0$ U/ml*

Sustancia con capacidad potencial de interferir	No se encontró ninguna interferencia hasta la siguiente concentración
Hemoglobina	4 mg/mL
Bilirubina	0.2 mg/mL
Triglicéridos (Solución Intralipid)	15 mg/mL
Factor reumatoide	200 IU/mL
Proteína total (Gammaglobulinas)	120 mg/mL

* Datos representativos. Los resultados en laboratorios individuales pueden variar respecto a estos datos.

LIMITACIONES DE USO

1. Aunque la presencia de anticuerpos a PCC se asocia con la artritis reumatoide, un resultado positivo no supone por sí mismo un diagnóstico, se deben considerar los datos a la luz de otros resultados clínicos y analíticos.
2. Algunas personas pueden presentar concentraciones elevadas de anticuerpos anti-PCC con pocos o ningún indicio de patología clínica. En cambio, algunos pacientes con enfermedad activa pueden tener concentraciones indetectables de estos anticuerpos. Actualmente no está clara la significación clínica de esta información.
3. Como el resultado de un análisis anti-PCC no supone una prueba diagnóstica de la presencia o ausencia de patología clínica, no se debe iniciar el tratamiento en base únicamente a un resultado positivo para anti-PCC.
4. El inicio o los cambios de tratamiento no deben basarse en cambios en la concentración de autoanticuerpos anti-PCC, sino en las observaciones clínicas.
5. Aún no se ha definido la efectividad clínica del control 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 mostrar no linealidad, especialmente en muestras muy diluidas.

	English	Français	Deutsch	Italiano	Español
	Batch / Lot code	Code du lot	Chargenbezeichnung	Codice del lotto	Código de lote
	Expiry / Use by	Date du expiration	Verwendbar bis	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Manufactured by	Fabriqué par	Hergestellt von	Fabbricato da	Fabricado por
	Store at	Conserver à	Lagerung bei	Conservare a	Conservar a
	See instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso
	For in vitro diagnostic use only	Pour utilisation in vitro uniquement	Nur zur in vitro Verwendung	Per uso diagnostico in vitro	Sólo para el uso diagnóstico in vitro
	Negative control	Contrôle négatif	Negativ Kontrolle	Controllo negativo	Control negativo
	Positive control	Contrôle positif	Positiv Kontrolle	Controllo positivo	Control positivo
	Catalogue number	Code produit	Bestellnummer	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Authorized representative	Représentant Autorisé	Autorisierter Repräsentant	Rappresentante Autorizzato	Representante Autorizado
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests	Enthält ausreichend Reagenzien für <n> Tests	Contenuto sufficiente per <n> test	Contiene lo necesario para <n> test
	Calibrator 1	Calibrateur 1	Kalibrator 1	Calibratore 1	Calibrador 1
	Calibrator 2-6	Calibrateur 2-6	Kalibrator 2-6	Calibratore 2-6	Calibrador 2-6
	Conjugate	Conjugué	Konjugat	Conjugate	Conjugar
	Microtiter plate	Plaque de microtitration	Mikrotiterplatte	Piatto Microtiter	Plato Microtiter
	Sample diluent	Diluant	Proben verdüner	Diluire prova	Diluir muestra
	Wash buffer Concentrate	Solution de lavage Concentré	Waschpuffer Konzentrat	lavari di tampone concentrare	lavado de defensa concentrar
	Substrate	Substrat	Substrat	Substrato	Substrato
	Stop solution	Solution d'arrêt	Stop Lösung	terminare la soluzione	Parar la solución
	Reference Control	Témoïn de référence	Referenzkontrolle	Controllo di riferimento	Control de referencia
	Protect from light	Protéger de la lumière	Vor Licht schützen	Tenere al riparo dalla luce	Proteger de la luz



Hycor Biomedical
7272 Chapman Ave
Garden Grove
California 92841
U.S.A.
+1 800 382 2527 (Tel)
+1 714 901 1264 (Fax)

www.hycorbiomedical.com

Advena Ltd.
Pure Offices
Plato Close
Warwick CV34 6WE
U.K.
+44(0) 1926 800153 (Tel)

REFERENCES

- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid Arthritis. *Cell* 1996;85:307-10.
- Landewé RB. The benefits of early treatment in rheumatoid arthritis: confounding by indication, and the issue of timing. *Arthritis Rheum* 2003;48(1):1-5
- Lard LR, Visser H, Speyer I, et al. Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am J Med* 2001;111:446-51.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-24.
- van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 2002;60(10):383-8.
- Nienhuis RL, Mandema E, Smids C. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964;23:302-05.
- Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979;2:97-9.
- Hoet RM, Boerbooms AM, Arends M, et al. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* 1991;50:611-8.
- Sebbag M, Simon M, Vincent C, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995;95:2672-9
- Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, et al. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* 2003;25:1106-18
- Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;101(1):273-81
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000;43(1):155-63.
- Vossenaar ER, van Venrooij WJ. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis. *Clin Applied Immunol Rev* 2004;4:239-62.
- Pruin GJ, Vossenaar ER, Drijfhout JW, et al. Anti-CCP antibody detection facilitates early diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reviews* 2005;1(1):1-7.
- Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10):2741-49
- Nielen MM, van Schaardenbur D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(2):380-386
- van Gaalen, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3):709-15
- Meyer O, Labarre C, Dougados M, et al. Anticitrullinated protein / peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:120-26
- Forslund K, Ahlmén M, Eberhardt K, et al. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1090-95
- Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1085-89
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62(9):2569-81
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
- The National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline*. NCCLS document EP6-A. Wayne, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
- The National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition*. NCCLS document EP5-A2. Wayne, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.
- The National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline*. NCCLS document EP17-A Wayne, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI document EP7-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.