

## Instruction

# IMMUNOSCAN CCPlus®

For professional use only  
Usage réservé aux professionnels  
Sólo para uso profesional  
Nur für den Fachgebrauch  
Solo per uso professionale  
Apenas para utilização profissional  
Kun til professionel brug  
Kun til bruk av fagpersonell  
Endast för professionell användning



Document No. LABEL-DOC-0613 1.0

### IMMUNOSCAN CCPlus®

English:	page.....	2
Français:	page.....	17
Español:	página .....	34
Deutsch:	Seite.....	50
Italiano:	pagina .....	66
Português:	página .....	82
Dansk:	side .....	98
Norsk:	side .....	114
Svenska:	sida .....	130

REF

RA-96PLUS

IVD

## **INTENDED USE**

The Immunoscan CCPlus® test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative and semi-quantitative determination of IgG antibodies to Cyclic Citrullinated Peptides (CCP) in human sera. The assay is used to detect antibodies in a single serum specimen. The results of the assay are to be used as an aid to the diagnosis of Rheumatoid Arthritis (RA), in conjunction with other laboratory and clinical findings. The analysis should be performed by trained laboratory professionals. "For in vitro diagnostic use".

## **SUMMARY AND EXPLANATION**

Rheumatoid Arthritis (RA) is one of the most common systemic autoimmune diseases. The aetiology of the disease, which affects up to 1-2% of the world population, is unknown. The diagnosis of RA depends primarily on clinical manifestation of the disease. The only serological test routinely used is the determination of the presence of rheumatoid factors (RF) in the serum. RF are antibodies directed to the constant region of immunoglobulins of the IgG class. However, these antibodies are also present in relatively high percentages in other autoimmune diseases, infections and in up to 15% of healthy individuals.

Antibodies of a more specific nature have also been found in sera of RA patients (see (1) for an overview). Anti-perinuclear factor (APF) antibodies are reported to be present in around 50% of RA patients with a specificity of over 70% (2). A number of cyclic synthetic peptides not related to filaggrin or other known proteins were described which are specifically recognized by autoantibodies in sera from RA patients (3). These peptides were subsequently used in an EIA for the detection of RA-specific autoantibodies (3). Clinical evaluation studies showed that the EIA was positive in a significant number of well-defined RA patient sera with an excellent specificity against disease controls (3-8). A diagnostic and prognostic value for the measurement of the anti Cyclic Citrullinated Peptides (anti-CCP) antibodies was found in relation to joint involvement and radiological damage in early RA (7, 9-14). Anti-CCP antibodies can be detected years before the development of clinical symptoms (14). A prospective cohort study showed that 93% of the anti-CCP positive patients with undifferentiated arthritis finally developed rheumatoid arthritis, demonstrating the strong positive predictive value of these antibodies (14). The Immunoscan CCPlus® assay offered by Svar Life Science is based on highly purified synthetic peptides containing citrulline residues and is a valuable addition to the diagnosis of RA. This anti-CCP kit contains improved synthetic peptides selected on the basis of superior performance in the detection of RA autoantibodies (8-14).

## **PRINCIPLE OF THE RA PEPTIDE EIA**

The anti-CCP antibody kit is based on an ELISA method. The test utilizes microtitre plate wells coated with citrullinated synthetic peptides (antigen). Diluted patient serum is applied to the wells and incubated. If specific antibodies are present, they will bind to the antigen in the wells. Unbound material is washed away and any bound antibody is detected by adding horse radish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgG, followed by a second washing step and an incubation with substrate.

The presence of reacting antibodies will result in the development of colour, which is proportional to the quantity of bound antibody, and this is determined photometrically.

## PRECAUTIONS

1. The stop solution contains 0.5 M sulphuric acid. Do not allow the reagent to get into contact with the skin.
2. Avoid contact of all biological materials with skin and mucous membranes.
3. Do not pipette by mouth.
4. Controls and calibrators contain plasma of human origin. Although tested against and confirmed negative for HIV 1+2, HCV, HbsAg and HIV-1 Ag, this material must be treated as potentially infectious. - The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommended that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
5. TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin) is toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed. Observe care when handling the substrate.
6. The Conjugate Solution contains 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) It may cause an allergic skin reaction.
7. Do not use components past the expiration date and do not intermix components from different lots.
8. Each well is ultimately used as an optical cuvette. Therefore, do not touch the under-surface of the wells and prevent damage and dirt.
9. Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy.
10. Calibrators, controls and diluent buffer contain 0.09% sodium azide. It has been reported that sodium azide may react with lead and copper in plumbing to form explosive compounds. When disposing, flush drains with water to minimize build-up of metal azide compounds.
11. For in vitro diagnostic use.

Material safety data sheets for all components contained in this kit are available on request from Svar Life Science.

### Conjugate Solution:



#### WARNING

Contains: Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 May cause an allergic skin reaction

P261 Avoid breathing spray.

P280 Wear protective gloves.

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

## KIT CONTENTS

Contents EIA-kit:

- 1 Sealed (96 wells) CCP peptide-coated microtitre plate. Ready to use.
- 5 Vials containing calibrators (positive human plasma pool) (1.2 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing reference control human plasma (1.2 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing positive control human plasma (1.2 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing negative control human plasma (1.2 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing conjugate solution (peroxidase conjugated to anti human IgG antibodies) (15 mL) Ready to use (red).
- 1 Vial containing substrate solution TMB (15 mL). Ready to use.
- 2 Vials containing dilution buffer (35 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing stop solution (15 mL). Ready to use.
- 2 Vials containing wash buffer (35 mL) 20 x concentrated.

## MATERIALS OR EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader with filter 450 nm.
- Automatic microtitre plate washer.

## HANDLING AND STORAGE

- Store the kit at + 2° C to + 8° C in a dark place.
- Do not use reagents beyond their expiration date.
- It is advisable to unpack the sealed microtitre plate immediately before use.
- Any direct action of light on the chromogen solution should be avoided.

If a weak or absent colour reaction of the first calibrator A (3200 U/mL) E450 nm <0.9, is observed, the test result is invalid.

## SAMPLE PREPARATION

This test is performed on serum specimens. For serum samples collect venous blood specimens and allow clotting to completion. Store samples for a maximum of 48 hrs at 4-8° C. For prolonged storage freeze at -20° C. Dilute patient sample 1:50. (Mix 10 µL sample in a tube with 490 µL dilution buffer. Use 100 µL in the test. (See assay protocol).

## PREPARATION AND HANDLING OF REAGENTS

Before beginning the test, the microtitre plate and reagents should be brought to room temperature. Do not open the plate sealing until the plate has reached room temperature. Mix reagents thoroughly before use.

The reagents included in the kit are sufficient to carry out 96 analyses (including Calibrator and control analyses).

Calibrators and controls are analysed in duplicate.

Buffer concentrates may contain salt crystals, which should be dissolved at room temperature (18-25° C).

1. Store all reagents immediately after use in the dark at 2-8° C.
2. CCP peptide-coated microtitre plate. Ready to use.  
Re-seal surplus wells in foil with desiccant and store at 2-8° C.
3. Wash buffer (35 mL). The wash buffer is delivered 20 times concentrated. Prepare dilutions before use. Add 35 mL wash buffer to 665 mL distilled water and mix thoroughly.
4. Substrate solution TMB (15 mL). Ready to use reagent. Keep in the dark.
5. Dilution buffer (35 mL). Ready to use.
6. Conjugate solution (15 mL). Ready to use.
7. Stop solution (15 mL). Ready to use.
8. Calibrator A-E (1.2 mL). Five diluted positive human plasma calibrators, with values expressed in relative units.  
Calibrator A contains 3200 U/mL, B 800 U/mL, C 200 U/mL, D 50 U/mL and E 25 U/mL. Calibrators are ready to use.
9. Reference control (1.2 mL). Diluted human plasma, 25 U/mL, ready to use.
10. Negative control (1.2 mL). Diluted human plasma, ready to use.
11. Positive control ( 1.2 mL). Diluted human plasma, ready to use.

## ASSAY PROCEDURE

### Rinsing protocol

In EIA's unbound components have to be removed efficiently between each immunological incubation step. This is achieved by appropriate rinsing. It should be clear that each rinsing procedure must be carried out with care to guarantee good results. Rinsing can be carried out manually or with automatic plate washing equipment as follows:

#### Manual rinsing

1. Empty the contents of each well by turning the microtitre plate upside down followed by a firm short vertical movement.
2. Fill all the wells with 300 µL wash buffer.
3. This rinsing cycle (1 and 2) should be carried out 3 times.
4. Turn the plate upside down and empty the wells by a firm short vertical movement.
5. Place the inverted plate on absorbent paper towels and tap the plate firmly to remove residual washing solution in the wells.
6. Continue immediately to next reagent addition step.

#### Rinsing with automatic microtitre plate washing equipment

When using automatic plate washing equipment, check that all wells can be aspirated completely and that the wash buffer is correctly dispensed reaching the rim of each well during each rinsing cycle. The washer should be programmed to execute three rinsing cycles. Continue immediately to next reagent addition step.

#### Assay Protocol

Prepare samples according to section sample preparation, (i.e. dilute 1:50 in dilution buffer) and reagents according to preparation and handling of reagents. The microtitre plate is ready to use, do not wash! Patient samples can be tested either singular or in duplicate.

#### Semi-Quantitative protocol

1. Pipette 100 µL dilution buffer in duplicate (wells A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: blank).
2. Pipette 100 µL of each calibrator in duplicate (wells B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).

3. Pipette 100  $\mu$ L of negative and positive control in duplicate (wells G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>).
4. Pipette 100  $\mu$ L of diluted patient samples into their respective wells of the microtitre plate. The total time for pipetting in steps 1-4 should not exceed 15 minutes.
5. Incubate for 60 min.  $\pm$  5 min. at room temperature (18-25° C).
6. Discard the solution from the microtitre plate and wash according to the rinsing protocol.
7. Pipette 100  $\mu$ L conjugate solution into each well.
8. Incubate for 30 min.  $\pm$  5 min. at room temperature (18-25° C).
9. Discard the conjugate solution from the microtitre plate and wash according to the rinsing protocol.
10. Pipette 100  $\mu$ L substrate solution into each well.
11. Incubate for 30 min.  $\pm$  5 min. at room temperature (18-25° C).
12. Add 100  $\mu$ L stop solution to each well.
13. Read absorbance values within 10 min. at 450 nm.

### Qualitative protocol

Run as described in the semi-quantitative protocol with one exception: Replace the calibrator set (A-E) with the reference control.

## QUALITY CONTROL

For the semi-quantitative protocol calibrator A (3200 U/mL) should have an OD of  $\geq 0.9$ .

Calculate the mean of duplicate wells for each calibrator and control. The value of the controls should then be calculated as in interpretation of results, see below.

Please refer to positive control label for valid positive control range. Negative control should be  $< 25$  U/mL.

For the qualitative protocol, please refer to positive control label for valid ratio of positive control versus reference control. The ratio of negative control versus reference control should be  $< 0.95$ .

If any of the values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and it should be repeated.

## INTERPRETATION OF RESULTS

### Semi-Quantitative protocol

Subtract the mean absorbance value of the wells A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> from the individual absorbance of the wells containing the calibrators, controls and samples. The absorbance values of the five calibrators (mean values of the duplicates) can be plotted manually on the linear y-axis versus the units on a logarithmic x-axis. The calibration curve is close to linearity in the range 25-2962 U/mL. The antibody titre is expressed in units determined using the calibrator sera by reading the unit's value corresponding to the net mean absorbance of sample on the calibration curve. Alternatively, a software program using a 4-parameter curve fit can be used for the calculation.

The five calibrators (A - E) have been assigned a value of 3200 U/mL (A), 800 U/mL (B), 200 U/mL (C), 50 U/mL (D) and 25 U/mL (E). These values have been chosen arbitrarily by Svar Life Science, since no generally recognised (inter)national standard exists for expressing the titre of anti-CCP antibodies. Samples reading higher than the calibrator A (3200 U/mL) can be retested at higher sample dilution. At present there is no evidence that

the units obtained, can be used as a measure of the severity of the disease. Antibodies from different patients may have different affinities, which means that the autoantibody immunoreactivity rather than the concentration is measured.

The calibration curve cannot be used for absorbance values below calibrator E (25 U/mL). Values should be reported as <25 U/mL.

**Qualitative protocol**

Subtract the mean absorbance value of the wells A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> from the individual absorbance of the wells containing the controls and samples.

Calculate the absorbance (optical density) ratio for the control and for each sample.

$$\text{Absorbance ratio} = \frac{\text{Control or Sample OD}}{\text{Reference control OD}}$$

**EVALUATION CRITERIA**

**Semi-Quantitative protocol**

Samples with results < 25 U/mL are defined as negative. Samples ≥25 U/mL are defined as positive.

**Qualitative protocol**

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 Svar Life Science clinical trial suggest the following cut-off:

**Absorbance ratio**

- < 0.95
- ≥ 0.95 to ≤ 1.0
- > 1.0

**Result Interpretation**

- Negative
- Borderline - recommend repeat testing
- Positive

**Limitations**

1. A positive result must be used in conjunction with clinical evaluation and other diagnostic procedures. The values obtained from this assay are intended to be an aid to diagnosis only. Each physician must interpret the results in conjunction with the patient's history, physical findings and other diagnostic procedures.
2. Elevated anti-CCP antibodies may be seen in individuals with no evidence of clinical disease. Also, some individuals with RA may have undetectable antibodies. Anti-CCP antibody levels do not necessarily correlate to disease state.
3. Because anti-CCP antibody levels do not necessarily correlate to disease state treatment should not be initiated or changed based on a positive result. Clinical findings should be taken into account for all treatment decisions.
4. Monitoring CCP antibody levels for progression and or remission of RA has not been established.
5. The performance characteristics for this assay have not been established for paediatric specimens. The diagnostic value of anti-CCP antibodies has not been determined for juvenile arthritis.

**Expected Results**

The anti-CCP EIA measures antibodies against synthetic peptides with citrulline residues. The anti-CCP EIA is calibrated in the semi-quantitative assay in relative units using a positive patient plasma pool. The standard curve ranges from 25-3200 U/mL. These values have been chosen arbitrarily by Svar Life Science since no generally recognised international standard exists for expressing the titre of anti-CCP antibodies. The specificity and sensitivity were evaluated in previous studies with 311 RA patients, 942 diseased non-RA patients (including other autoimmune and wide range of infectious diseases) and 330 healthy controls. The sensitivity was 70%. The specificity was 97% with diseased non-RA patients and 99% with healthy individuals. (15)

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Table 1. Percent Agreement of the Immunoscan CCPlus® kit compared to an alternative CCP ELISA.** A total of 628 frozen retrospective sera were assayed. 368 samples were from RA patients and 260 samples were from apparently healthy blood donors. The following table summarises the results.

Alternative ELISA				
Immunoscan CCPlus® Kit		Positive	Negative	Total
	Positive	275	5	280
	Negative	2	346	348
	Total	277	351	628

Positive Percent Agreement:  $275/277 = 99.3\%$       95% CI = 97.4 – 99.9%  
 Negative Percent Agreement:  $346/351 = 98.6\%$       95% CI = 96.7 – 99.5%  
 Overall Percent Agreement:  $621/628 = 98.9\%$       95% CI = 97.7 – 99.6%

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

**Table 2. Clinical sensitivity and specificity.** A total of 1180 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Control and Disease groups	Total number	Negative < 25 U/mL	Positive ≥ 25 U/mL
Blood donors	260	257	3
RA	399	90	309
WG	20	18	2
MP	20	20	0
SLE	66	64	2
Sjögren's syndrome	13	13	0
IBD	98	95	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyroiditis	20	20	0
Epstein Barr Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0



<b>Mycoplasma</b>	9	9	0
<b>Toxoplasma</b>	6	6	0
<b>Tuberculosis</b>	5	5	0
<b>Yersinia</b>	8	8	0
<b>Salmonella</b>	3	3	0
<b>Chlamydia</b>	5	4	1
<b>Malaria</b>	4	4	0
<b>Borrelia</b>	9	9	0
<b>Syphilis</b>	5	5	0
<b>Infectious endocarditis</b>	3	3	0
<b>Legionella</b>	4	4	0
<b>AST</b>	3	3	0
<b>Schistosomiasis</b>	4	4	0
<b>Rubella</b>	5	5	0
<b>Chaga's syndrome</b>	3	3	0
<b>Scleroderma</b>	17	16	1
<b>Multiple Sclerosis</b>	20	20	0
<b>IDDM</b>	20	20	0
<b>PM/DM</b>	20	20	0
<b>MCTD</b>	20	19	1
<b>Routine samples</b>	80	78	2

- RA = rheumatoid arthritis
- WG = Wegener's granulomatosis
- MP = microscopic polyangiitis
- SLE = systemic lupus erythematosus
- PM/DM = Polymyositis/Dermatomyositis
- IBD = inflammatory bowel disease
- AST = anti-Streptolysine test
- IDDM = insulin dependent diabetes mellitus
- MCTD = mixed connective tissue disease

**Clinical sensitivity**

RA = 309/399 = 77.4 %                      95% CI = 73.3 - 81.5%

**Clinical specificity**

Blood donors	= 257/260 = 98.8%	95% CI = 96.7 - 99.8%
WG	= 18/20 = 90.0%	95% CI = 68.3 - 98.8%
MP	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
SLE	= 64/66 = 97.0 %	95% CI = 89.5 - 99.6%
Sjogren's	= 13/13 = 100 %	95% CI = 75.3 - 100%
IBD	= 95/98 = 96.9%	95% CI = 91.3 - 99.4%
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	95% CI = 83.9 - 100%
Thyroiditis	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
Infectious Disease	= 85/86 = 98.8%	95% CI = 93.7 - 100%
Scleroderma	= 16/17 = 94.1%	95% CI = 71.3 - 99.8%
Multiple Sclerosis	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
IDDM	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
MCTD	= 19/20 = 95.0%	95% CI = 75.1 - 99.9%
Routine samples	= 78/80 = 97.5 %	95% CI = 91.3 - 99.7 %

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

**Table 3. Intra-assay precision** was determined by testing six different samples eight times each.

	High		High		High	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean.	2672	1.421	2685	1.432	1150	1.664
S.D.	138	0.01	205	0.01	55.3	0.02
% C.V.	5.2	0.4	7.6	0.4	4.8	0.9
	Medium		Low		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean	239	1.014	56	0.421	28	0.232
S.D.	2.3	0.01	2.1	0.01	0.5	0.01
%C.V.	1.0	0.4	3.8	2.8	3.6	1.3

**Table 4. Inter-assay precision** was determined by testing six different samples eight times each. Results were obtained for three different runs.

	High		High		High	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean.	2696	1.426	2600	1.422	1168	1.706
S.D.	328	0.01	299	0.01	101.7	0.07
% C.V.	12.2	0.7	11.5	0.8	8.7	3.8
	Medium		Low		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean	242	1.031	59	0.428	28	0.232
S.D.	5.0	0.03	3.1	0.02	0.5	0.01
%C.V.	2.1	2.5	5.2	3.8	1.8	0.9

**Table 5. Lot to lot variation** was determined by testing six different samples eight times each. Results were obtained for three different lots.

	High		High		High	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean.	2896	1.408	2870	1.408	1530	1.807
S.D.	405	0.02	335	0.02	260.4	0.03
% C.V.	14.0	1.4	11.7	1.5	17.0	1.6
	Medium		Low		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean	259	1.100	60	0.462	62	0.471
S.D.	21.8	0.04	4.2	0.02	6.6	0.04
%C.V.	8.4	3.9	6.9	4.4	10.8	8.2

**Table 6. Dilution recovery** was determined by testing five serial dilutions for three different samples.

Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution Corrected % Recovery
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution Corrected % Recovery
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution Corrected % Recovery
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Two additional samples were diluted 1/50-1/1600 in the linear range. The mean concentrations were 164-6.0 U/mL and 321-11 U/mL respectively, with a dilution corrected recovery between 98-105%.

#### Detection Limit

The detection limit of the assay was determined by running the zero standard 14 times on three different lots. The detection limit of 1.6 U/mL was calculated by finding the mean plus two standard deviations.

#### Interference Study

Three low positive samples were spiked with bilirubin at 0.2 mg/mL, haemoglobin at 400 mg/dl, lipid at 15 mg/mL and rheumatoid factor at 200 IU/mL. The data indicates that the assayed concentrations do not interfere with the anti-CCP results.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER /. LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot number. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Ag</b>	Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antigeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).
<b>DIL</b>	Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>20X</b>	Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> <b>0.5M</b>	Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).
<b>CONJ</b>	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.
<b>CAL</b>	Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.

<table border="1"> <tr> <td data-bbox="201 248 395 286"><b>CONTROL</b></td> <td data-bbox="395 248 491 286"><b>+</b></td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>+</b>	<p>Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.</p>
<b>CONTROL</b>	<b>+</b>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="201 394 395 432"><b>CONTROL</b></td> <td data-bbox="395 394 491 432"><b>-</b></td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>-</b>	<p>Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.</p>
<b>CONTROL</b>	<b>-</b>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="201 546 395 584"><b>CONTROL</b></td> <td data-bbox="395 546 491 584"><b>REF</b></td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>REF</b>	<p>Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.</p>
<b>CONTROL</b>	<b>REF</b>		



## **IMMUNOSCAN CCPlus®**

Usage réservé aux professionnels

### **UTILISATION**

Le kit d'analyse Immunoscan CCPlus® est un dosage d'immunoabsorption enzymatique (ELISA) servant à la détermination qualitative et semi-quantitative des anticorps IgG anti-CCP (peptides cycliques citrullinés) (CCP) dans le sérum humain.

Le dosage est utilisé pour détecter les anticorps dans un échantillon unique de sérum. Les résultats du dosage, utilisés conjointement avec d'autres données biologiques et cliniques, représentent une aide au diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR). L'analyse ne doit être réalisée que par du personnel de laboratoire qualifié. « Pour le diagnostic in vitro uniquement ».

### **RÉSUMÉ ET EXPLICATION**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est l'une des maladies auto-immunes systémiques les plus répandues dans le monde.

Néanmoins, l'étiologie de cette maladie, qui touche 1 à 2% de la population mondiale, demeure inconnue. Le diagnostic de la PR repose essentiellement sur les manifestations cliniques de la maladie. Le seul dosage sérologique de routine est actuellement la recherche de facteurs rhumatoïdes (FR) dans le sérum. Les facteurs rhumatoïdes sont des anticorps dirigés contre la région constante des immunoglobulines de la sous-classe des IgG.

Toutefois, ces anticorps sont présents, dans un pourcentage élevé, chez les individus souffrant de maladies auto-immunes, de maladies infectieuses et même chez environ 15% de la population normale.

Des anticorps plus spécifiques ont été observés dans le sérum de patients atteints de PR (cf. (1) qui offrent une synthèse générale) ; ainsi, des anticorps anti-facteur périnucléaire sont présents chez environ 50% de patients atteints de PR, avec une spécificité de plus de 70% (2). Récemment, un certain nombre de peptides cycliques synthétiques non relatifs à la filagrine ou à d'autres protéines connues ont été spécifiquement reconnus par les auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints de PR (3). Ces peptides ont alors été utilisés dans une méthode EIA pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la PR (3). Des évaluations cliniques ont montré que cette technique EIA donnait des résultats positifs chez un nombre significatif de patients atteints de PR bien définie, avec une excellente spécificité par rapport à des contrôles pour d'autres pathologies (3-8). Une valeur diagnostique et pronostique a été établie entre, d'une part, la mesure des anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) et, d'autre part, l'état des articulations et l'altération radiologique des patients en stade précoce de PR (7, 9-14). Les anticorps anti-CCP peuvent être détectés des années avant l'apparition des signes cliniques de la maladie (14). Une étude prospective sur une cohorte de patients souffrant d'arthrite indifférenciée a montré que 93% des patients positifs en anti-CCP avaient finalement développé une PR, ce qui démontre la très forte valeur prédictive positive de ces anticorps (14). La méthode Immunoscan CCPlus® proposée par Svar Life Science se base sur l'utilisation de peptides synthétiques hautement purifiés contenant des résidus de citrulline. Elle constitue une aide significative au diagnostic de la PR. La trousse anti-CCP est composée d'une sélection de peptides synthétiques améliorés, choisis pour la qualité de leurs performances dans la détection des auto-anticorps de la PR (8-14).

## PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse de dosage des anticorps anti-CCP utilise une méthode ELISA. Elle comprend une plaque de micropuits revêtus de peptides synthétiques citrullinés (antigène). Le sérum dilué du patient est distribué dans les puits et mis à incuber. Si des anticorps spécifiques sont présents, ils se lient à l'antigène des puits. Tout ce qui n'est pas lié aux parois des puits est éliminé par lavage. Tout anticorps lié est détecté par addition d'un anticorps anti-IgG humaine marqué à la peroxydase de raifort, suivie d'une seconde étape de lavage et d'une incubation avec le substrat.

La présence d'anticorps ayant réagi va provoquer le développement d'une réaction colorée d'intensité proportionnelle à la quantité d'anticorps liés. Cette intensité est lue sur un spectrophotomètre.

## PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

1. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 0,5 M. Éviter le contact avec la peau.
2. Éviter le contact des produits d'origine biologique avec la peau et les muqueuses.
3. Ne pas pipeter avec la bouche.
4. Les contrôles et étalons contiennent du plasma d'origine humaine. Ils ont été testés et confirmés négatifs pour les anticorps anti-VIH 1+2, anti-VHC, pour l'AgHbs et pour l'AgVIH-1, mais ils doivent être traités comme potentiellement infectieux. Les Centre de prévention et de contrôle de maladies (CDC) et l'Institut national de santé (NIH) recommandent de traiter les agents potentiellement infectieux avec précaution, conformément au niveau de biosécurité 2.
5. Le TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) est toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Manipuler ce substrat avec précaution.
6. La solution de conjugué contient de la 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) Il peut provoquer une réaction allergique cutanée.
7. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption et ne pas mélanger les composants de lots différents.
8. Les puits servent de cuvette optique pour la lecture finale. De ce fait, ne pas toucher le fond des puits, ne pas les endommager ou les salir.
9. Respecter le protocole pour obtenir des résultats optimaux. Les étapes de pipetage et de lavage sont primordiales pour la précision et la justesse des résultats.
10. Les étalons, les contrôles et le tampon de dilution contiennent 0,09% d'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des tuyauteries pour former des composés explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, bien rincer les canalisations avec de l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azide métallique.
11. Pour le diagnostic in vitro uniquement.

On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants inclus dans le coffret sur demande auprès d'Svar Life Science.

**Conjugué:****ATTENTION**

Contient: Masse de réaction de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

P261 Éviter de respirer les aérosols.

P280 Portez des gants de protection.

P333 + P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée, consulter un médecin.

**COMPOSITION DE LA TROUSSE**

La trousse comprend :

- 1 plaque de micropuits revêtus de peptides CCP (96 puits) dans un sachet scellé. Prête à l'emploi.
- 5 flacons d'étalons (pool du plasma humaines positifs) (1,2 ml). Prêts à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon du plasma humaine de contrôle de référence (1,2 ml). Prêt à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon du plasma humaine de contrôle positif (1,2 ml). Prêt à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon du plasma humaine de contrôle négatif (1,2 ml). Prêt à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon de conjugué (anticorps anti-IgG humaines conjugués à la peroxydase de raifort) (15 ml). Prêt à l'emploi (couleur rouge).
- 1 flacon de substrat TMB (15 ml). Prêt à l'emploi.
- 2 flacons de tampon de dilution (35 ml). Prêt à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon de solution d'arrêt (15 ml). Prête à l'emploi.
- 2 flacons de tampon de lavage (35 ml), concentré x20.

**MATÉRIEL OU ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI**

- Lecteur de microplaques avec filtre de 450 nm.
- Laveur automatique de plaques de microtitrage.

**MANIPULATION ET CONSERVATION**

- Conserver la trousse entre 2 et 8° C, à l'abri de la lumière.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Il est recommandé de sortir la plaque du sachet scellé juste avant utilisation.
- Ne pas exposer la solution chromogène à la lumière.

En cas d'absence de coloration ou de faible réaction colorée avec le premier étalon A (3200 U/ml) (E450 nm < 0,9), les résultats du test sont non valides.

## PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Ce dosage peut utiliser des échantillons de sérum. Pour les échantillons de sérum, prélever du sang veineux et laisser complètement coaguler avant de centrifuger pour collecter le sérum. Conserver les échantillons au maximum 48 heures entre 4 et 8° C. Conserver à -20° C pour des périodes plus longues. Diluer le sérum de patient au 1/50 (10 µl de sérum dans un tube propre avec 490 µl de tampon de dilution). Vous aurez besoin d'utiliser 100 µl pour le dosage. (Voir Protocole de dosage).

## PRÉPARATION ET MANIPULATION DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être amenés à température ambiante et bien homogénéisés avant de commencer le dosage. Ne pas ouvrir le sachet contenant la microplaque avant qu'elle ne soit à température ambiante.

Bien homogénéiser les réactifs avant de les utiliser.

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de réaliser 96 dosages (y compris les étalons et les contrôles).

Les étalons et les contrôles doivent être dosés en double.

Le tampon concentré peut contenir des cristaux de sel, qui se dissolvent à température ambiante (18-25° C).

1. Conserver les réactifs après usage entre 2 et 8° C et à l'abri de la lumière.
2. Microplaque revêtue de peptides CCP. Prête à l'emploi.  
Remettre les puits non utilisées dans la pochette métallique avec le déshydratant, fermer hermétiquement et conserver entre 2 et 8° C.
3. Tampon de lavage (35 ml). La solution de lavage est fournie sous forme concentrée 20 fois. Diluer avant utilisation. Ajouter 35 ml de tampon de lavage à 665 ml d'eau distillée, puis bien mélanger.
4. Solution substrat de TMB (15 ml). Réactif prêt à l'emploi. À conserver à l'abri de la lumière.
5. Tampon de dilution (35 ml). Prêt à l'emploi.
6. Solution de conjugué (15 ml). Prête à l'emploi.
7. Solution d'arrêt (15 ml). Prête à l'emploi.
8. Étalons A-E (1,2 ml). Cinq étalons composés de plasma humain positif, valeur exprimée en unités arbitraires.  
L'étalon A contient 3200 U/ml, l'étalon B 800 U/ml, l'étalon C 200 U/ml, l'étalon D 50 U/ml et l'étalon E 25 U/ml. Les étalons sont prêts à l'emploi.
9. Contrôle de référence (1,2 ml). Plasma humain dilué, 25 U/ml, prêt à l'emploi.
10. Contrôle négatif (1,2 ml). Plasma humain dilué, prêt à l'emploi.
11. Témoin positif (1,2 ml). Plasma humain dilué, prêt à l'emploi.

## PROTOCOLE DE DOSAGE

### Protocole de lavage

Les composants non liés par EIA doivent être bien éliminés entre chaque étape d'incubation immunologique. Il faut pour cela laver convenablement. Chaque étape de lavage doit être réalisée avec rigueur afin de garantir la qualité des résultats. Le lavage peut être effectué manuellement ou bien avec un laveur automatique de la manière suivante :

#### Lavage manuel

1. Vider le contenu de chaque puits en retournant la microplaque à l'envers et en la secouant d'un bref mouvement vertical.
2. Remplir tous les puits avec 300 µl de tampon de lavage.
3. Ce cycle de lavage (1 et 2) doit être effectué 3 fois.
4. Retourner la plaque à l'envers et vider les puits d'un bref mouvement vertical.
5. Déposer la plaque retournée sur du papier absorbant et tapoter fermement la plaque afin d'éliminer le reste de solution de lavage.
6. Réaliser immédiatement l'étape de distribution du réactif suivant.

#### Lavage à l'aide d'un automate de lavage

Si vous utilisez un laveur automatique, vérifier que le contenu de tous les puits est aspiré correctement et que le tampon de lavage est bien distribué jusqu'au bord supérieur de chaque puits lors de chaque cycle de lavage. Le laveur doit être programmé pour effectuer 3 cycles de lavage. Réaliser immédiatement l'étape de distribution du réactif suivant.

### Protocole de dosage

Préparer les échantillons selon le paragraphe Préparation des échantillons (c.-à-d. en diluant au 1/50 avec le tampon de dilution) et les réactifs selon le paragraphe Préparation et manipulation des réactifs. La microplaque est fournie prête à l'emploi, ne pas la laver ! Les échantillons de patients peuvent être dosés en simple ou en double.

#### Protocole semi-quantitatif

1. Pipeter 100 µl de tampon de dilution en double (puits A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> : blanc).
2. Pipeter 100 µl de chaque étalon en double (puits B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).
3. Pipeter 100 µl de contrôle négatif et positif en double (puits G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> – H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>).
4. Pipeter 100 µl d'échantillon patient prédilué dans les puits correspondants de la microplaque. La durée totale du pipetage des étapes 1 à 4 ne doit pas dépasser 15 minutes.
5. Incuber pendant 60 min. ± 5 min. à température ambiante (18-25° C).
6. Jeter la solution de la microplaque et laver conformément au protocole de lavage.
7. Pipeter 100 µl de conjugué dans chaque puits.
8. Incuber pendant 30 min. ± 5 min. à température ambiante (18-25° C).
9. Jeter la solution de conjugué de la microplaque et laver conformément au protocole de lavage.
10. Pipeter 100 µl de substrat dans chaque puits.
11. Incuber pendant 30 min. ± 5 min. à température ambiante (18-25° C).
12. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
13. Lire l'absorbance à 450 nm dans les 10 minutes suivantes.

#### Protocole qualitatif

Pratiquer comme pour le dosage semi-quantitatif, mais en remplaçant les étalons (A-E) par le contrôle de référence.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Pour le protocole semi-quantitatif, l'étalon A (3200 unités/ml) doit avoir une DO  $\geq 0,9$ . Calculer la moyenne des puits en double pour chaque étalon et contrôle. La valeur des étalons et contrôles est ensuite calculée comme indiqué au paragraphe suivant Interprétation des résultats.

Veillez consulter l'étiquette du contrôle positif pour connaître la plage valide du contrôle positif. Le contrôle négatif doit être  $< 25$  U/ml.

Pour le protocole qualitatif, veuillez consulter l'étiquette du contrôle positif pour connaître le rapport valide du contrôle positif versus le contrôle de référence.

Le rapport du contrôle négatif versus le contrôle de référence doit être  $< 0,95$ .

Si l'une des valeurs n'est pas dans sa plage respective, le test doit être considéré comme invalide et doit être répété.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### Protocole semi-quantitatif

Soustraire la valeur moyenne d'absorbance des puits  $A_1$  et  $A_2$  des absorbances de chaque puits contenant les étalons, les contrôles et les échantillons. L'absorbance des cinq étalons (valeur moyenne des doublets) permet de tracer manuellement une courbe représentant l'absorbance (axe linéaire en ordonnée) en fonction de la concentration (axe logarithmique en abscisse). La courbe d'étalonnage est linéaire entre 25 et 2962 U/ml. La concentration en anticorps est exprimée en unités arbitraires qu'il est possible de déterminer en lisant la concentration correspondant à l'absorbance moyenne nette de l'échantillon sur la droite d'étalonnage. Il est également possible d'utiliser pour le calcul de la courbe un programme d'ajustement de la courbe à 4 paramètres.

Les cinq étalons (A - E) ont une valeur assignée de 3200 U/ml (A), de 800 U/ml (B), de 200 U/ml (C), de 50 U/ml (D) et de 25 U/ml (E). Ces valeurs ont été arbitrairement choisies par Svar Life Science, dans la mesure où il n'existe pas d'étalon (inter)national reconnu pour exprimer les titres d'anticorps anti-CCP. Les échantillons donnant des résultats supérieurs à l'étalon A (3200 U/ml) peuvent être redosés après dilution à un taux plus élevé. À l'heure actuelle, il est impossible de corréliser le résultat obtenu avec la sévérité de la maladie. Les anticorps de différents patients peuvent présenter des affinités différentes, ce qui signifie que c'est davantage l'immunoréactivité de l'anticorps plutôt que sa concentration qui est mesurée.

La courbe d'étalonnage ne doit pas être exploitée pour des absorbances en dessous de celle de l'étalon E (25 U/ml). Les résultats doivent être relevés comme  $< 25$  U/ml.

### Protocole qualitatif

Soustraire la valeur moyenne d'absorbance des puits  $A_1$  et  $A_2$  des absorbances de chaque puits contenant les contrôles et les échantillons.

Calculer le ratio d'absorbance (densité optique) des contrôles et des échantillons de patients par rapport au contrôle de référence.

$$\text{Ratio d'absorbance} = \frac{\text{DO du contrôle } \mathbf{ou} \text{ de l'échantillon}}{\text{DO du contrôle de référence}}$$

## CRITÈRES D'ÉVALUATION

### Protocole semi-quantitatif

Les échantillons ayant un résultat inférieur à 25 U/ml sont considérés comme négatifs. Ceux ayant un résultat supérieur ou égal à 25 U/ml sont considérés comme positifs.

### Protocole qualitatif

Il appartient à chaque laboratoire de déterminer la valeur seuil entre les échantillons négatifs et positifs, spécifique de la population concernée. Les résultats obtenus par Svar Life Science sur une population de patients lors de l'évaluation clinique suggèrent de prendre la valeur seuil suivante :

#### Ratio d'absorbance

< 0,95  
 ≥ 0,95 et ≤ 1,0  
 > 1,0

#### Interprétation

Négatif  
 Limite – à redoser  
 Positif

### Limites

1. Tout résultat positif doit être utilisé conjointement avec une évaluation clinique et d'autres procédures de diagnostic. Les valeurs obtenues avec ce dosage ne sont destinées à n'être qu'une aide au diagnostic. Il appartient à chaque médecin d'interpréter les résultats en fonction des antécédents du patient, de son examen clinique et d'autres procédures de diagnostic.
2. Une concentration élevée en anticorps anti-CCP a été trouvée chez des individus ne présentant aucun signe clinique de maladie. En outre, certains patients atteints de PR peuvent avoir une concentration en anticorps non décelable. Il n'existe pas nécessairement une corrélation directe entre la concentration en anticorps anti-CCP et le stade de la maladie.
3. Étant donné qu'il n'existe pas nécessairement une corrélation directe entre la concentration en anticorps anti-CCP et le stade de la maladie, le traitement ne doit être ni initié ni modifié sur la seule base d'un résultat positif. Les examens cliniques doivent être pris en compte pour toute décision de traitement.
4. Il n'a pas été établi que la surveillance de la variation de la concentration en anticorps anti-CCP serve à contrôler la progression ou la rémission de la PR.
5. Les performances du dosage n'ont pas été établies pour des échantillons d'enfants. Il n'a pas été démontré que les anticorps anti-CCP aient une valeur diagnostique pour l'arthrite juvénile.

### Résultats attendus

La méthode EIA anti-CCP mesure la quantité d'anticorps dirigés contre des peptides synthétiques contenant des résidus de citrulline (anti-CCP). Elle est étalonnée à l'aide d'un pool de plasma positifs de patients pour le dosage semi-quantitatif. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. La plage de la courbe d'étalonnage va de 25 à 3200 U/ml. Ces valeurs ont été choisies arbitrairement par Svar Life Science dans la mesure où il n'existe pas d'étalon international pour exprimer les titres en anticorps anti-CCP. La spécificité et la sensibilité ont été évaluées lors d'études cliniques sur 311 patients atteints de PR, 942 patients atteints de pathologies autres que la PR (dont d'autres maladies auto-immunes et diverses maladies infectieuses) et 330 sujets de contrôle sains. La sensibilité obtenue est de 70%. La spécificité est de 97% vis-à-vis de maladies autres que la PR et de 99% vis-à-vis des sujets sains (15).

### PERFORMANCES DU DOSAGE

**Tableau 1. Pourcentage de concordance entre la trousse Immunoscan CCPlus® et une méthode alternative ELISA CCP.** Au total, 628 échantillons de sérum congelé ont été dosés.

368 échantillons proviennent de patients atteints de PR ; les 260 autres échantillons sont normaux et proviennent d'un centre de transfusion. Le tableau suivant résume les résultats.

Méthode alternative ELISA				
Trousse Immunoscan CCPlus®		Positif	Négatif	Total
	Positif	275	5	280
	Négatif	2	346	348
	Total	277	351	628

Pourcentage de concordance (échantillons positifs):  $275/277 = 99.3\%$  IC à 95% = 97.4–99.9%

Pourcentage de concordance (échantillons négatifs):  $346/351 = 98.6\%$  IC à 95% = 96.7–99.5%

Pourcentage de concordance globale:  $621/628 = 98.9\%$  IC à 95% = 97.7–99.6%

L'intervalle de confiance (IC) à 95% a été calculé en utilisant la méthode exacte.



**Tableau 2. Spécificité et sensibilité cliniques.** Au total, 1180 échantillons de sérum congelé (ayant une caractérisation clinique) ont été dosés. Le tableau suivant résume les résultats.

Contrôle et groupes de maladie	Nombre total	Négatif < 25 U/ml	Positif ≥ 25 U/ml
Donneurs sains	260	257	3
PR	399	90	309
GW	20	18	2
PM	20	20	0
LED	66	64	2
Syndrome de Sjögren	13	13	0
MII	98	95	3
Arthrose	21	21	0
Thyroïdite	20	20	0
Virus d'Epstein-Barr	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	6	6	0
Tuberculosis	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonella	3	3	0
Chlamydia	5	4	1
Paludisme	4	4	0
Borrelia	9	9	0
Syphilis	5	5	0
Endocardite infectieuse	3	3	0
Legionella	4	4	0
ASLO	3	3	0
Bilharziose	4	4	0
Rubéole	5	5	0
Maladie de Chagas	3	3	0
Sclérodermie	17	16	1
Sclérose en plaques	20	20	0
DID	20	20	0
PM/DM	20	20	0
CM	20	19	1
Échantillons de routine	80	78	2

- PR = polyarthrite rhumatoïde  
 GW = granulomatose de Wegener  
 PM = polyangéite microscopique  
 LED = lupus érythémateux disséminé  
 PM/DM = polymyosite / dermatomyosite  
 MII = maladies inflammatoires intestinales  
 ASLO = test antistreptolysine  
 DID = diabète insulino-dépendant  
 CM = connectivite mixte

#### Sensibilité clinique

PR = 309/399 = 77,4%

IC à 95% = 73,3 – 81,5%

**Spécificité clinique**

Donneurs sains	= 257/260 = 98,8%	IC à 95% = 96,7 – 99,8%
GW	= 18/20 = 90,0%	IC à 95% = 68,3 – 98,8%
PM	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
LED	= 64/66 = 97,0%	IC à 95% = 89,5 – 99,6%
Syndr. de Sjögren	= 13/13 = 100%	IC à 95% = 75,3 – 100%
MII	= 95/98 = 96,9%	IC à 95% = 91,3 – 99,4%
Arthrose	= 21/21 = 100%	IC à 95% = 83,9 – 100%
Thyroïdite	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
Maladie infectieuse	= 85/86 = 98,8%	IC à 95% = 93,7 – 100%
Sclérodermie	= 16/17 = 94,1%	IC à 95% = 71,3 – 99,8%
Sclérose en plaques	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
DID	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
CM	= 19/20 = 95,0%	IC à 95% = 75,1 – 99,9%
Échant. de routine	= 78/80 = 97,5%	IC à 95% = 91,3 – 99,7%

L'intervalle de confiance (IC) à 95% a été calculé en utilisant la méthode exacte.

**Tableau3.** La **précision intra-série** a été déterminée en analysant huit fois six échantillons différents.

	Conc. élevée		Conc. élevée		Conc. élevée	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	2672	1,421	2685	1,432	1150	1,664
Écart-type	138	0,01	205	0,01	55,3	0,02
CV (%)	5,2	0,4	7,6	0,4	4,8	0,9
	Conc. moyenne		Conc. faible		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	239	1,014	56	0,421	28	0,232
Écart-type	2,3	0,01	2,1	0,01	0,5	0,01
CV (%)	1,0	0,4	3,8	2,8	3,6	1,3

**Tableau 4.** La **précision inter-séries** a été déterminée en analysant huit fois six échantillons différents. Les résultats ont été obtenus sur trois séries différentes.

	Conc. élevée		Conc. élevée		Conc. élevée	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	2696	1,426	2600	1,422	1168	1,706
Écart-type	328	0,01	299	0,01	101,7	0,07
CV (%)	12,2	0,7	11,5	0,8	8,7	3,8
	Conc. moyenne		Conc. faible		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	242	1,031	59	0,428	28	0,232
Écart-type	5,0	0,03	3,1	0,02	0,5	0,01
CV (%)	2,1	2,5	5,2	3,8	1,8	0,9

**Tableau 5.** La **variation inter-lots** a été déterminée en analysant huit fois six échantillons différents. Les résultats ont été obtenus sur trois lots différents.

	<b>Conc. élevée</b>		<b>Conc. élevée</b>		<b>Conc. élevée</b>	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	2896	1,408	2870	1,408	1530	1,807
Écart-type	405	0,02	335	0,02	260,4	0,03
CV (%)	14,0	1,4	11,7	1,5	17,0	1,6
	<b>Conc. moyenne</b>		<b>Conc. faible</b>		<b>Conc. faible</b>	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	259	1,100	60	0,462	62	0,471
Écart-type	21,8	0,04	4,2	0,02	6,6	0,04
CV (%)	8,4	3,9	6,9	4,4	10,8	8,2

**Tableau 6.** Le taux de **récupération de la dilution** a été déterminé en analysant cinq dilutions sérielles de trois échantillons différents.

Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/ml)	Concentration calculée (U/ml)	Taux de récupération (%)
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/ml)	Concentration calculée (U/ml)	Taux de récupération (%)
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/ml)	Concentration calculée (U/ml)	Taux de récupération (%)
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Deux échantillons supplémentaires ont été dilués à raison de 1/50-1/1600 dans la plage linéaire. Les concentrations moyennes étaient respectivement de 164-6,0 U/ml et de 321-11 U/ml, avec un rendement corrigé par rapport à la dilution compris entre 98 et 105%.

**Limite de détection**

La limite de détection du dosage a été déterminée en analysant 14 fois l'étalon zéro sur trois lots différents. Calculée comme étant la moyenne plus deux écart-types, elle est de 1,6 U/ml.

**Étude d'interférences**

Trois échantillons faiblement positifs ont reçu l'ajout de bilirubine à 0,2 mg/ml, d'hémoglobine à 400 mg/dl, de lipide à 15 mg/ml et de facteur rhumatoïde à 200 UI/ml. Les résultats indiquent que les concentrations analysées n'interfèrent pas avec les résultats des anti-CCP.

**Literature / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER / LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W. Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W., Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F., Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F., Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry.* 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. *Neth. J. Med.* 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A., Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot number. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Ag</b>	Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antigeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).
<b>DIL</b>	Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>20X</b>	Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> <b>0.5M</b>	Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).
<b>CONJ</b>	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.
<b>CAL</b>	Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

## **IMMUNOSCAN CCPlus®**

Sólo para uso profesional

### **USO PREVISTO**

El *kit* de prueba CCPlus® Immunoscan es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgG frente a los péptidos citrulinados cíclicos (PCC) en sueros humanos.

El ensayo se utiliza para detectar anticuerpos en una única muestra de suero. Los resultados del ensayo se usan como ayuda para el diagnóstico de la artritis reumatoide (AR), conjuntamente con otros hallazgos de laboratorio y clínicos. El análisis deben realizarlo profesionales de laboratorio debidamente formados. "Para uso diagnóstico *in vitro*".

### **RESUMEN Y EXPLICACIÓN**

La artritis reumatoide (AR), es una de las enfermedades autoinmunes sistémicas más frecuentes.

La causa de la enfermedad, que afecta a hasta un 1-2% de la población mundial, es desconocida. El diagnóstico de la AR depende fundamentalmente de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La única prueba serológica usada habitualmente es la determinación de la presencia de los factores reumatoides (FR) en el suero. Los FR son anticuerpos dirigidos contra la región constante de las inmunoglobulinas de tipo IgG. Sin embargo, estos anticuerpos están también presentes en un porcentaje relativamente alto en otras enfermedades autoinmunes, en infecciones y en hasta el 15% de la población sana.

Se han encontrado anticuerpos de naturaleza más específica en el suero de pacientes con AR (véase una revisión en (1)). Se ha comunicado que hay anticuerpos anti-factor perinuclear (AFP) en alrededor del 50% de los pacientes con AR con una especificidad de más del 70% (2). Se han descrito varios péptidos sintéticos cíclicos no relacionados con la filagrina u otras proteínas conocidas y que son reconocidos específicamente por autoanticuerpos del suero de pacientes con AR (3). Estos péptidos se usaron posteriormente en un EIA para la detección de autoanticuerpos específicos de la AR (3). Los estudios de evaluación clínica demostraron que el EIA era positivo en un número significativo de sueros de pacientes con AR bien definidos, con una excelente especificidad respecto a los controles con otras enfermedades (3-8). Se encontró valor diagnóstico y pronóstico para la medición de los anticuerpos frente a los péptidos citrulinados cíclicos (anti-PCC) en relación con la afectación articular y el daño radiológico en la AR precoz (7, 9-14). Pueden detectarse anticuerpos anti-PCC años antes del desarrollo de síntomas clínicos (14). Un estudio prospectivo de cohortes demostró que el 93% de los pacientes con positividad anti-PCC y con artritis indiferenciada finalmente desarrollaron artritis reumatoide, lo que demuestra el importante valor predictivo positivo de estos anticuerpos (14). El ensayo Immunoscan CCPlus® presentado por Svar Life Science está basado en péptidos sintéticos altamente purificados que contienen residuos de citrulina y es un valioso aporte al diagnóstico de la AR. Este kit anti-PCC contiene péptidos sintéticos mejorados, seleccionados en base a una superior eficacia del ensayo para la detección de autoanticuerpos en la AR (8-14).

## PRINCIPIO DEL EIA DE LOS PÉPTIDOS AR

El kit anticuerpo anti-PCC está basado en el método ELISA. El ensayo utiliza una microplaca con pocillos recubiertos por péptidos sintéticos citrulinados (antígeno). Se aplica en los pocillos el suero diluido de los pacientes y se incuba. Si hay anticuerpos específicos, se unirán al antígeno en los pocillos. El material no unido se lava y el anticuerpo unido se detecta añadiendo anticuerpos frente a IgG humana marcados con peroxidasa de rabanito picante (PRP), seguidos por un segundo paso de lavado y por incubación con sustrato. La presencia de los anticuerpos reactivos dará lugar al desarrollo de color, el cual es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido y esto es determinado fotométricamente.

## PRECAUCIONES

1. La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,5 M. No permita que el reactivo entre en contacto con la piel.
2. Evite el contacto de todo material biológico con la piel y membranas mucosas
3. No pipetee con la boca
4. Los controles y los calibradores contiene plasma de origen humano. Aunque se ha estudiado y se ha confirmado como negativo para VIH 1+2, VHC, HbsAg y Ag VIH-1 este material debe tratarse como potencialmente infeccioso. - Los Centers for Disease Control and Prevention y los National Institutes of Health recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manipulen en un nivel 2 de Bioseguridad.
5. La TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) es tóxica por inhalación, en contacto con la piel y al tragarla. Tenga cuidado al manipular el sustrato.
6. La solución conjugada contiene 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [EC no. 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no. 220-239-6] (3:1) Puede causar una reacción alérgica en la piel.
7. No use componentes pasada su fecha de caducidad y no mezcle componentes de diferentes lotes.
8. Cada pozo se usa en última instancia como una cubeta óptica. Por tanto, no toque la superficie inferior de los pocillos e impida que se dañen o se ensucien.
9. Los resultados óptimos se obtienen con un seguimiento estricto de este protocolo. Es necesario un pipeteado y un lavado cuidadosos durante este procedimiento para mantener la precisión y la exactitud.
10. Los calibradores, los controles y el tampón de dilución contienen un 0,09% de azida sódica. Se ha comunicado que la azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías para formar compuestos explosivos. Cuando la elimine, irrigue los sumideros con agua para reducir al mínimo la acumulación de compuestos de azidas metálicas.
11. Para uso diagnóstico in vitro.

Pueden solicitarse a Svar Life Science las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes contenidos en este kit.

**Conjugado:****Atención**

Contiene: Masa de reacción: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261 Evitar respirar el aerosol.

P280 Llevar guantes de protección.

P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico.

**CONTENIDO DEL KIT**

Contenido del kit de EIA:

- 1 microplaca sellada, recubierta con el péptido PCC (96 pocillos). Lista para usar.
- 5 viales con calibradores (reserva de plasma humano positivo) (1,2 ml). Listos para usar (azul)
- 1 vial con plasma de referencia control humano (1,2 ml). Listo para usar (azul)
- 1 vial con plasma control humano positivo (1,2 ml). Listo para usar (azul)
  - 1 vial con plasma control humano negativo (1,2 ml). Listo para usar (azul)
- 1 vial con solución de conjugado (peroxidasa conjugada con anticuerpos anti IgG humana) (15 ml) Listo para usar (rojo).
- 1 vial con solución sustrato TMB (15 ml). Listo para usar.
- 2 viales con tampón de dilución (35 ml). Listos para usar (azul)
- 1 vial con solución de parada (15 ml). Listo para usar.
- 2 viales con tampón de lavado (35ml) 20x concentrado.

**EQUIPO ADICIONAL REQUERIDO QUE NO ES PARTE INTEGRANTE DEL SET**

- Espectrofotómetro con filtro de 450nm.
- Lavador automático de placas de microtítulos.

**MANEJO Y ALMACENAMIENTO**

- Conserve el kit a 2-8° en lugar oscuro
- No utilice los reactivos pasada su fecha de caducidad
- Es aconsejable abrir la microplaca sellada inmediatamente antes de su uso.
- Debe evitarse la directa de la luz sobre la solución cromógena.

Si se observa una reacción de coloración débil o ausente en el primer calibrador A (3200 unidades/ml) E450nm <0,9, el resultado de la prueba no es válido.

## PREPARACION DE LA MUESTRA

Esta prueba se realiza sobre muestras de suero. En muestras de suero, recoja muestras de sangre venosa y deje que se coagulen por completo. Conserve las muestras durante un máximo de 48 horas a 4-8° C. Para un almacenamiento prolongado, congele las muestras a -20° C.

Diluya la muestra del paciente 1:50 (Mezcle 10 µl de muestra en un tubo con 490 µl de tampón de dilución). Use 100 µl en la prueba. (Véase el protocolo del ensayo).

## PREPARACION Y MANEJO DE REACTIVOS

Antes de comenzar el ensayo, la microplaca y los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente. No abra la placa sellada hasta que ésta alcance la temperatura ambiente.

Mezcle cuidadosamente los reactivos antes de su uso.

Los reactivos incluidos en el kit son suficientes para llevar a cabo 96 análisis (incluidos los análisis de calibradores y controles).

Los calibradores y los controles se analizan por duplicado.

Los tampones concentrados pueden contener cristales salinos, que deben disolverse a temperatura ambiente (18-25° C).

1. Guarde todos los reactivos inmediatamente después de su uso, en oscuridad a 2-8° C.
2. Microplaca revestida con péptidos PCC. Lista para usar.  
Guarde las pocillos restantes en el papel de aluminio con el desecante y almacene a 2-8° C.
3. Tampón de lavado (35 ml) El tampón de lavado se suministra concentrado 20 veces. Prepare diluciones antes de su uso. Añada 35 ml de tampón de lavado a 665 ml de agua destilada y mezcle cuidadosamente.
4. Solución Sustrato TMB (15 ml). Reactivo listo para usar. Manténgalo en la oscuridad.
5. Tampón de dilución (35 ml). Listo para usar.
6. Solución de conjugado (15 ml). Lista para usar.
7. Solución de parada (15 ml). Lista para usar.
8. Calibradores A-E (1,2 ml). Cinco calibradores de plasma humano positivo diluido, con valores expresados en unidades relativas.  
El calibrador A contiene 3200 U/ml, B 800 U/ml, C 200 U/ml, D 50 U/ml y E 25 U/ml. Los calibradores están listos para usar.
9. Control de referencia (1,2 ml). Plasma humano diluido, 25 U/ml, listo para usar.
10. Control negativo (1,2 ml). Plasma humano diluido, listo para usar.
11. Control positivo (1,2 ml). Plasma humano diluido, listo para su uso.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### Protocolo de lavado

En un EIA los componentes no unidos deben ser eliminados eficazmente después de cada paso de incubación inmunológica. Esto se consigue aclarando adecuadamente. Debe quedar claro que cada proceso de enjuagado debe realizarse con cuidado para garantizar buenos resultados. El lavado puede realizarse manualmente ó con un equipo automático de lavado de placas, como sigue:

#### Lavado manual

1. Vacíe el contenido de cada pocillo poniendo la microplaca boca abajo seguido por un movimiento vertical corto y firme.
2. Rellene todos los pocillos con 300  $\mu$ l de tampón de lavado.
3. El ciclo de lavado (1 y 2) debe realizarse 3 veces.
4. Vuelque de nuevo la placa y vacíe los pocillos mediante un movimiento firme vertical.
5. Coloque la placa invertida sobre toallitas de papel absorbente y golpee firmemente la placa para retirar la solución de lavado residual en los pocillos.
6. Continúe inmediatamente con el siguiente paso de adición de reactivo.

#### Lavado mediante un equipo automático de lavado de microplacas

Cuando utilice un equipo automático de lavado de placas, compruebe que se pueden aspirar completamente todos los pocillos y que el tampón de lavado es dispensado correctamente alcanzando el borde de cada pocillo durante cada ciclo de lavado. Debe programarse la máquina para que ejecute tres ciclos de lavado. Continúe inmediatamente con el siguiente paso de adición de reactivo.

### Protocolo del ensayo

Prepare las muestras conforme a la sección de preparación de muestras, (ej: diluir 1:50 en tampón de dilución) y los reactivos conforme a la preparación y manejo de reactivos. ¡La microplaca está lista para su uso, no la lave! Las muestras de pacientes pueden estudiarse de forma singular o por duplicado.

### Protocolo semicuantitativo

1. Pipetee 100  $\mu$ l de tampón de dilución por duplicado (pocillos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: blanco).
2. Pipetee 100  $\mu$ l de cada calibrador por duplicado (pocillos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).
3. Pipetee 100  $\mu$ l de controles negativo y positivo, por duplicado (pocillos G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>)
4. Pipetee 100  $\mu$ l de muestras de pacientes diluidas en sus correspondientes pocillos de la microplaca. El tiempo total de pipeteo de los pasos 1-4 no debe exceder de 15 minutos.
5. Incube durante 60 min  $\pm$  5 min. a temperatura ambiente. (18-25°C).
6. Elimine la solución de la microplaca y lave conforme al procedimiento de lavado.
7. Pipetee 100  $\mu$ l de la solución de conjugado a cada pocillo.
8. Incube durante 30 min  $\pm$  5 min. a temperatura ambiente. (18-25°C).
9. Deseche la solución de conjugado de la microplaca y lave la microplaca según el procedimiento de lavado.
10. Pipetee 100  $\mu$ l de solución de sustrato en cada pocillo.
11. Incube durante 30 min  $\pm$  5 min. a temperatura ambiente. (18-25°C).
12. Añada 100  $\mu$ l de solución de parada a cada pocillo.
13. Lea los valores de absorbancia en 10 min. a 450 nm.

**Protocolo cualitativo**

Ejecute como se describe en el protocolo semicuantitativo con una excepción: sustituya el conjunto de calibradores (A-E) por el control de referencia.

**CONTROL DE CALIDAD**

Para el protocolo semicuantitativo, el calibrador A (3200 unidades/ml) debe tener una DO de  $\geq 0,9$ . Calcule la media de los pocillos duplicados para cada calibrador y control. El valor de los controles debe calcularse después como se indica en interpretación de resultados, véase más abajo.

Consulte en la etiqueta de control positivo el rango válido de controles positivos. El control negativo debe ser  $<25$  U/mL.

Respecto al protocolo cualitativo, consulte en la etiqueta de control positivo la relación válida de control positivo en comparación con el control de referencia.

El relación de control negativo frente al control de referencia debe ser  $<0,95$ .

Si alguno de los controles queda fuera de los rangos respectivos, el análisis será considerado no válido y deberá repetirse.

**INTERPRETACION DE RESULTADOS****Protocolo semicuantitativo**

Sustraiga el valor de absorbancia media de los pocillos  $A_1$  y  $A_2$  de las absorbancias individuales de los pocillos que contienen los calibradores, los controles y las muestras. Los valores de absorbancia de los cinco calibradores (valores medios de los duplicados) se pueden representar manualmente en el eje y lineal frente a las unidades en un eje x logarítmico. La curva de calibración está próxima a la linealidad en el rango 25-2962 U/ml. El título de anticuerpos se expresa en unidades, usando para ello los sueros calibradores y la lectura del valor en unidades corresponderá a la absorbancia media neta de la muestra en la curva de calibración. Otra posibilidad es usar un programa de software usando un ajuste de curva a 4 parámetros para el cálculo.

A los cinco calibradores (A - E) se les ha asignado un valor de 3200 U/ml (A), 800 U/ml (B), 200 U/ml (C), 50 U/ml (D) y 25 U/ml (E). Estos valores han sido elegidos de forma arbitraria por Svar Life Science al no existir un estándar (inter)nacional reconocido para expresar el título de anticuerpos anti-PCC. Las muestras con lectura superior al calibrador A (3200 unidades/ml) deben ser analizadas de nuevo a una dilución mayor. Por el momento no hay pruebas de que las unidades obtenidas puedan usarse como medida de la intensidad de la enfermedad. Los anticuerpos de diferentes pacientes pueden tener distintas afinidades, lo que significa, que se mide la inmunoreactividad del anticuerpo más que su concentración.

La curva de calibración no puede usarse para valores de absorbancia por debajo del calibrador E (25 unidades/ml). Estos valores deberán informarse como  $<25$  unidades/ml.

**Protocolo cualitativo**

Sustraiga el valor de absorbancia media de los pocillos  $A_1$  y  $A_2$  de las absorbancias individuales de los pocillos que contienen los controles y muestras.

Calcule la relación de absorbancias (densidad óptica) entre el control de referencia y cada muestra.

Relación de absorbancias=  $\frac{\text{DO del control } \bullet \text{ la muestra}}{\text{DO del control de referencia}}$

## CRITERIOS DE EVALUACION

### Protocolo semicuantitativo

Las muestras con resultados < 25 U/ml se definen como negativas. Las muestras con  $\geq 25$  unidades/ml se definen como positivas.

### Protocolo cualitativo

Los usuarios deben calcular un valor de corte entre las muestras positivas y negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes usadas en el ensayo clínico de Svar Life Science sugieren el siguiente valor de corte:

#### Relación de absorbancia

< 0,95

$\geq 0,95$  a  $\leq 1,0$

> 1,0

#### Interpretación de resultados

Negativos

Dudosos-recomendable repetir el ensayo

Positivos

### Limitaciones

1. Un resultado positivo debe usarse conjuntamente con la evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos. Los valores obtenidos de este ensayo están pensados para ser sólo una ayuda para el diagnóstico. Cada médico debe interpretar los resultados conjuntamente con la historia del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. Pueden verse anticuerpos anti-PCC elevados en personas sin evidencias de enfermedad clínica. También, algunas personas con AR pueden tener anticuerpos indetectables. Los niveles de anticuerpos anti-PCC no se correlacionan necesariamente con el estado de la enfermedad.
3. Como los niveles de anticuerpo anti-PCC no se correlacionan necesariamente con el estado de la enfermedad, no debe iniciarse o cambiarse el tratamiento en base a un resultado positivo. Deben tenerse en cuenta los hallazgos clínicos para todas las decisiones de tratamiento.
4. No se ha establecido la monitorización de niveles de anticuerpo anti-PCC para controlar la progresión y/o la remisión de la AR.
5. No se han establecido las características de rendimiento de este ensayo para muestras pediátricas. No se ha determinado el valor diagnóstico de los anticuerpos anti-PCC en la artritis juvenil.

### Resultados esperados

El EIA de péptidos PPC mide anticuerpos frente a péptidos sintéticos con residuos de citrulina (anti-PCC). El EIA de péptidos PCC se calibra en el ensayo semicuantitativo en unidades relativas partiendo de plasmas positivos de pacientes. La curva de calibración va de 25 a 3200 unidades/ml. Estos valores se han elegido de forma arbitraria por Svar Life Science al no existir un estándar (inter)nacional reconocido para expresar el título de anticuerpos anti-PCC. La especificidad y sensibilidad se evaluaron en estudios clínicos con 311 pacientes con AR, 942 pacientes enfermos no de AR (incluyendo otras enfermedades autoinmunes y una amplia gama de enfermedades infecciosas) y 330 controles sanos. La sensibilidad fue del 70%. La especificidad fue del 97% para pacientes enfermos no de AR y 99% para individuos sanos. (15)



## CARACTERISTICAS TECNICAS

**Tabla 1. Porcentaje de concordancia del kit de PCC Immunoscán CCPlus® en comparación con un ELISA alternativo de PCC.** Se estudiaron un total de 628 sueros congelados retrospectivos. 368 muestras eran de pacientes con AR y 260 muestras eran normales, de un banco de sangre. La tabla siguiente resume los resultados.

ELISA alternativo				
Kit PCC Immunoscán CCPlus®	Positivos	Positivos	Negativos	Total
		275	5	280
	Negativos	2	346	348
	Total	277	351	628

Porcentaje de concordancia positiva:  $275/277 = 99.3\%$  IC del 95% = 97.4–99.9%

Porcentaje de concordancia negativa:  $346/351 = 98.6\%$  IC del 95% = 96.7–99.5%

Porcentaje de concordancia global:  $621/628 = 98.9\%$  IC del 95% = 97.7–99.6%

El intervalo de confianza (IC) del 95% se calculó usando el método exacto.

**Tabla 2. Sensibilidad y especificidad clínicas.** Se ensayaron un total de 1.180 sueros retrospectivos congelados con caracterización clínica. En la tabla siguiente se resumen los resultados

Grupos control y con enfermedad	Número total	Negativos < 25 U/ml	Positivos ≥ 25 U/ml
Donantes de sangre	260	257	3
AR	399	90	309
GW	20	18	2
PM	20	20	0
LES	66	64	2
Enfermedad de Sjögren	13	13	0
EII	98	95	3
Artrosis	21	21	0
Tiroiditis	20	20	0
Virus de Epstein Barr	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	6	6	0
Tuberculosis	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonella	3	3	0
Chlamydia	5	4	1
Malaria	4	4	0
Borrelia	9	9	0
Sífilis	5	5	0
Endocarditis infecciosa	3	3	0
Legionella	4	4	0
PAE	3	3	0

<b>Esquistosomiasis</b>	4	4	0
<b>Rubéola</b>	5	5	0
<b>Síndrome de Chagas</b>	3	3	0
<b>Esclerodermia</b>	17	16	1
<b>Esclerosis múltiple</b>	20	20	0
<b>DMID</b>	20	20	0
<b>PM/DM</b>	20	20	0
<b>EMTC</b>	20	19	1
<b>Muestras rutinarias</b>	80	78	2

- AR = artritis reumatoide  
 GW = granulomatosis de Wegener  
 PM = poliangitis microscópica  
 LES = lupus eritematoso sistémico  
 PM/DM = Polimiositis/dermatomiositis  
 EII = enfermedad inflamatoria intestinal  
 PAE = prueba antiestreptolisina  
 DMID = diabetes mellitus insulín-dependiente  
 EMTC = enfermedad mixta del tejido conectivo

**Sensibilidad clínica**

AR = 309/399 = 77,4 %

IC del 95% = 73,3 – 81,5 %

**Especificidad clínica**

Donantes de sangre = 257/260 = 98.8%

IC del 95% = 96,7 – 99,8%

GW = 18/20 = 90.0%

IC del 95% = 68.3 – 98.8%

PM = 20/20 = 100%

IC del 95% = 83,2 - 100%

LES = 64/66 = 97.0%

IC del 95% = 89,5 – 99,6%

Enfermedad de

Sjögren = 13/13 = 100%

IC del 95% = 75,3 – 100%

EII = 95/98 = 96.9%

IC del 95% = 91,3 – 99,4%

Artrosis = 21/21 = 100%

IC del 95% = 83,9 - 100%

Tiroiditis = 20/20 = 100%

IC del 95% = 83,2 - 100%

Enfermedades

infecciosas = 85/86 = 98.8%

IC del 95% = 93,7 - 100%

Esclerodermia = 16/17 = 94.1%

IC del 95% = 71,3 – 99,8%

Esclerosis múltiple = 20/20 = 100%

IC del 95% = 83,2 - 100%

DMID = 20/20 = 100%

IC del 95% = 83,2 - 100%

PM/DM = 20/20 = 100%

IC del 95% = 83,2 - 100%

EMTC = 19/20 = 95.0%

IC del 95% = 75,1 – 99,9%

Muestras rutinarias = 78/80 = 97.5%

IC del 95% = 91,3 – 99,7%

El intervalo de confianza (IC) del 95% se calculó usando el método exacto.

**Tabla 3.** Se determinó la **precisión intraensayo** estudiando seis muestras diferentes ocho veces cada una.

	Alto		Alto		Alto	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	2672	1,421	2685	1,432	1150	1,664
D.E.	138	0,01	205	0,01	55,3	0,02
%C.V.	5,2	0,4	7,6	0,4	4,8	0,9
	Medio		Bajo		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	239	1,014	56	0,421	28	0,232
D.E.	2,3	0,01	2,1	0,01	0,5	0,01
%C.V.	1,0	0,4	3,8	2,8	3,6	1,3

**Tabla 4.** La **precisión entre ensayos** se determinó estudiando seis muestras diferentes ocho veces cada una. Se obtuvieron los resultados para tres ejecuciones diferentes.

	Alto		Alto		Alto	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	2696	1,426	2600	1,422	1168	1,706
D.E.	328	0,01	299	0,01	101,7	0,07
%C.V.	12,2	0,7	11,5	0,8	8,7	3,8
	Medio		Bajo		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	242	1,031	59	0,428	28	0,232
D.E.	5,0	0,03	3,1	0,02	0,5	0,01
%C.V.	2,1	2,5	5,2	3,8	1,8	0,9

**Tabla 5.** La **variación de lote a lote** se determinó estudiando seis muestras diferentes ocho veces cada una. Se obtuvieron resultados para tres lotes diferentes.

	Alto		Alto		Alto	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	2896	1,408	2870	1,408	1530	1,807
D.E.	405	0,02	335	0,02	260,4	0,03
%C.V.	14,0	1,4	11,7	1,5	17,0	1,6
	Medio		Bajo		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	259	1,100	60	0,462	62	0,471
D.E.	21,8	0,04	4,2	0,02	6,6	0,04
%C.V.	8,4	3,9	6,9	4,4	10,8	8,2

**Tabla 6.** La **recuperación de dilución** se determinó estudiando cinco diluciones seriadas para tres muestras diferentes.

Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/ml)	Concentración calculada (U/ml)	% de recuperación corregida por dilución
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/ml)	Concentración calculada (U/ml)	% de recuperación corregida por dilución
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/ml)	Concentración calculada (U/ml)	% de recuperación corregida por dilución
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Se diluyeron 1/50-1/1600 dos muestras adicionales en el rango lineal. Las concentraciones medias fueron de 164-6,0 U/ml y 321-11 U/ml, respectivamente, con una recuperación corregida por dilución entre el 98% y el 105%.

#### Límite de detección

El límite de detección del ensayo se determinó ejecutando el estándar cero 14 veces en tres lotes diferentes. Se calculó un límite de detección de 1,6 U/ml encontrando la media más dos desviaciones estándar

#### Estudio de interferencia

A tres muestras positivas bajas se les añadió bilirrubina 0,2 mg/ml, hemoglobina 400 mg/dl, lípidos 15 mg/ml y factor reumatoide 200 UI/ml. Los datos indican que las concentraciones ensayadas no interfieren con los resultados anti-PCC.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER / LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Ag</b>	Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antigeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).
<b>DIL</b>	Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>20X</b>	Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> <b>0.5M</b>	Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).
<b>CONJ</b>	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.
<b>CAL</b>	Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

## **IMMUNOSCAN CCPlus®**

Nur für den Fachgebrauch

### **VERWENDUNGSZWECK**

Das Immunoscan CCPlus® Testkit ist ein enzymgebundener Immunosorbenttest (ELISA) für die qualitative und semiquantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen cyclische Citrullinpeptide (CCP) im Humanserum.

Der Test wird zum Nachweis von Antikörpern in einer einzelnen Serumprobe verwendet. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit anderen labordiagnostischen und klinischen Befunden zur Unterstützung der Diagnose auf rheumatoide Arthritis (RA) bestimmt. Die Untersuchung nur von ausgebildetem Laborpersonal durchführen lassen. In-vitro-Diagnostikum.

### **ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG**

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten systemischen Autoimmunerkrankungen. Die Ätiologie dieser Erkrankung, von der 1-2 % der Weltbevölkerung betroffen sind, ist unbekannt. Die Diagnose der RA hängt in erster Linie von dem klinischen Erscheinungsbild der Krankheit ab. Der einzige in der Routinediagnostik bisher akzeptierte serologische Test ist die Bestimmung des Rheumafaktors (RF). RF sind Antikörper, welche gegen die konstante Region von IgG-Immunglobulinen gerichtet sind. RF weisen eine hohe Sensitivität auf, werden jedoch auch zu einem relativ hohen Prozentsatz bei anderen Autoimmunerkrankungen, Infektionen, und bis zu 15 % bei gesunden Personen gefunden.

Es wurden in Seren von RA-Patienten auch andere Antikörper mit einer höheren Spezifität nachgewiesen (siehe Übersicht unter 1). Als solch ein potentieller serologischer Parameter sind Anti-perinukleäre-Faktor-Antikörper (APF) in ca. 50 % der RA-Patienten mit einer Spezifität von über 70 % beschrieben worden (2). Es wurden eine Anzahl cyclischer synthetischer Peptide, die nicht mit Filaggrin oder anderen bekannten Proteinen in Verbindung stehen, beschrieben, die gezielt von Antikörpern in Seren von RA-Patienten erkannt werden (3). Diese Peptide wurden danach in einem EIA zur Bestimmung von RA spezifischen Autoantikörpern (3) genutzt. Die klinische Evaluierung dieses Testsystems zeigte, dass gegenüber Kontrollseren für eine signifikante Anzahl gut definierter RA-Patienten eine hohe Spezifität erreicht wurde (3-8). Es konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen Anti-CCP-Antikörpern und klinischen Manifestationen wie Gelenk- und radiologischen Schädigungen bei frühen Formen der RA gefunden werden, so dass dieser Parameter für die Prognose von RA-Patienten herangezogen werden kann (7, 9-14). Weiterhin können Anti-CCP-Antikörper Jahre vor dem Auftreten erster klinischer Symptome einer RA nachgewiesen werden (14). Mit Hilfe einer prospektiven Kohortenstudie konnte gezeigt werden, dass 93 % der Anti-CCP-Antikörper positiven Patienten mit undifferenzierter Arthritis im Verlauf der Erkrankung eine RA entwickelten, was den hohen positiven, prädiktiven Wert dieser Antikörper unterstreicht (14). Der Immunoscan CCPlus® von Svar Life Science enthält hoch gereinigte synthetische Peptide mit Citrullin und stellt eine neue Methode für die serologische RA-Diagnostik dar. Dieses Anti-CCP-Kit verwendet verbesserte synthetische Peptide, die eine höhere Spezifität und Sensitivität gewährleisten (8-14).

## PRINZIP DES RA PEPTID-EIA

Das Anti-CCP Antikörper-Kit basiert auf der ELISA-Methode. Der Test verwendet mit synthetischen Citrullin-Peptiden (Antigen) beschichtete Mikrotiterplatten. Verdünntes Patientenserum wird in die Kavitäten pipettiert und inkubiert. Sind spezifische Antikörper vorhanden, so binden sich diese an die Antigene auf der Mikrotiterplatte. Ungebundene Antikörper werden durch einen Waschschrift entfernt. Gebundene Antikörper reagieren nach Zugabe des Konjugats mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem Anti-Human-IgG. Nach der Inkubation erfolgt ein zweiter Waschschrift und eine Inkubation mit Substrat.

Das Vorhandensein von CCP-spezifischen Antikörpern wird anhand der Farbentwicklung photometrisch bei 450 nm gemessen, die der Menge des gebundenen Antikörpers proportional entspricht.

## VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Die Stopplösung enthält 0,5 M Schwefelsäure. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden.
2. Alle biologischen Materialien dürfen nicht mit Haut oder Schleimhaut in Kontakt kommen.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Die Kontrollen und Kalibratoren enthalten Humanplasma. Obwohl auf HIV 1+2, HCV, HBsAg und HIV-1Ag getestet und negativ bestätigt, muss das Material als potentiell infektiös behandelt werden. - Die „Centers for Disease Control and Prevention“ und das „National Institutes of Health“ empfehlen, potentiell infektiöse Materialien nach Biosafety Level 2 zu behandeln.
5. TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin) wirkt toxisch beim Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Mit dem Substrat bitte sorgfältig umgehen.
6. Die Konjugatlösung enthält 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1) Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
7. Komponenten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden sowie Komponenten verschiedener Chargen nicht mischen.
8. Jede Kavität ist eine optische Küvette. Deshalb ist die Berührung, Beschädigung und Verschmutzung der unteren Außenfläche der Mikrotiterplatte zu vermeiden.
9. Optimale Ergebnisse werden durch die exakte Befolgung dieser Anweisung erzielt. Während des gesamten Ablaufs ist sorgfältiges Pipettieren und Waschen erforderlich, um Genauigkeit und Richtigkeit zu gewährleisten.
10. Kalibratoren, Kontrollen und Verdünnungspuffer enthalten 0,09 % Natriumazid. Es ist bekannt, dass Natriumazid bei Reaktion mit Blei- oder Kupferleitungen hochexplosive Verbindungen bilden kann. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen, um eine Ansammlung von Metallazidverbindungen zu vermeiden.
11. In-vitro-Diagnostikum.

Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen Bestandteile auf Anfrage von Svar Life Science erhältlich.

**Konjugatlösung:****ACHTUNG**

Enthält: Reaktionsmasse aus: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Kan allergische Hautreaktionen verursachen.

P261 Einatmen von Aerosol vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe tragen.

P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

**TEST-KIT-KOMPONENTEN**

Inhalt EIA-Kit:

- 1 mit CCP-Peptid beschichtete Mikrotiterplatte, versiegelt (96 Kavitäten). Gebrauchsfertig.
- 5 Fläschchen mit Kalibratoren, (positives Humanplasma, gepoolt (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau).
- 1 Fläschchen mit Referenz-Kontrolle, Humanplasma (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau).
- 1 Fläschchen mit Positivkontrolle, Humanplasma (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau).
- 1 Fläschchen mit Negativkontrolle, Humanplasma (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau).
- 1 Fläschchen mit Konjugat (an Anti-Human-IgG konjugierte Peroxidase) (15 ml). Gebrauchsfertig (rot).
- 1 Fläschchen mit Substrat TMB (15 ml). Gebrauchsfertig.
- 2 Fläschchen mit Verdünnungspuffer (35 ml). Gebrauchsfertig (blau).
- 1 Fläschchen mit Stopplösung (15 ml). Gebrauchsfertig.
- 2 Fläschchen mit Waschpuffer (35 ml), 20fach konzentriert.

**ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE AUSRÜSTUNG, DIE NICHT BESTANDTEILE DES SETS SIND**

- Spektrophotometer mit Filter für 450nm.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher

**HANDHABUNG UND LAGERUNG**

- Das Testkit bei 2-8° C im Dunkeln lagern.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Es wird empfohlen, die versiegelte Mikrotiterplatte erst kurz vor der Anwendung auszuwickeln.
- Jeglichen direkten Lichteinfall auf die Chromogenlösung vermeiden.

Das Testergebnis ist ungültig, wenn der erste Kalibrator A (3200 U/ml) E450nm <0,9, eine schwache oder keine Farbreaktion zeigt.

## PROBENVORBEREITUNG

Dieser Test kann mit Serumproben durchgeführt werden. Für Serumproben venöses Blut entnehmen und vollständig gerinnen lassen. Proben nicht länger als 48 Stunden bei 4-8° C lagern. Zur längerfristigen Lagerung bei -20° C einfrieren.

Patientenprobe im Verhältnis 1:50 verdünnen (in einem Röhrchen 10 µl Probe mit 490 µl Verdünnungspuffer mischen). Für den Test 100 µl verwenden. (Siehe Testanleitung).

## VORBEREITUNG UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN

Vor Testbeginn Mikrotiterplatte und Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die Versiegelung der Platte erst öffnen, wenn sie Raumtemperatur erreicht hat.

Reagenzien vor Gebrauch gründlich mischen.

Die im Kit vorhandenen Reagenzien reichen für 96 Tests (einschließlich Kalibrator- und Kontrolltests).

Kalibratoren und Kontrollen werden im Doppelansatz getestet.

Die Pufferkonzentrate können Salzkristalle enthalten, die sich bei Raumtemperatur (18-25° C) auflösen.

1. Nach Gebrauch alle Reagenzien wieder im Dunkeln bei 2-8° C aufbewahren.
2. Mit CCP-Peptiden beschichtete Mikrotiterplatte. Gebrauchsfertig. Überzählige Kavitäten wieder in der Folie versiegeln und bei 2-8° C lagern.
3. Waschpuffer (35 ml). Der Waschpuffer wird 20fach konzentriert geliefert. Vor Gebrauch verdünnen. Zu 35 ml Waschpuffer 665 ml destilliertem Wasser geben und gründlich mischen.
4. TMB-Substrat (15 ml). Das Reagenz ist gebrauchsfertig. Im Dunkeln aufbewahren.
5. Verdünnungspuffer (35 ml). Gebrauchsfertig.
6. Konjugat (15 ml). Gebrauchsfertig.
7. Stopplösung (15 ml). Gebrauchsfertig.
8. Kalibrator A-E (1,2 ml). 5 verdünnte positive Kalibratoren aus Humanplasma mit Werten ausgedrückt in relativen Einheiten.  
Kalibrator A enthält 3200 U/ml, B 800 U/ml, C 200 U/ml, D 50 U/ml und E 25 U/ml. Kalibratoren sind gebrauchsfertig.
9. Referenzkontrolle (1,2 ml). Verdünntes Humanplasma, 25 U/ml, gebrauchsfertig.
10. Negativkontrolle (1,2 ml). Verdünntes Humanplasma, gebrauchsfertig.
11. Positivkontrolle (1,2 ml). Verdünntes Humanplasma, gebrauchsfertig.

## TESTABLAUF

### Waschen

In EIA-Tests müssen nicht gebundene Komponenten zwischen jedem immunologischen Inkubationsschritt effizient entfernt werden. Dieses wird durch entsprechende Waschschriffe erreicht. Der Anwender sollte wissen, dass, um gute Ergebnisse zu erzielen, der Waschvorgang sorgfältig ausgeführt werden muss. Das Waschen kann manuell oder mit einem automatischen Plattenwaschgerät wie folgt durchgeführt werden:

#### Manuelles Waschen

1. Jede Kavität vom Inkubationsgemisch befreien, indem die Mikrotiterplatte kurz und kräftig ausgeschlagen wird.
2. Jede Kavität mit Waschlösung (300 µl) auffüllen.
3. Dieser Waschzyklus (1 und 2) muss 3-mal wiederholt werden.
4. Danach die Platte umdrehen und kurz und kräftig ausschlagen.
5. Die Platte auf Papiertücher legen und fest auf die Platte klopfen, um Reste der Waschlösung in den Kavitäten zu entfernen.
6. Daraufhin sofort das nächste Reagenz dispensieren.

#### Waschen mit einem automatischen Mikrotiterplattenwaschgerät

Bei Verwendung eines automatischen Plattenwaschgeräts ist darauf zu achten, dass alle Kavitäten vollständig abgesaugt werden, und der Waschpuffer bei jedem Waschzyklus gleichmäßig auf jede Kavität verteilt wird. Das Waschgerät sollte auf die Durchführung von drei Zyklen eingestellt sein. Daraufhin sofort das nächste Reagenz dispensieren.

#### Testanleitung

Proben gemäß Abschnitt „Probenvorbereitung“ (d. h. mit Verdünnungspuffer 1:50 verdünnen) und die Reagenzien gemäß „Vorbereitung und Handhabung der Reagenzien“ vorbereiten. Die Mikrotiterplatte ist gebrauchsfertig, nicht waschen! Patientenproben können in Einzel- oder Doppelbestimmung getestet werden.

#### Semi-quantitative Bestimmung

1. Im Doppelansatz 100 µl Verdünnungspuffer in A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, blank (Leerwert) pipettieren.
2. Im Doppelansatz 100 µl der einzelnen Kalibratoren (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>) pipettieren.
3. Im Doppelansatz je 100 µl Negativ- und Positivkontrolle (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>) pipettieren.
4. 100 µl der verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren. Das Pipettieren der Schritte 1-4 sollte insgesamt nicht länger als 15 Min. dauern.
5. 60 Minuten ± 5 Min. bei Raumtemperatur (18-25° C) inkubieren.
6. Die Lösung aus der Mikrotiterplatte entfernen und gemäß Anleitung waschen.
7. In jede Kavität 100 µl Konjugat pipettieren.
8. 30 Minuten ± 5 Min. bei Raumtemperatur (18-25° C) inkubieren.
9. Das Konjugat aus der Mikrotiterplatte entfernen und gemäß Anleitung waschen.
10. In jede Kavität 100 µl Substrat pipettieren.
11. 30 Minuten ± 5 Min. bei Raumtemperatur (18-25° C) inkubieren.
12. In jede Kavität 100 µl Stopplösung pipettieren.
13. Innerhalb von 10 Min. Extinktion bei 450 nm ablesen.

#### Qualitative Bestimmung

Gemäß der Anleitung zur semiquantitativen Bestimmung ansetzen mit Ausnahme von: Das Kalibrator-Set (A-E) gegen die Referenzkontrolle austauschen.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Bei der semiquantitativen Bestimmung sollte der Kalibrator A (3200 Unit/ml) eine OD von  $\geq 0,9$  erreichen. Für die Doppelbestimmung jeden Kalibrators und jeder Kontrolle den Mittelwert berechnen. Dann den Wert der Kontrollen wie in „Auswertung der Ergebnisse“ berechnen (siehe unten).

Bitte beachten Sie das Etikett der Positivkontrolle für den gültigen Messbereich der Positivkontrolle. Die Negativkontrolle sollte  $<25$  U/ml sein.

Bitte beachten Sie bei der qualitativen Messung das Etikett der Positivkontrolle für das gültige Verhältnis von Positivkontrolle zu Referenzkontrolle.

Das Verhältnis von Negativkontrolle zu Referenzkontrolle sollte  $<0.95$  sein.

Wenn irgendeiner dieser Werte nicht innerhalb des angegebenen Bereichs liegt, sollte der Test als ungültig betrachtet und wiederholt werden.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

### Semi-quantitative Bestimmung

Den Mittelwert der Extinktion des Leerwerts ( $A_1$  und  $A_2$ ) von den einzelnen Extinktionen für die Kalibratoren, Kontrollen und Proben abziehen. Die Extinktionswerte der 5 Kalibratoren (Mittelwert der Doppelbestimmung) können in einem Diagramm auf der y-Achse im Verhältnis zu den relativen Einheiten auf der logarithmischen x-Achse graphisch dargestellt werden. Die Kalibrationskurve verläuft im Messbereich zwischen 25-2962 U/ml fast linear. Der Antikörpertiter wird in Units angegeben, die durch die Kalibratoren bestimmt werden, indem auf der Kalibrationskurve der entsprechende Wert für den Netto-Mittelwert der Probe in Units abgelesen wird. Alternativ kann ein Softwareprogramm, das mit einer passenden 4-Parameter-Kurve arbeitet, für die Berechnung verwendet werden.

Die fünf Kalibratoren (A-E) haben die Werte 3200 U/ml (A), 800 U/ml (B), 200 U/ml (C), 50 U/ml (D) und 25 U/ml (E). Diese Werte wurden von Svar Life Science willkürlich ausgewählt, da es keine international anerkannten Standardwerte gibt, um die Konzentration von Anti-CCP darzustellen. Proben, für die höhere Werte als der A-Standard (3200 U/ml) gemessen werden, mit einer höheren Probenverdünnung erneut testen. Es gibt zurzeit keinen Anhalt dafür, dass die Höhe der ermittelten Units als Maß für die Schwere der Erkrankung verwendet werden kann. Antikörper verschiedener Patienten können unterschiedliche Affinitäten aufweisen, so dass eher die Immunreaktivität als die Autoantikörperkonzentration gemessen wird.

Die Kalibrationskurve kann für die Extinktionswerte unterhalb des Kalibrators E (25 U/ml) nicht verwendet werden. Diese Werte als  $< 25$  U/ml angeben.

### Qualitative Bestimmung

Der Mittelwert der Extinktion der Leerwerte ( $A_1$  and  $A_2$ ) ist von den Extinktionen der Kontrollen und Proben abzuziehen.

Den Bindungsindex (optischen Dichte) für die Kontrolle und jede einzelne Probe berechnen.

$$\text{Bindungsindex} = \frac{\text{Extinktion der Kontrolle *oder* Probe}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$$

## BEWERTUNGSKRITERIEN

### Semi-quantitative Bestimmung

Proben mit Ergebnissen von  $< 25$  U/ml gelten als negativ. Proben  $\geq 25$  U/ml gelten als positiv.

### Qualitative Bestimmung

Benutzer müssen ein Cut-Off zwischen positiven und negativen Proben berechnen, der für ihre Patientenpopulation spezifisch ist. Ergebnisse für von Svar Life Science in einer klinischen Prüfung verwendete Patientenpopulationen weisen auf ein folgendes Cut-Off hin:

#### Bindungsindex

$< 0,95$

$\geq 0,95$  bis  $\leq 1,0$

$> 1,0$

#### Interpretation der Ergebnisse

Negativ

Grenzwertig, Wiederholung der Bestimmung empfohlen

Positiv

### Einschränkungen

1. Ein positives Ergebnis muss in Verbindung mit einer klinischen Beurteilung und anderer diagnostischer Verfahren gesehen werden. Die mit diesem Test erzielten Werte sind nur zur Unterstützung der Diagnose gedacht. Der Arzt muss die Ergebnisse in Verbindung mit der Patientenanamnese, den Befunden der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Verfahren interpretieren.
2. Erhöhte Anti-CCP Antikörper können bei Personen ohne Verdacht auf eine klinische Erkrankung gefunden werden. Auch können einige Personen mit RA Patienten können auch über keine nachweisbaren Antikörper verfügen. Anti-CCP Antikörperspiegel müssen nicht unbedingt mit dem Erkrankungsstatus korrelieren.
3. Aus diesem Grund sollte eine Behandlung nicht wegen eines positiven Ergebnisses begonnen oder verändert werden. Für alle Behandlungsentscheidungen klinische Befunde in die Betrachtung mit einbeziehen.
4. Es wurden keine CCP-Antikörperspiegel für die Überwachung der Progression und/oder Remission der RA festgelegt.
5. Für pädiatrische Proben wurden keine Leistungsmerkmale für diesen Test festgelegt erhoben. Der diagnostische Wert von Anti-CCP Antikörpern für die juvenile Arthritis wurde nicht bestimmt.

### Erwartete Ergebnisse

Der anti-CCP-Peptid- EIA misst Antikörper, welche spezifisch gegen zyklische synthetische Peptide mit Citrullin-Resten (Anti-CCP) gerichtet sind. Als semi-quantitativer Test ist der anti-CCP EIA unter Verwendung positiver Patientenplasma in relativen Einheiten kalibriert. Die Standardkurve umfasst den Bereich zwischen 25-3200 U/ml. Diese Werte wurden von Svar Life Science willkürlich gewählt, da es zur Angabe des Titers von Anti-CCP-Antikörpern keine international allgemein anerkannten Standardwerte gibt. Die Spezifität und Sensitivität wurde in vorhergehenden Studien mit 311 RA-Patienten, 942 nicht an RA erkrankten Patienten (einschließlich anderer Autoimmunerkrankungen sowie einen großen Teilbereich von Infektionskrankheiten) und 330 gesunden Personen als Kontrolle ermittelt. Die Sensitivität betrug 70 %. Die Spezifität betrug bei nicht an RA erkrankten Patienten 97 % und bei gesunden Personen 99 %. (15)



## LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

**Tabelle 1. Übereinstimmung in % des Immunoscan CCPlus®-Kits verglichen mit einem anderen CCP-ELISA.** Es wurden retrospektiv insgesamt 628 eingefrorene Proben getestet. 368 Proben kamen von RA-Patienten und 260 Proben von normalen Spendern einer Blutbank. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Alternativer ELISA				
Immunoscan CCPlus®		Positiv	Negativ	Gesamt
	Positiv	275	5	280
	Negativ	2	346	348
	Gesamt	277	351	628

Übereinstimmung Positive (%):  $275/277 = 99.3\%$       95% CI = 97.4–99.9%  
 Übereinstimmung Negative (%):  $346/351 = 98.6\%$       95% CI = 96.7–99.5%  
 Übereinstimmung, gesamt (%):  $621/628 = 98.9\%$       95% CI = 97.7–99.6%

Der 95 % Vertrauensbereich (CI) wurde mit der exakten Methode errechnet.

**Tabelle 2. Klinische Sensitivität und Spezifität.** Es wurden retrospektiv insgesamt 1180 eingefrorene Proben mit klinischen Eigenschaften getestet. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Kontroll- und Krankheitsgruppen	Gesamtmenge	Negativ < 25 U/ml	Positiv ≥ 25 U/ml
Blutspender	260	257	3
RA	399	90	309
WG	20	18	2
MP	20	20	0
SLE	66	64	2
Sjögren-Syndrom	13	13	0
IBD	98	95	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyreoiditis	20	20	0
Epstein-Barr-Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	6	6	0
Tuberkulose	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonellen	3	3	0
Chlamydien	5	4	1
Malaria	4	4	0
Borrelien	9	9	0
Syphilis	5	5	0
Infektiöse Endokarditis	3	3	0
Legionella	4	4	0
AST	3	3	0

<b>Schistosomiasis</b>	4	4	0
<b>Rubella</b>	5	5	0
<b>Chagas-Krankheit</b>	3	3	0
<b>Sklerodermie</b>	17	16	1
<b>Multiple Sklerose</b>	20	20	0
<b>IDDM</b>	20	20	0
<b>PM/DM</b>	20	20	0
<b>MCTD</b>	20	19	1
<b>Routineproben</b>	80	78	2

- RA = rheumatoide Arthritis  
 WG = Wegener-Granulomatose  
 MP = mikroskopische Polyangiitis  
 SLE = systemischer Lupus erythematodes  
 PM/DM = Polymyositis/Dermatomyositis  
 IBD = entzündliche Darmerkrankung  
 AST = Anti-Streptolysin-Test  
 IDDM = Insulin pflichtiger Diabetes mellitus  
 MCTD = Mischkollagenose

**Klinische Sensitivität:**

RA = 309/399 = 77,4 %                      95 % CI = 73,3 – 81,5 %

**Klinische Spezifität**

Blutspender	= 257/260 = 98,8%	95 % CI = 96,7 – 99,8%
WG	= 18/20 = 90,0%	95 % CI = 68,3 – 98,8%
MP	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100%
SLE	= 64/66 = 97,0%	95 % CI = 89,5 – 99,6%
Sjögren-Syndrom	= 13/13 = 100%	95 % CI = 75,3 – 100%
IBD	= 95/98 = 96,9%	95 % CI = 91,3 – 99,4%
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	95 % CI = 83,9 – 100%
Thyreoiditis	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100%
Infektionserkrankung	= 85/86 = 98,8%	95 % CI = 93,7 – 100%
Sklerodermie	= 16/17 = 94,1%	95 % CI = 71,3 – 99,8%
Multiple Sklerose	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100%
IDDM	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100%
MCTD	= 19/20 = 95,0%	95 % CI = 75,1 – 99,9%
Routineproben	= 78/80 = 97,5%	95 % CI = 91,3 – 99,7%

Der 95 % Vertrauensbereich (CI) wurde mit der exakten Methode errechnet.

**Tabelle 3.** Die Intra-Assay Präzision innerhalb des Tests wurde durch jeweils 8-maliges Testen von sechs verschiedenen Proben bestimmt.

	Hoch		Hoch		Hoch	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	2672	1,421	2685	1,432	1150	1,664
s	138	0,01	205	0,01	55,3	0,02
VK %	5,2	0,4	7,6	0,4	4,8	0,9
	Mittel		Niedrig		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	239	1,014	56	0,421	28	0,232
s	2,3	0,01	2,1	0,01	0,5	0,01
VK %	1,0	0,4	3,8	2,8	3,6	1,3

**Tabelle 4.** Die Inter-Assay Präzision zwischen den Tests wurde durch jeweils 8-maliges Testen von sechs verschiedenen Proben bestimmt. Es wurden Ergebnisse aus drei verschiedenen Läufen ermittelt.

	Hoch		Hoch		Hoch	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	2696	1,426	2600	1,422	1168	1,706
s	328	0,01	299	0,01	101,7	0,07
VK %	12,2	0,7	11,5	0,8	8,7	3,8
	Mittel		Niedrig		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	242	1,031	59	0,428	28	0,232
s	5,0	0,03	3,1	0,02	0,5	0,01
VK %	2,1	2,5	5,2	3,8	1,8	0,9

**Tabelle 5.** Die Schwankungen von Charge zu Charge wurde durch 8-maliges Testen von sechs verschiedenen Proben bestimmt. Es wurden Ergebnisse mit drei verschiedenen Chargen ermittelt.

	Hoch		Hoch		Hoch	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	2896	1,408	2870	1,408	1530	1,807
s	405	0,02	335	0,02	260,4	0,03
VK %	14,0	1,4	11,7	1,5	17,0	1,6
	Mittel		Niedrig		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	259	1,100	60	0,462	62	0,471
s	21,8	0,04	4,2	0,02	6,6	0,04
VK %	8,4	3,9	6,9	4,4	10,8	8,2

**Tabelle 6.** Die Wiederfindung der Verdünnung wurde durch Testen von 5 Reihenverdünnungen von 3 verschiedenen Proben bestimmt.

Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/ml)	Errechnet Konzentration (U/ml)	Verdünnungsbereinigte (%) Wiederfindung
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/ml)	Errechnet Konzentration (U/ml)	Verdünnungsbereinigte (%) Wiederfindung
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/ml)	Errechnet Konzentration (U/ml)	Verdünnungsbereinigte (%) Wiederfindung
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Zwei zusätzliche Proben wurden 1:50-1:1600 im linearen Bereich verdünnt. Die mittleren Konzentrationen betragen 164-6,0 U/ml bzw. 321-11 U/ml, mit einer um den Verdünnungsfaktor korrigierten Wiederfindung von 98-105 %.

#### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des Tests wurde durch 14-maliges Testen des Nullstandards mit 3 verschiedenen Chargen bestimmt. Die Nachweisgrenze von 1,6 U/ml wurde durch Feststellen des Mittelwerts plus 2-Standardabweichungen berechnet.

#### Interferenzstudie

Drei schwach positive Proben wurden mit Bilirubin (0,2 mg/ml), Hämoglobin (400 mg/dl), Lipid (15 mg/ml) und Rheumafaktor (200 IU/ml) versetzt. Die Daten weist darauf hin, dass die getesteten Konzentrationen die Anti-CCP Testergebnisse nicht beeinflussen.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER /. LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<table border="1"> <tr> <td><b>Ag</b></td> </tr> </table>	<b>Ag</b>	<p>Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antígeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plate). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).</p>		
<b>Ag</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>DIL</b></td> </tr> </table>	<b>DIL</b>	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
<b>DIL</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>BUF</b></td> <td><b>WASH</b></td> <td><b>20X</b></td> </tr> </table>	<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>	<p>Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger</p>
<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>		
<table border="1"> <tr> <td><b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b></td> <td><b>0.5M</b></td> </tr> </table>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>	<p>Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).</p>	
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CONJ</b></td> </tr> </table>	<b>CONJ</b>	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
<b>CONJ</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>SUBS</b></td> <td><b>TMB</b></td> </tr> </table>	<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>	<p>Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.</p>	
<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CAL</b></td> </tr> </table>	<b>CAL</b>	<p>Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.</p>		
<b>CAL</b>				



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

## **IMMUNOSCAN CCPlus®**

Solo per uso professionale

### **USO PREVISTO**

Il kit per test Immunoscan CCPlus® è un dosaggio immunoassorbente legato ad enzima (ELISA) per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di anticorpi IgG di peptidi citrullinati ciclici (CCP) nel siero umano.

Il dosaggio viene utilizzato per rilevare gli anticorpi in un singolo campione di siero. I risultati del dosaggio devono essere utilizzati come aiuto nella diagnosi dell'artrite reumatoide (AR) in combinazione con altri esami clinici e di laboratorio. L'analisi deve essere eseguita da professionisti di laboratorio esperti. "Per uso diagnostico in vitro".

### **SOMMARIO E SPIEGAZIONE**

L'artrite reumatoide (AR) è una delle più comuni malattie autoimmuni sistemiche. Colpisce l'1-2% della popolazione mondiale e la sua eziologia è sconosciuta. La diagnosi della AR si basa principalmente sulle sue manifestazioni cliniche. L'unico test sierologico usato nella routine è la determinazione del Fattore Reumatoide nel siero. I Fattori Reumatoidi (FR) sono anticorpi diretti contro le regioni costanti delle immunoglobuline di classe IgG. Questi anticorpi sono comunque anche presenti in percentuali relativamente alte di altre malattie autoimmuni, alcune infezioni e nel 15% di individui sani.

Anticorpi di natura più specifica sono stati osservati nel siero di pazienti affetti da AR (ved. (1) per un riepilogo). Anticorpi anti-fattore perinucleare (APF) sono stati descritti in circa il 50% di pazienti affetti da AR con una specificità superiore al 70% (2). Un certo numero di peptidi sintetici ciclici non legati alla filaggrina o altre proteine note sono stati identificati come riconosciuti da autoanticorpi del siero di pazienti con AR (3). Di conseguenza questi peptidi sono stati usati per la messa a punto di un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione di autoanticorpi specifici dell'AR (23). Studi clinici hanno dimostrato che l'ELISA ha dato risultati positivi in un numero significativo di sieri di pazienti affetti da AR conclamata, con una specificità eccellente verso gli individui di controllo affetti dalla malattia (3-8). È stato riscontrato che il dosaggio degli anticorpi anti-CCP ha valore sia diagnostico che prognostico in rapporto al coinvolgimento e al danno articolare rilevabile radiologicamente nella AR in fase precoce (7, 9-14). Gli anticorpi anti-CCP possono essere individuati con anni di anticipo rispetto allo sviluppo dei sintomi clinici (14). Uno studio ha mostrato come il 93% dei pazienti positivi per gli anticorpi anti-CCP, ma con artrite ancora indifferenziata, ha sviluppato in seguito l'AR. Questo dimostra il forte valore predittivo di questi anticorpi (14). Il kit Immunoscan CCPlus® proposto da Svar Life Science utilizza peptidi sintetici altamente purificati, contenenti residui di citrullina ed è di notevole valore nella diagnosi della AR. Questo kit anti-CCP contiene peptidi sintetici di alta qualità, selezionati in base alle loro superiori prestazioni nella determinazione degli autoanticorpi dell'AR (8-14).

## DESCRIZIONE DEL METODO

Il kit anti-CCP è basato sulla metodologia ELISA. Utilizza micropiastre sensibilizzate con peptidi sintetici citrullinati (antigene). Il siero diluito del paziente viene incubato nei pozzetti. Se gli anticorpi specifici sono presenti si legano all'antigene dei pozzetti. I pozzetti vengono quindi lavati per eliminare gli anticorpi non legati e gli anticorpi legati vengono rilevati aggiungendo Ig anti-IgG umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP). A questo passaggio si fa seguire un secondo lavaggio ed un'incubazione con il cromogeno / substrato. La presenza di anticorpi si rileva come sviluppo di colore, proporzionale alla quantità di anticorpo legato e misurato mediante uno spettrofotometro.

## PRECAUZIONI

1. La soluzione di stop contiene acido solforico 0,5 M. Evitare ogni contatto con la pelle.
2. Evitare ogni contatto dei materiali biologici con la pelle e le mucose.
3. Non pipettare con la bocca.
4. I controlli e i calibratori contengono plasma umano. Anche se i risultati sono negativi per HIV 1+2, HCV, HbsAg e HIV-1 Ag, devono essere trattati come potenzialmente infetti. - I Centers for Disease Control and Prevention (centri per il controllo e la prevenzione delle malattie) e i National Institutes of Health (istituti nazionali per la salute) consigliano di trattare gli agenti potenzialmente infettivi a livello di biosicurezza 2.
5. La TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) è tossica se inalata, inghiottita o a contatto con la pelle. Manipolare con cautela.
6. La soluzione di coniugato contiene 5-cloro-2-metil-4-isotiazol-3-one [EC n. 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [CE n. 220-239-6] (3:1) Può causare una reazione allergica cutanea.
7. Non usare i componenti dopo la data di scadenza e non mescolare reattivi provenienti da lotti diversi.
8. Ogni pozzetto ha la funzione di una cuvetta per lettura fotometrica: quindi non toccare la superficie inferiore dei pozzetti ed evitare contaminazioni.
9. I risultati ottimali si ottengono seguendo scrupolosamente questo protocollo. È necessario pipettare e lavare con cura per ottenere la massima precisione ed accuratezza.
10. Calibratori, controlli e tampone di diluizione contengono 0,09% di sodio azide. È stato riscontrato che la sodio azide può reagire con tubature di rame e piombo e formare azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, sciacquare gli scarichi con acqua per ridurre al minimo l'accumulo di composti di azidi metalliche.
11. Per uso diagnostico in vitro.

Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Svar Life Science.

### Coniugato:



### ATTENZIONE

Contiene: Miscela di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

P261 Evitare di respirare gli aerosol.

P280 Indossare guanti.

P333 + P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

## **CONTENUTO DEL KIT**

Contenuto del kit:

- 1 micropiastra sigillata sensibilizzata con il peptide (96 pozzetti). Pronta per l'uso.
- 5 flaconi di calibratori (plasma umano positivo) (1,2 mL). Pronti per l'uso. Blu
- 1 flacone di controllo di riferimento (1,2 mL). Pronti per l'uso. Blu
- 1 flacone di controllo positivo (plasma umano) (1,2 mL). Pronti per l'uso. Blu
- 1 flacone di controllo negativo (plasma umano) (1,2 mL). Pronti per l'uso. Blu
- 1 flacone di coniugato (anticorpi anti-IgG umane coniugati con HRP) (15 mL). Pronto per l'uso. Rosso
- 1 flacone di cromogeno/substrato TMB (15 mL). Pronta per l'uso.
- 2 flaconi di tampone di diluizione (35 mL). Pronti per l'uso. Blu
- 1 flacone di soluzione di stop (15 mL). Pronta per l'uso.
- 2 flaconi di tampone di lavaggio (35 mL). Concentrato 20x.

## **MATERIALI O ACCESSORI NECESSARI MA NON INCLUSI NEL KIT**

- Lettore di micropiastre con filtro 450 nm.
- Lavatore automatico di piastre per microtitolazione.

## **TRATTAMENTO E CONSERVAZIONE**

- Conservare il kit tra 2 e 8° C al riparo dalla luce.
- Non usare i reattivi oltre la data di scadenza.
- Si consiglia di aprire la confezione sigillata della piastra solo immediatamente prima dell'uso.
- Il cromogeno non deve essere esposto a luce diretta.

Se per il primo calibratore A (3200 U/mL) E450 nm  $<0,9$ , viene osservata una reazione del colore debole oppure assente, il risultato del test non è valido.

## **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Questo dosaggio si può effettuare su campioni di siero. Prelevare i campioni di sangue intero e lasciar coagulare. Conservare i campioni per un massimo di 48 ore a 4-8° C o a -20° C per periodi di tempo più lunghi. Diluire il campione del paziente 1:50. (miscelare 10  $\mu$ L di siero con 490  $\mu$ L di tampone di diluizione in una provetta pulita). Usarne 100  $\mu$ L per il test. (vedi la procedura di analisi).

## **PREPARAZIONE DEI REATTIVI**

Prima di iniziare il dosaggio, i reattivi e la micropiastra devono essere portati a temperatura ambiente e miscelati accuratamente. Non aprire il sacchetto della micropiastra prima che abbia raggiunto temperatura ambiente.

Mescolare bene i reagenti prima dell'uso.

I reattivi contenuti nel kit permettono di effettuare 96 dosaggi (compreso il dosaggio dei calibratori e dei controlli).

I calibratori e i controlli devono essere dosati in duplicato.

I tamponi concentrati possono contenere dei cristalli, che devono essere sciolti a temperatura ambiente (18-25° C).

1. Dopo l'uso, conservare tutti i reattivi a 2-8° C lontano dalla luce.
2. Micropiastra sensibilizzata con il peptide. Pronta per l'uso.  
Riporre le pozzetti in eccesso sigillate nell'apposito sacchetto e con l'essiccante; conservare a 2-8°C.
3. Tampone di lavaggio (35 mL): è concentrato 20x. Diluire prima dell'uso. Aggiungere 35 mL a 665 mL di acqua distillata e miscelare accuratamente.
4. Substrato TMB (15 mL). Pronto all'uso. Conservare al buio.
5. Tampone di diluizione (35 mL). Pronta per l'uso.
6. Coniugato (15 mL). Pronta per l'uso.
7. Soluzione di stop (15 mL). Pronta per l'uso.
8. Calibratori A-E (1,2 mL). Cinque plasmas umani prediluito, con valori espressi in unità arbitrarie.  
Il calibratore A contiene 3200 U/mL, il calibratore B 800 U/mL, il calibratore C 200 U/mL, il calibratore D 50 U/mL ed il calibratore E 25 U/mL. Pronti per l'uso.
9. Controllo di riferimento (1,2 mL). Plasma umano prediluito, 25 U/ml, pronto per l'uso.
10. Controllo negativo (1,2 mL). Plasma umano prediluito, pronto per l'uso.
11. Controllo positivo ( 1,2 mL). Plasma umano diluito, pronto per l'uso.

## PROCEDURA DI ANALISI

### Protocollo di lavaggio

La frazione non legata deve essere rimossa dopo ogni incubazione con un appropriato lavaggio. Ogni lavaggio deve essere effettuato con molta cura per ottenere buoni risultati. Può essere effettuato sia manualmente che con un'apparecchiatura automatica, nei modi seguenti:

#### Lavaggio manuale

1. Vuotare il contenuto dei pozzetti capovolgendo la piastra e scuoterla verticalmente energicamente per svuotarla completamente.
2. Riempire fino all'orlo i pozzetti con tampone di lavaggio (300 µL).
3. Questo ciclo (punti 1 e 2) va ripetuto 3 volte.
4. Capovolgere la piastra e scuoterla verticalmente energicamente per svuotarla.
5. Appoggiare la piastra capovolta su carta assorbente e battere leggermente per eliminare i residui di liquido.
6. Proseguire immediatamente con l'aggiunta del reattivo successivo.

#### Lavaggio con apparecchiatura automatica

Se si usa un lavatore automatico, controllare che il liquido sia aspirato accuratamente da tutti i pozzetti e che il tampone di lavaggio sia dispensato correttamente in modo da riempire ogni volta del tutto i pozzetti. Il lavatore deve effettuare 3 cicli in automatico. Proseguire immediatamente con l'aggiunta del reattivo successivo.

**Protocollo operativo**

Preparare i campioni ed i reattivi secondo le procedure indicate (per es. diluire i campioni 1:50 con tampone di diluizione). La micropiastra è pronta all'uso, non deve essere lavata! I campioni dei pazienti possono essere dosati in singolo o in duplicato.

**Protocollo semi-quantitativo**

1. Distribuire in doppio 100 µL di tampone di diluizione (pozzetti A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: bianco).
2. Distribuire in doppio 100 µL di ogni calibratore (pozzetti B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> - F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).
3. Distribuire in doppio 100 µL di controllo negativo e positivo (pozzetti G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>).
4. Distribuire 100 µL di sieri diluiti dei pazienti nei restanti pozzetti. Tempo massimo di esecuzione per i primi 4 passaggi: 15 minuti.
5. Incubare per 60 min. ± 5 min. a temperatura ambiente (18-25° C).
6. Eliminare il contenuto dei pozzetti e lavare la micropiastra secondo il protocollo indicato al paragrafo precedente.
7. Distribuire 100 µL di coniugato in tutti i pozzetti.
8. Incubare per 30 min. ± 5 min. a temperatura ambiente (18-25° C).
9. Eliminare il contenuto dei pozzetti e lavare la micropiastra secondo il protocollo indicato al paragrafo precedente.
10. Distribuire 100 µL di substrato in tutti i pozzetti.
11. Incubare per 30 min. ± 5 min. a temperatura ambiente (18-25° C).
12. Aggiungere 100 µL di soluzione di stop in tutti i pozzetti.
13. Misurare entro 10 min. l'assorbanza di ciascun pozzetto a 450 nm.

**Protocollo qualitativo**

Eeguire come descritto per il protocollo semi-quantitativo sostituendo il set di calibratori (A-E) con il controllo di riferimento.

**CONTROLLO DI QUALITÀ**

Per il protocollo semi-quantitativo, il calibratore A (3200 unità/mL) deve avere un'assorbanza  $\geq 0,9$  O.D. Calcolare la media dei duplicati per ogni calibratore e controllo. Il valore dei controlli deve essere calcolato secondo quanto definito al capitolo "Calcolo dei risultati". Consultare l'etichetta del controllo positivo per indicazioni sull'intervallo valido dei valori del controllo positivo. Il controllo negativo deve essere  $<25$  U/mL.

Per il protocollo qualitativo, consultare l'etichetta del controllo positivo per indicazioni sul rapporto valido tra controllo positivo e controllo di riferimento.

Il rapporto tra controllo negativo e controllo di riferimento deve essere  $<0,95$ .

Se uno dei valori non rientra nel rispettivo intervallo, il test deve essere considerato non valido e deve essere ripetuto.

**CALCOLO DEI RISULTATI****Protocollo semi-quantitativo**

Sottrarre il valore medio dell'assorbanza dei pozzetti A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> dall'assorbanza dei pozzetti contenenti i calibratori, i controlli ed i campioni. I valori di assorbanza dei 5 calibratori (valori medi dei duplicati) possono essere riportati manualmente sull'asse delle Y (scala lineare), in funzione delle unità riportate sull'asse delle X (scala logaritmica). La curva standard deve risultare lineare, nell'intervallo compreso tra 25 e 2692 U/mL. Il titolo anticorpale è espresso in unità che vengono determinate interpolandone il valore sulla curva standard in funzione dell'assorbanza netta media del campione in esame. In alternativa si può utilizzare per il calcolo un programma con interpolazione a 4 parametri.

Ai 5 calibratori (A-E) sono stati attribuiti dei valori rispettivamente di 3200 U/mL (A), 800 U/mL (B), 200 U/mL (C), 50 U/mL (D) e 25 U/mL (E). Tali valori sono stati scelti in modo arbitrario da Svar Life Science, in mancanza di uno standard internazionale riconosciuto per l'espressione del titolo degli anticorpi anti-CCP. I campioni che risultano più alti dello standard A (3200 U/mL) devono essere ulteriormente diluiti e dosati nuovamente. Al momento non ci sono prove che il titolo anticorpale sia correlato alla gravità della malattia. Anticorpi di pazienti diversi possono avere diverse affinità e quindi si misura l'immunoreattività anticorpale piuttosto che la concentrazione.

La curva standard non può essere usata per valori di assorbanza inferiori allo standard E (25 U/mL). I valori devono essere indicati come <25 U/mL.

### Protocollo qualitativo

Sottrarre il valore medio dell'assorbanza dei pozzetti  $A_1$  e  $A_2$  dall'assorbanza dei pozzetti contenenti i controlli ed i campioni.

Calcolare il rapporto fra l'assorbanza (OD: Densità Ottica) del controllo di riferimento e il campione in analisi.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{OD del controllo } \bullet \text{ del campione}}{\text{OD del controllo di riferimento}}$$

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### Protocollo semi-quantitativo

I campioni con valori inferiori a 25 U/mL sono considerati negativi. I campioni  $\geq$  con valori superiori o uguali a 25 U/mL sono considerati positivi.

### Protocollo qualitativo

Gli utilizzatori devono calcolare un valore cut-off compreso fra il controllo positivo e il controllo negativo che sia specifico per la popolazione in esame. I risultati ottenuti sulla popolazione testata da Svar Life Science hanno indicato i seguenti cut-off:

Rapporto fra le assorbanze	Interpretazione del risultato
< 0,95	Negativo
da $\geq$ 0,95 a $\leq$ 1,0	Valore limite - si raccomanda di ripetere il saggio
> 1,0	Positivo

### Limitazioni

1. Un risultato positivo deve essere utilizzato in combinazione con le procedure di valutazione clinica e altri procedimenti diagnostici. I valori ottenuti con questo dosaggio devono essere considerati solo come aiuto nella diagnosi. Ogni medico deve interpretare i risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami fisici e di altri procedimenti diagnostici.
2. Livelli di anticorpi anti-CCP elevati possono essere riscontrati in soggetti senza alcuna evidenza di malattia clinica. Inoltre è possibile che alcuni soggetti affetti da AR possiedano anticorpi non rilevabili. I livelli di anticorpi anti-CCP non sono necessariamente correlati allo stato di malattia.
3. Poiché i livelli di anticorpi anti-CCP non sono necessariamente correlati allo stato di malattia, non avviare né modificare il trattamento sulla base di un risultato positivo. È

necessario prendere in considerazione gli esami clinici per tutte le decisioni relative al trattamento.

4. Non è stato stabilito il monitoraggio dei livelli di anticorpi anti-CCP per la progressione e/o la remissione della AR.
5. Non sono state stabilite le prestazioni di questo dosaggio per i campioni pediatrici. Il valore diagnostico degli anticorpi anti-CCP per l'artrite giovanile non è stato determinato.

### Risultati previsti

Il dosaggio EIA anti-CCP misura gli anticorpi contro i peptidi sintetici con residui di citrullina (anti-CCP). È stato calibrato nel dosaggio semi-quantitativo in unità arbitrarie utilizzando un pool di plasma positivi. La curva standard va da 25 a 3200 U/mL. Tali valori sono stati scelti arbitrariamente da Svar Life Science, in mancanza di uno standard internazionalmente riconosciuto per l'espressione del titolo di anticorpi anti-CCP. La specificità e la sensibilità diagnostiche sono state valutate in studi precedenti con 311 pazienti affetti da RA, 942 affetti da malattie diverse dalla RA (incluse altre malattie autoimmuni e un'ampia gamma di malattie infettive) e 330 controlli apparentemente sani. La sensibilità è risultata dell'70% e la specificità del 97% nei pazienti affetti da malattie diverse dalla RA e del 99% nei soggetti sani. (15)

## CARATTERISTICHE METODOLOGICHE

**Tabella 1. Tasso di concordanza del kit CCPlus® Immunoscan rispetto ad un ELISA CCP alternativo.** In totale sono stati dosati 628 campioni di siero retrospettivi congelati. 368 campioni sono stati prelevati da pazienti affetti da AR e 260 campioni da una banca del sangue. La seguente tabella riepiloga i risultati ottenuti.

ELISA alternativo				
Kit CCPlus® Immunoscan		Positivo	Negativo	Totale
	Positivo	275	5	280
	Negativo	2	346	348
	Totale	277	351	628

Tasso di concordanza positiva:  $275/277 = 99.3\%$       95% CI = 97.4–99.9%  
 Tasso di concordanza negativa:  $346/351 = 98.6\%$       95% CI = 96.7–99.5%  
 Tasso di concordanza complessiva:  $621/628 = 98.9\%$       95% CI = 97.7–99.6%

L'intervallo di confidenza del 95% (CI) è stato calcolato utilizzando il metodo esatto.



**Tabella 2. Sensibilità e specificità clinica.** In totale sono stati dosati 1180 campioni di siero retrospettivi congelati con caratterizzazione clinica. La seguente tabella riepiloga i risultati ottenuti.

Gruppi di controllo e di malattia	Numero totale	Negativo < 25 U/mL	Positivo ≥ 25 U/mL
Donatori di sangue	260	257	3
RA	399	90	309
WG	20	18	2
MP	20	20	0
SLE	66	64	2
Sjögren	13	13	0
IBD	98	95	3
Osteoartrite	21	21	0
Tiroidite	20	20	0
Virus di Epstein Barr	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Micoplasma	9	9	0
Toxoplasma	6	6	0
Tubercolosi	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonella	3	3	0
Clamidia	5	4	1
Malaria	4	4	0
Borrelia	9	9	0
Sifilide	5	5	0
Endocardite infettiva	3	3	0
Legionella	4	4	0
AST	3	3	0
SCHISTOSOMIASI	4	4	0
Rosolia	5	5	0
Sindrome di Chagas	3	3	0
Sclerodermia	17	16	1
Sclerosi multipla	20	20	0
IDDM	20	20	0
PM/DM	20	20	0
MCTD	20	19	1
Campioni di routine	80	78	2

- RA = artrite reumatoide.  
 WG = granulomatosi di Wegener  
 MP = poliangoite microscopica  
 SLE = lupus eritematoso sistemico  
 PM/DM = Polimiosite/dermatomiosite  
 IBD = sindrome dell'intestino irritabile  
 AST = test antistreptolisina  
 IDDM = diabete mellito insulina-dipendente  
 MCTD = collagenopatia

#### Sensibilità clinica

RA = 309/399 = 77,4 %

95% CI = 73,3 - 81,5 %

**Specificità clinica**

Donatori di sangue	= 257/260 = 98,8%	95% CI = 96,7 - 99,8%
WG	= 18/20 = 90,0%	95% CI = 68,3 - 98,8%
MP	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
SLE	= 64/66 = 97,0 %	95% CI = 89,5 - 99,6 %
Sjogren	= 13/13 = 100 %	95% CI = 75,3 - 100 %
IBD	= 95/98 = 96,9%	95% CI = 91,3 - 99,4%
Osteoartrite	= 21/21 = 100%	95% CI = 83,9 - 100%
Tiroidite	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
Malattia infettiva	= 85/86 = 98,8%	95% CI = 93,7 - 100%
Sclerodermia	= 16/17 = 94,1%	95% CI = 71,3 - 99,8%
Sclerosi multipla	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
IDDM	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
MCTD	= 19/20 = 95,0%	95% CI = 75,1 - 99,9%
Campioni di routine	= 78/80 = 97,5 %	95% CI = 91,3 - 99,7 %

L'intervallo di confidenza del 95% (CI) è stato calcolato utilizzando il metodo esatto.

**Tabella 3. La precisione intra-dosaggio** è stata determinata testando sei diversi campioni, ognuno per otto volte.

	Elevata		Elevata		Elevata	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media.	2672	1,421	2685	1,432	1150	1,664
S.D.	138	0,01	205	0,01	55,3	0,02
% C.V.	5,2	0,4	7,6	0,4	4,8	0,9
	Media		Bassa		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media	239	1,014	56	0,421	28	0,232
S.D.	2,3	0,01	2,1	0,01	0,5	0,01
%C.V.	1,0	0,4	3,8	2,8	3,6	1,3

**Tabella 4. La precisione inter-dosaggio** è stata determinata testando sei campioni diversi, ognuno per otto volte. Sono stati ricavati i risultati per tre diverse serie.

	Elevata		Elevata		Elevata	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media.	2696	1,426	2600	1,422	1168	1,706
S.D.	328	0,01	299	0,01	101,7	0,07
% C.V.	12,2	0,7	11,5	0,8	8,7	3,8
	Media		Bassa		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media	242	1,031	59	0,428	28	0,232
S.D.	5,0	0,03	3,1	0,02	0,5	0,01
%C.V.	2,1	2,5	5,2	3,8	1,8	0,9

**Tabella 5. La variazione da lotto a lotto** è stata determinata testando sei diversi campioni, ognuno per otto volte. Sono stati ricavati i risultati per tre diversi lotti.

	Elevata		Elevata		Elevata	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media.	2896	1,408	2870	1,408	1530	1,807
S.D.	405	0,02	335	0,02	260,4	0,03
% C.V.	14,0	1,4	11,7	1,5	17,0	1,6
	Media		Bassa		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media	259	1,100	60	0,462	62	0,471
S.D.	21,8	0,04	4,2	0,02	6,6	0,04
% C.V.	8,4	3,9	6,9	4,4	10,8	8,2

**Tabella 6. Il recupero della diluizione** è stato determinato testando cinque diluizioni seriali per tre campioni diversi.

Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/ml)	Concentrazione calcolata (U/ml)	Recupero % diluizione corretto
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/ml)	Concentrazione calcolata (U/ml)	Recupero % diluizione corretto
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/ml)	Concentrazione calcolata (U/ml)	Recupero % diluizione corretto
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Due campioni aggiuntivi sono stati diluiti 1/50 - 1/1600 nel range lineare. Le concentrazioni medie sono state, rispettivamente, di 164 - 6.0 U/ml e 321 - 11 U/ml, con un recupero corretto mediante diluizione compreso tra il 98 e il 105%.

**Limite di rilevazione**

Il limite di rilevazione del dosaggio è stato determinato analizzando lo standard zero per 14 volte con tre lotti diversi. Il limite di rilevazione di 1,6 U/mL è stato calcolato addizionando due deviazioni standard al valore medio ottenuto.

**Studio delle interferenze**

Tre campioni lievemente positivi sono stati arricchiti con bilirubina a 0,2 mg/mL, emoglobina a 400 mg/dl, lipide a 15 mg/mL e fattore reumatoide a 200 IU/mL. I dati indicano che le concentrazioni dosate non interferiscono con i risultati anti-CCP.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER /. LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
Arthritis Rheum. 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
Ann. Rheum. Dis. 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
Ann. Rheum. Dis. 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
Arthritis Rheum. 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partinummer. Lot number. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<table border="1"> <tr> <td><b>Ag</b></td> </tr> </table>	<b>Ag</b>	<p>Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antígeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).</p>		
<b>Ag</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>DIL</b></td> </tr> </table>	<b>DIL</b>	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
<b>DIL</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>BUF</b></td> <td><b>WASH</b></td> <td><b>20X</b></td> </tr> </table>	<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>	<p>Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger</p>
<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>		
<table border="1"> <tr> <td><b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b></td> <td><b>0.5M</b></td> </tr> </table>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>	<p>Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).</p>	
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CONJ</b></td> </tr> </table>	<b>CONJ</b>	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
<b>CONJ</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>SUBS</b></td> <td><b>TMB</b></td> </tr> </table>	<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>	<p>Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.</p>	
<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CAL</b></td> </tr> </table>	<b>CAL</b>	<p>Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.</p>		
<b>CAL</b>				



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

## **IMMUNOSCAN CCPlus®**

Apenas para utilização profissional

### **UTILIZAÇÃO**

O kit de teste Immunoscan CCPlus® é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG anti-péptidos citrulinados cíclicos (CCP) em soros humanos.

O ensaio é utilizado para detectar anticorpos em amostras únicas de soro. Os resultados do ensaio são utilizados como auxiliares no diagnóstico de Artrite reumatóide (AR) em conjugação com outros resultados clínicos e de laboratório. Esta análise deve ser efectuada por profissionais de laboratório com a devida formação. "Para utilizar em diagnósticos *in vitro*".

### **SUMÁRIO EXPLICAÇÃO**

A Artrite Reumatóide (AR) é uma das doenças autoimunes sistémicas mais comuns. Desconhece-se a etiologia da doença, que afecta até 1 a 2% da população do mundo. O diagnóstico da AR depende primeiramente das manifestações clínicas da doença. O único teste serológico utilizado por rotina é a determinação da presença de factores reumatóides (FR) no soro. Os FR são anticorpos dirigidos contra a região constante das imunoglobulinas da classe IgG. Porém estes anticorpos também se encontram presentes em percentagens relativamente elevadas noutras doenças e infecções auto-imunes, e em até 15% da população saudável.

Também se descobriram anticorpos de natureza mais específica no soro de doentes com AR (a nota (1) contém um resumo destes casos). Verificou-se a presença de anticorpos anti-factor perinuclear (AFP) em cerca de 50% dos doentes a sofrer de AR com uma especificidade de mais de 70% (2). Descreveu-se uma série de péptidos sintéticos cíclicos não relacionados com a filagrina ou com outras proteínas conhecidas, os quais são reconhecidos especificamente através dos auto-anticorpos presentes no soro de doentes que sofrem de AR (3). Estes péptidos foram subsequentemente utilizados num método EIA para a detecção de auto-anticorpos específicos da AR (3). Certos estudos de avaliação clínica demonstraram que o EIA fornecia resultados positivos num número significativo de soros de doentes com AR bem definidos, com uma especificidade excelente em relação aos controlos de doenças (3-8). Descobriu-se um valor diagnóstico e prognóstico para a medição dos anticorpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-PCC) em relação ao estado das articulações e danos radiológicos na fase precoce da RA (7, 9-14). Podem detectar-se os anticorpos anti-PCC anos antes do desenvolvimento de sintomas clínicos da doença (14). Um estudo prospectivo sobre um grupo de doentes demonstrou que 93% dos doentes positivos a anti-PCC com artrite indiferenciada acabaram por desenvolver artrite reumatóide, o que demonstra o grande valor de previsão positiva destes anticorpos (14). O ensaio Immunoscan CCPlus® fabricado pela Svar Life Science baseia-se em péptidos sintéticos altamente purificados que contêm resíduos de citrulina, e é de grande utilidade para o diagnóstico da AR. Este kit anti-PCC contém péptidos sintéticos melhorados, seleccionados devido a uma performance de qualidade superior na detecção de auto-anticorpos da AR (8-14).

## PRINCÍPIO DO EIA PÉPTIDO AR

O kit de anticorpos anti-PCC baseia-se num método ELISA. O teste utiliza uma placa de micropoços de titulação revestidos com péptidos sintéticos citrulinados (antigénio). Aplica-se o soro do doente aos poços, e efectua-se a sua incubação. Caso se encontrem presentes anticorpos específicos, os mesmos ligar-se-ão ao antigénio nos poços. O material não ligado é eliminado na lavagem, e todos os anticorpos ligados são detectados através da adição de um anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase de rábano (HRP), seguindo-se uma segunda etapa de lavagem e uma incubação com substrato.

A presença de anticorpos em reacção resultará no desenvolvimento de uma cor cuja intensidade é proporcional à quantidade de anticorpo ligado. A reacção é medida com um fotómetro.

## PRECAUÇÕES

1. A solução de paragem contém ácido sulfúrico a 0,5 M. Não permitir que o reagente entre em contacto com a pele.
2. Evitar o contacto de todos os materiais biológicos com a pele e membranas mucosas.
3. Não pipetar com a boca.
4. Os controlos e calibradores contém plasma humano. Embora tenham sido testados e confirmados negativos a HIV 1+2, VHC, AgHbs e Ag HIV-1, este material deve ser tratado como sendo potencialmente infeccioso. - Os Centros de Controlo e Prevenção de Doenças e os Institutos Nacionais de Saúde indicaram que os agentes potencialmente infecciosos devem ser manipulados ao nível 2 de biossegurança.
5. A TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) é tóxica por inalação, em contacto com a pele e em caso de ingestão. O substrato deve ser manipulado com cuidado.
6. A Solução Conjugada contém 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [EC no. 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no. 220-239-6] (3:1) Pode causar uma reacção alérgica na pele.
7. Não utilizar os reagentes para além do seu prazo de validade e não misturar os componentes de lotes diferentes.
8. Cada poço é usado como cuvette óptica. Por conseguinte, não se deve tocar na superfície do fundo dos poços, nem se deve sujar ou danificar os mesmos.
9. A aderência cuidadosa a este protocolo assegura a obtenção de resultados optimizados.  
É necessário realizar cuidadosamente as etapas de pipetagem e lavagem para se poderem conservar os níveis de precisão e exactidão.
10. Os calibradores, controlos e tampão de diluente contém 0,09% de azida sódica. Foi reportado que a azida sódica pode reagir com chumbo e cobre nas canalizações e formar compostos explosivos. Eliminar com água abundante para minimizar os compostos de azida de metal.
11. Para utilização em diagnóstico in vitro.

As fichas dos dados de segurança do material relativas a todos os componentes incluídos neste kit estão disponíveis sob pedido junto da Svar Life Science.

**Solução conjugado:****Atenção**

Contém: A reacção de massa: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Pode provocar uma reacção alérgica cutânea

P261 Evitar respirar aerossóis.

P280 Usar luvas de protecção.

P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

**CONTEÚDO DO KIT**

Conteúdo do kit-EIA:

- 1 placa de microtitulação de PCC revestida com péptido, fechada (96 poços). Pronto a utilizar.
- 5 frascos com calibradores (pool de plasma humano positivo) (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com plasma humano controlo de referência (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com plasma humano controlo positivo (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com plasma humano controlo negativo (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com solução conjugado (peroxidase conjugada com anticorpos de IgG anti-humana) (15 ml). Pronto a utilizar (vermelho).
- 1 frasco com solução de paragem (15ml). Pronto a utilizar.
- 2 frascos com tampão de diluição (35 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com solução de paragem (15ml). Pronto a utilizar.
- 2 frascos com tampão de lavagem (35ml) concentrado 20x.

**MATERIAIS OU EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm.
- Lavador de placas de microtitulação automático.

**MANIPULAÇÃO E ARMAZENAMENTO**

- Armazenar o kit em local escuro, entre + 2° C e 8° C.
- Não utilizar os reagentes para além do seu prazo de validade.
- Convém desempacotar a placa de microtitulação fechada imediatamente antes da sua utilização.
- Não permitir nenhuma acção directa da luz sobre a solução de cromogénio.

Se for observada uma reacção de cor fraca ou não existente do primeiro calibrador, 'A' (3200 U/ml) E450 nm <0,9, o resultado do teste é inválido.

## PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Este teste é efectuado em amostras de soro. Nas amostras séricas, colher amostras de sangue venoso e deixar coagular completamente. Armazenar as amostras durante um máximo de 48 horas, a uma temperatura de 4 a 8° C. Em caso de armazenamento prolongado, congelar a -20° C. Diluir a amostra do doente a 1:50. (Misturar 10 µl da amostra num tubo com 490 µl de tampão de diluição. Empregar 100 µl no teste. (Consultar o protocolo do ensaio).

## PREPARAÇÃO E MANIPULAÇÃO DOS REAGENTES

Antes de se iniciar o teste devem colocar-se a placa microtitulada e os reagentes à temperatura ambiente. Não abrir o vedante da placa até que a mesma tenha alcançado a temperatura ambiente.

Misturar bem os reagentes antes de os utilizar.

Os reagentes incluídos no kit são suficientes para a realização de 96 análises (incluindo as análises do calibrador e de controlo).

Os controlos e calibradores são analisados em duplicado.

Os concentrados de tampão podem conter cristais de sal, os quais devem ser dissolvidos a temperatura ambiente (18-25° C).

1. Armazenar todos os reagentes imediatamente a seguir à sua utilização, colocando-os em local escuro a uma temperatura de 2 a 8° C.
2. Placa de microtitulação de PCC revestida com péptido. Pronto a utilizar. Vedar novamente as poços não utilizadas em folha, com dessecante, e armazenar a 2-8° C.
3. Tampão de lavagem (35ml). O tampão de lavagem está concentrado 20x. Preparar diluições antes de as utilizar. Adicionar 35 ml de tampão de lavagem a 665 ml de água destilada e misturar bem.
4. Solução substrato TMB (15ml). Pronta a utilizar. Manter em local escuro.
5. Tampão de diluição (35ml). Pronto a utilizar.
6. Solução de paragem (15ml). Pronto a utilizar.
7. Solução de paragem (15ml). Pronto a utilizar.
8. Calibrador A-E (1,2 ml). Cinco calibradores de plasma humano positivos, diluídos, com os valores expressos em unidades relativas.  
O calibrador A contém 3200 U/ml, o calibrador B contém 800 U/ml, o calibrador C tem 200 U/ml, o calibrador D tem 50 U/ml e o calibrador E tem 25 U/ml. Os calibradores estão prontos a ser utilizados.
9. Controlo de referência (1,2 ml). Plasma humano diluído, 25 U/ml, pronto a ser utilizado.
10. Controlo negativo (1,2 ml). Plasma humano diluído, pronto a ser utilizado.
11. Controlo positivo (1,2 ml). Plasma humano diluído, pronto a utilizar.

## PROCEDIMENTO DO ENSAIO

### Protocolo de lavagem

No ensaio EIA, os componentes não ligados têm de ser eficazmente removidos entre cada etapa de incubação imunológica. Para tal, deve-se efectuar a devida lavagem. Convém salientar que cada etapa de lavagem deve ser feita com todo o cuidado, para garantir bons resultados. A lavagem pode ser efectuada manualmente ou com equipamento de lavagem automática de placas, da seguinte forma:

#### Lavagem manual

1. Virar cada placa de microtitulação ao contrário, para esvaziar o conteúdo de cada poço.  
A seguir, sacudir as placas com um movimento vertical curto e firme.
2. Encher todos os poços com 300 µl de tampão de lavagem.
3. Este ciclo de lavagem (1 e 2) deve ser efectuado 3 vezes.
4. Virar a placa ao contrário e esvaziar os poços com um movimento vertical curto e firme.
5. Colocar a placa invertida em cima de toalhas de papel absorvente, dando-lhe pequenas pancadas para remover os resíduos de solução que permaneçam nos poços.
6. Passar imediatamente à etapa de adição do reagente seguinte.

#### Lavagem com equipamento de lavagem automática de placas de microtitulação

Sempre que se utilize equipamento automático para a lavagem de placas, verificar se todos os poços podem ser completamente aspirados, e se o tampão de lavagem se encontra correctamente distribuído, encontrando-se ao nível do rebordo de cada poço durante cada ciclo de lavagem. A máquina de lavar deve ser programada de forma a executar três ciclos de lavagem. Passar imediatamente à etapa de adição do reagente seguinte.

#### Protocolo do ensaio

Preparar as amostras de acordo com a secção de preparação da amostra (ou seja, diluir 1:50 em tampão de diluição) e os reagentes de acordo com as instruções de preparação e manipulação dos reagentes. A placa de microtitulação fica assim pronta para ser utilizada, portanto não lavar a placa! As amostras dos doentes podem ser testadas individualmente ou em duplicado.

#### Protocolo semi-quantitativo

1. Pipetar 100 µl de tampão de diluição em duplicado (poços A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: a branco).
2. Pipetar 100 µl de cada calibrador em duplicado (poços B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).
3. Pipetar 100 µl dos controlos negativo e positivo em duplicado (poços G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>).
4. Pipetar 100 µl de amostras de doentes diluídas para os respectivos poços da placa de microtitulação. O processo de pipetagem das etapas 1 a 4 não deve demorar um período total de mais de 15 minutos.
5. Incubar durante 60 min. ± 5 min. à temperatura ambiente (18 a 25° C).
6. Descartar a solução da placa de microtitulação e lavar, em conformidade com o protocolo de lavagem.
7. Pipetar 100 µl de solução conjugado para cada poço.
8. Incubar durante 30 min. ± 5 min. à temperatura ambiente (18 a 25° C).
9. Descartar a solução de conjugado da placa de microtitulação e lavar, em conformidade com o protocolo de lavagem.
10. Pipetar 100 µl de solução conjugado para cada poço.
11. Incubar durante 30 min. ± 5 min. à temperatura ambiente (18 a 25° C).

12. Adicionar 100 µl de solução de paragem a cada poço.
13. Ler os níveis de absorvância dentro de 10 min., a 450 nm.

### **Protocolo qualitativo**

Executar conforme descrito no protocolo semi-quantitativo, com uma única excepção: Substituir o conjunto do calibrador (A-E) pelo controlo de referência.

## **CONTROLO DA QUALIDADE**

No caso do protocolo semi-quantitativo, o calibrador A (3200 unidades/ml) deve ter uma D.O de  $\geq 0,9$ . Calcular a média de poços duplicados para cada calibrador e controlo. Deve-se então calcular o valor dos controlos, tal como na interpretação dos resultados, abaixo.

Consulte o rótulo do controlo positivo para obter o intervalo de controlo positivo válido. O controlo negativo deve ser  $<25$  U/ml.

Para o protocolo qualitativo, consulte no rótulo do controlo positivo a proporção válida de controlo positivo versus controlo de referência.

A proporção de controlo negativo versus controlo de referência deve ser  $<0,95$ .

Se algum dos valores não estiver dentro dos respetivos intervalos, o teste deve ser considerado inválido e deve ser repetido.

## **INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

### **Protocolo semi-quantitativo**

Subtrair o valor médio de absorvância dos poços  $A_1$  e  $A_2$  do valor individual de absorvância dos poços que contêm os calibradores, controlos e amostras. Os valores de absorvância dos cinco calibradores (valores médios dos duplicados) podem então ser traçados manualmente no eixo linear y versus as unidades num eixo logarítmico x. A curva de calibração fica próximo da linearidade no intervalo de 25–2962 U/ml. O título de anticorpos é expresso em unidades, determinadas através dos soros de calibrador, o que se faz através da leitura do valor da unidade que corresponde à média líquida de absorvância da amostra na curva de calibração. Alternativamente, pode efectuar-se o cálculo através de um programa de software que utilize uma curva de 4 parâmetros para o cálculo.

Atribuíram-se os seguintes valores aos cinco calibradores (A a E): 3200 U/ml (A), 800 U/ml (B), 200 U/ml (C), 50 U/ml (D) e 25 U/ml (E). Estes valores forem seleccionados arbitrariamente pela Svar Life Science, visto não existirem normas (inter)nacionais geralmente reconhecidas para expressar o título de anticorpos anti-PCC. As amostras que demonstrem valores mais elevados do que o do calibrador A (3200 U/ml) podem ser testadas de novo a uma diluição mais elevada das amostras.

Actualmente não existe evidência de que as unidades obtidas possam ser utilizadas para medir a gravidade da doença. Os anticorpos de diferentes doentes podem ter afinidades diferentes, o que significa que se mede a imunoreactividade dos auto-anticorpos, e não a sua concentração.

A curva de calibração não pode ser usada para estabelecer valores de absorvância inferiores ao do calibrador E (25 U/ml). Os valores devem ser registados como sendo  $<25$  U/ml.

### **Protocolo qualitativo**

Subtrair o valor médio de absorvância dos poços  $A_1$  e  $A_2$  do valor individual de absorvância dos poços que contêm os controlos e amostras.

Calcular a relação de absorvância (densidade óptica) do controlo e de cada amostra.

$$\text{Razão de absorvância} = \frac{\text{DO do controlo } \mathbf{ou} \text{ da amostra}}{\text{DO do controlo de referência}}$$

## CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

### Protocolo semi-quantitativo

As amostras com resultados de < 25 U/ml são definidas como sendo negativas. As amostras com resultados  $\geq 25$  U/ml são definidas como sendo positivas.

### Protocolo qualitativo

Os utilizadores devem calcular o valor de corte, entre as amostras positivas e negativas, que seja específico para as suas populações de doentes. Os resultados das populações de doentes usados no estudo clínico da Svar Life Science sugerem o seguinte valor de corte:

Razão de absorvância	Interpretação dos resultados
< 0,95	Negativo
$\geq 0,95$ a $\leq 1,0$	Limite – recomenda-se a repetição do teste
> 1,0	Positivo

### Limitações

1. Pode utilizar-se um resultado positivo em conjunção com uma avaliação clínica e outros processos de diagnóstico. Os valores obtidos neste ensaio destinam-se apenas a ajudar a efectuar um diagnóstico. Cada médico deverá interpretar os resultados em conjunção com a história do doente, descobertas físicas e outros procedimentos de diagnóstico.
2. Podem verificar-se contagens elevadas de anticorpos anti-PCC em indivíduos sem qualquer evidência de doença clínica. Além disso, alguns doentes com AR podem ter anticorpos indetectáveis. Os níveis de anticorpos anti-PCC não se correlacionam necessariamente com o estado da doença.
3. Como os níveis de anticorpos anti-PCC não se correlacionam necessariamente com o estado da doença, não se deve iniciar ou alterar o tratamento à base de um resultado positivo. As conclusões clínicas devem ser tomadas em consideração em todas as decisões relativas aos tratamentos.
4. Não se estabeleceu ainda a monitorização dos níveis de anticorpos PCC para a progressão e/ou remissão da AR.
5. Não se estabeleceram as características de performance deste ensaio em amostras pediátricas. Não se determinou ainda o valor diagnóstico dos anticorpos anti-PCC na artrite juvenil.

### Resultados esperados

O EIA péptido da anti-PCC mede os anticorpos em relação aos péptidos sintéticos com resíduos de citrulina. O EIA péptido da anti-PCC é calibrado no ensaio semi-quantitativo em unidades relativas, utilizando um pool plasma de doentes positivo. A curva normal varia entre 25 e 3200 U/ml. Estes valores forem seleccionados arbitrariamente pela Svar Life Science, visto não existirem normas internacionais geralmente reconhecidas para expressar o título de anticorpos anti-PCC. Avaliaram-se a especificidade e a sensibilidade em estudos



anteriores feitos com 311 doentes com AR, 942 doentes com outras doenças sem ser a AR (incluindo outras doenças auto-imunes e uma grande série de doenças infecciosas) e 330 controlos saudáveis. Obteve-se uma sensibilidade de 70%. Obteve-se uma especificidade de 97% nos doentes com doenças sem ser a AR e de 99% nas pessoas saudáveis. (15)

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

**Quadro 1. Percentagem de acordo do kit de PCC Immunoscan CCPlus®, em comparação com um ELISA PCC alternativo.** Avaliaram-se ao todo 628 amostras de soro retrospectivo congelado. 368 amostras pertenciam a doentes com AR e 260 amostras eram normais, tendo sido extraídas de um banco de sangue. O quadro abaixo contém um resumo dos resultados.

ELISA alternativo				
Kit PCC Immunoscan CCPlus®		Positivo	Negativo	Número
	<b>Positivo</b>	<b>275</b>	<b>5</b>	<b>280</b>
	<b>Negativo</b>	<b>2</b>	<b>346</b>	<b>348</b>
	<b>Número</b>	<b>277</b>	<b>351</b>	<b>628</b>

Acordo de percentagens positivas:  $275/277 = 99.3\%$       95% IC = 97.4-99,9%  
 Acordo de percentagens negativas:  $346/351 = 98.6\%$       95% IC = 96.7-99.5%  
 Acordo de percentagens globais:  $621/628 = 98.9\%$       95% IC = 97.7-99.6%

O intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado através do método exacto.

**Quadro 2. Sensibilidade e especificidade clínica.** Avaliaram-se ao todo 1180 amostras de soro retrospectivo congelado com caracterização clínica. O quadro abaixo contém um resumo dos resultados.

Grupos de controlo e doença	Número total	Negativo < 25 U/ml	Positivo ≥ 25 U/ml
<b>Doadores de sangue</b>	260	257	3
<b>AR</b>	399	90	309
<b>GW</b>	20	18	2
<b>PM</b>	20	20	0
<b>LES</b>	66	64	2
<b>Sjogren</b>	13	13	0
<b>DII</b>	98	95	3
<b>Osteoartrite</b>	21	21	0
<b>Tiroidite</b>	20	20	0
<b>Vírus de Epstein Barr</b>	5	5	0
<b>Parvovírus</b>	5	5	0
<b>Micoplasma</b>	9	9	0
<b>Toxoplasma</b>	6	6	0
<b>Tuberculose</b>	5	5	0
<b>Iersiniose</b>	8	8	0
<b>Salmonela</b>	3	3	0
<b>Clamídia</b>	5	4	1

<b>Malária</b>	4	4	0
<b>Borrélia</b>	9	9	0
<b>Sífilis</b>	5	5	0
<b>Endocardite infecciosa</b>	3	3	0
<b>Legionela</b>	4	4	0
<b>TAS</b>	3	3	0
<b>Esquistomiase</b>	4	4	0
<b>Rubéola</b>	5	5	0
<b>Síndrome de Chaga</b>	3	3	0
<b>Escleroderma</b>	17	16	1
<b>Esclerose Múltipla</b>	20	20	0
<b>DMDI</b>	20	20	0
<b>PM/DM</b>	20	20	0
<b>DMTC</b>	20	19	1
<b>Amostras de rotina</b>	80	78	2

- AR = artrite reumatóide  
 GW = Granulomatose de Wegener  
 PM = poliangiite microscópica  
 LES = lúpus eritematoso sistémico  
 PM/DM = Polimiosite/Dermatomiosite  
 DII = doença intestinal inflamatória  
 TAS = teste anti-estreptolisina  
 DMDI = diabetes melitus dependente da insulina  
 DMTC = doença mista do tecido conjuntivo

#### Sensibilidade clínica

AR – 309/399 = 77,4%

95% IC = 73,3 -81,5 %

#### Especificidade clínica

Doadores de sangue	= 257/260 = 98,8%	95% IC = 96,7 -99,8%
GW	= 18/20 = 90,0%	95% IC = 68,3 -98,8%
PM	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
LES	= 64/66 = 97,0 %	95% IC = 89,5 - 99,6 %
Sjogren	= 13/13 = 100 %	95% IC = 75,3 - 100 %
DII	= 95/98 = 96,9%	95% IC = 91,3 - 99,4%
Osteoartrite	= 21/21 = 100%	95% IC = 83,9 -100%
Tiroidite	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
Doença infecciosa	= 85/86 = 98,8%	95% IC = 93,7 -100%
Escleroderma	= 16/17 = 94,1%	95% IC = 71,3 - 99,8%
Esclerose Múltipla	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
DMDI	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
DMTC	= 19/20 = 95,0%	95% IC = 75,1 - 99,9%
Amostras de rotina	= 78/80 = 97,5 %	95% IC = 91,3 - 99,7 %

O intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado através do método exacto.

**Quadro 3. A precisão intra-ensaios** foi determinada através da realização de testes em seis amostras diferentes, oito vezes em cada uma.

	Elevada		Elevada		Elevada	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	2672	1,421	2685	1,432	1150	1,664
S.D.	138	0,01	205	0,01	55,3	0,02
%C.V.	5,2	0,4	7,6	0,4	4,8	0,9
	Média		Baixa		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	239	1,014	56	0,421	28	0,232
S.D.	2,3	0,01	2,1	0,01	0,5	0,01
%C.V.	1,0	0,4	3,8	2,8	3,6	1,3

**Quadro 4. A precisão intra-ensaios** foi determinada através da realização de testes em seis amostras diferentes, oito vezes em cada uma. Obtiveram-se os resultados de três tiragens diferentes.

	Elevada		Elevada		Elevada	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	2696	1,426	2600	1,422	1168	1,706
S.D.	328	0,01	299	0,01	101,7	0,07
%C.V.	12,2	0,7	11,5	0,8	8,7	3,8
	Média		Baixa		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	242	1,031	59	0,428	28	0,232
S.D.	5,0	0,03	3,1	0,02	0,5	0,01
%C.V.	2,1	2,5	5,2	3,8	1,8	0,9

**Quadro 5. A variação de lote para lote** foi determinada através da realização de testes em seis amostras diferentes, oito vezes em cada uma. Obtiveram-se os resultados de três lotes diferentes.

	Elevada		Elevada		Elevada	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	2896	1,408	2870	1,408	1530	1,807
S.D.	405	0,02	335	0,02	260,4	0,03
%C.V.	14,0	1,4	11,7	1,5	17,0	1,6
	Média		Baixa		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	259	1,100	60	0,462	62	0,471
S.D.	21,8	0,04	4,2	0,02	6,6	0,04
%C.V.	8,4	3,9	6,9	4,4	10,8	8,2

**Quadro 6. A recuperação da diluição** foi determinada através da realização de testes a cinco diluições em série em três amostras diferentes.

Amostra	Diluição	Concentração média medida (U/ml)	Concentração calculada (U/ml)	Diluição corrigida % recuperação
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Amostra	Diluição	Concentração média medida (U/ml)	Concentração calculada (U/ml)	Diluição corrigida % recuperação
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Amostra	Diluição	Concentração média medida (U/ml)	Concentração calculada (U/ml)	Diluição corrigida % recuperação
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Duas amostras adicionais foram diluídas no intervalo linear de 1/50-1/1600. As concentrações médias foram respectivamente de 164-6,0 U/ml e 321-11 U/ml, com uma recuperação corrigida para a diluição entre 98%-105%.

#### Limite de detecção

O limite de detecção do ensaio foi determinado através da activação do zero padrão 14 vezes em três lotes diferentes. O limite de detecção de 1,6 U/ml foi calculado através da determinação da média mais dois desvios padrão.

#### Estudo de interferência

Injectaram-se três amostras positivas baixas com bilirubina a 0,2 mg/ml, hemoglobina a 400 mg/dl, lípido a 15 mg/ml e factor reumatóide a 200 UI/ml. Os dados indicam que as concentrações ensaiadas não interferem com os resultados anti-PCC.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER /. LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Ag</b>	Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antígeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).
<b>DIL</b>	Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>20X</b>	Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> <b>0.5M</b>	Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).
<b>CONJ</b>	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.
<b>CAL</b>	Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.



<table border="1"> <tr> <td data-bbox="201 248 395 286"><b>CONTROL</b></td> <td data-bbox="395 248 491 286"><b>+</b></td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>+</b>	<p>Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.</p>
<b>CONTROL</b>	<b>+</b>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="201 394 395 432"><b>CONTROL</b></td> <td data-bbox="395 394 491 432"><b>-</b></td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>-</b>	<p>Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.</p>
<b>CONTROL</b>	<b>-</b>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="201 546 395 584"><b>CONTROL</b></td> <td data-bbox="395 546 491 584"><b>REF</b></td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>REF</b>	<p>Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.</p>
<b>CONTROL</b>	<b>REF</b>		

## IMMUNOSCAN CCPlus®

Kun til professionel brug

### TILSIGTET BRUG

Immunoscan CCPlus® testkit er en enzymkoblet immunosorbentanalyse (ELISA) til kvalitativ og semi-kvantitativ bestemmelse af IgG-antistoffer over for cyklisk citrullinerede peptider (CCP) i human sera.

Analysen anvendes til at påvise antistoffer i en enkelt serumprøve. Analysens resultater bruges som en hjælp til diagnosticering af rheumatoid arthritis (RA), sammen med andre laboratorieresultater og kliniske fund. Analysen skal udføres af uddannet laboratoriepersonale. "Til *in vitro* diagnostisk brug".

### RESUMÉ OG FORKLARING

Rheumatoid arthritis (RA) er en af de mest almindelige systemiske autoimmunsygdomme. Ætiologien til sygdommen, som rammer op til 1-2% af verdens befolkning, kendes ikke. Diagnosen på RA afhænger primært af sygdommens manifestation. Den eneste serologiske test, som rutinemæssigt anvendes, er bestemmelsen af tilstedeværelsen af rheumatoid faktorer (RF) i serummet. RF er antistoffer, der er rettet mod den konstante region af immunoglobuliner i IgG-klassen. Disse antistoffer findes imidlertid også i relative høje procenttal ved andre autoimmune sygdomme, infektioner og i op til 15% af raske personer.

Antistoffer af en mere specifik art er ligeledes blevet fundet i sera hos RA-patienter (se (1) for en oversigt). Anti-perinukleær faktor (APF) antistoffer rapporteres at være tilstede hos omkring 50% af RA-patienter med en specificitet på over 70% (2). Et antal cykliske, syntetiske peptider, der ikke er relateret til filaggrin eller andre kendte proteiner, er blevet beskrevet at være specifikt genkendt ved autoantistoffer i sera fra RA-patienter (3). Disse peptider er efterfølgende blevet brugt i en EIA til bestemmelse af RA-specifikke autoantistoffer (3). Kliniske evalueringsundersøgelser har vist, at EIA var positiv i et signifikant antal af veldefinerede RA-patientsera med en fortræffelig specificitet mod sygdomskontroller (3-8). En diagnostisk og prognostisk værdi til måling af de anti-cyklisk citrullinerede peptider (anti-CCP) antistoffer blev fundet i relation til ledinvolvering og radiologisk skade i tidlig RA (7, 9-14). Anti-CCP-antistoffer kan påvises år inden udviklingen af kliniske symptomer (14). Et prospektivt gruppestudie viste, at 93% af de anti-CCP positive patienter med udifferentieret arthritis til sidst udviklede rheumatoid arthritis, hvilket påviser den stærkt positive prædiktive værdi af disse antistoffer (14). Immunoscan CCPlus® analysen, som Svar Life Science tilbyder, er baseret på højrensede syntetiske peptider, der indeholder rester af citrullin og er et værdifuldt tillæg til diagnosticering af RA. Dette anti-CCP kit indeholder forbedrede syntetiske peptider, der er udvalgt på basis af en overlegen ydeevne til at påvise RA-autoantistoffer (8-14).

## PRINCIPPET I RA-PEPTID EIA-PROCEDUREN

Anti-CCP antistof-kittet er baseret på en ELISA-metode. Testen anvender mikrotiterplader med brønde belagt med citrullinerede syntetiske peptider (antigen). Fortyndet patientserum tilsættes til brøndene og inkuberes. Hvis specifikke antistoffer er til stede, vil de bindes til antigenet i brøndene. Ubundet materiale vaskes bort og bundne antistoffer påvises ved at tilsætte horseradish peroxidase (HRP)-mærket anti-humant IgG, efterfulgt af endnu et vasketrin og en inkubation med substrat.

Tilstedeværelse af reagerende antistoffer vil resultere i en farveudvikling, der er proportionel med mængden af bundet antistof, og som påvises fotometrisk.

## FORHOLDSREGLER

1. Stopopløsningen indeholder 0,5 M svovlsyre. Reagensen må ikke komme i kontakt med hud.
2. Undgå kontakt med hud og slimhinder ved håndtering af alt biologisk materiale.
3. Der må ikke pipetteres med munden.
4. Kontroller og kalibratorer indeholder plasma af human oprindelse. Skønt dette materiale er blevet testet og bekræftet negativt for HIV 1+2, HCV, HbsAg og HIV-1 Ag, skal det håndteres som potentielt infektiøst. - Det amerikanske Center for Sygdomskontrol og Forebyggelse og det Nationale Sundhedsinstitut har anbefalet, at potentielt infektiøse agenser håndteres ved biosikkerhedsniveau 2.
5. TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin) er toksisk ved inhalation, hudkontakt og indtagelse. Vær forsigtig, når substratet håndteres.
6. Konjugatopløsningen indeholder 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EF-nr. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EF-nr. 220-239-6] (3:1) Det kan forårsage en allergisk hudreaktion.
7. Brug ikke komponenter efter disses udløbsdato, og sammenbland ikke komponenter fra forskellige partier.
8. Hver brønd bliver til sidst anvendt som en optisk kuvette. Undersiden af brøndene må derfor ikke berøres og beskadigelse og snavs skal forhindres.
9. For optimale resultater skal denne protokol overholdes strengt. Omhyggelig pipettering og vaskning under hele denne procedure er nødvendig for at opretholde præcision og nøjagtighed.
10. Kalibratorer, kontroller og fortyndingsbuffer indeholder 0,09% natriumazid. Det er blevet rapporteret, at natriumazid kan reagere med bly- og kobbervandrer og danne eksplosive forbindelser. Ved bortskaffelse skal afløb skylles med rigelige mængder vand for at minimere opbygning af metalazidforbindelser.
11. Til in vitro diagnostisk brug.

Materiale-sikkerhedsdatablade for alle komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Svar Life Science.

**Konjugatopløsning:****ADVARSEL**

Indeholder: Blanding av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion

P261 Undgå indånding af spray.

P280 Bær beskyttelseshandsker.

P333 + P313 Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.

**KIT-INDHOLD**

Indhold i EIA-kit:

- 1 forsejlet (96 brønde) CCP-peptidbelagt mikrotiterplade. Klar til brug.
- 5 hætteglas, der indeholder kalibratorer (positivt humant plasma-pool) (1,2 ml). Klar til brug (blå).
- 1 hætteglas, der indeholder referencekontrol-humant plasma (1,2 ml). Klar til brug (blå).
- 1 hætteglas, der indeholder positivt humant plasma (1,2 ml). Klar til brug (blå).
- 1 hætteglas, der indeholder negativt humant plasma (1,2 ml). Klar til brug (blå).
- 1 hætteglas, der indeholder konjugatopløsning (peroxidase konjugeret til anti-human IgG antistoffer) (15 ml) klar til brug (rød).
- 1 hætteglas, der indeholder substratopløsning TMB (15 ml). Klar til brug.
- 2 hætteglas, der indeholder fortyndingsbuffer (35 ml). Klar til brug (blå).
- 1 hætteglas, der indeholder stopopløsning (15 ml). Klar til brug.
- 2 hætteglas, der indeholder vaskebuffer (35 ml) 20 X koncentreret.

**NØDVENDIG UDSTYR OG MATERIALE SOM IKKE INDGÅR I KITTET**

- Spektrofotometer med filter på 450nm.
- Automatiseret mikrotiterpladevasker.

**HÅNDBLIVNING OG OPBEVARING**

- Kittet skal opbevares mørkt mellem + 2° C og + 8° C.
- Reagenserne må ikke anvendes efter deres udløbsdato.
- Til tilrådes at pakke den forseglede mikrotiterplade ud umiddelbart før brug.
- Den kromogene opløsning må ikke udsættes for direkte lys.

Hvis der observeres en svag eller manglende farverreaktion i den første kalibrator A (3200 U/ml)

E450 nm <0,9, er testresultatet ugyldigt.

## PRØVEPRÆPARATION

Denne test udføres på serumprøver. For serumprøver skal der opsamles venøst blod, som skal koagulere fuldstændigt. Prøver må højst opbevares i 48 timer ved 4-8° C. Ved længere opbevaring skal prøver fryses ved -20° C. Fortynd patientprøver 1:50. (Bland 10 µl prøve i et rør med 490 µl fortyndingsbuffer. Anvend 100 µl i testen. (Se analyseprotokol).

## PRÆPARATION OG HÅNDTERING AF REAGENSER

Før testen startes, skal mikrotiterplade og reagenser nå op på stuetemperatur. Pladens forsegling må ikke åbnes, før pladen har nået op på stuetemperatur.

Bland reagenserne grundigt før brug.

Reagenserne i kittet er tilstrækkelige til at udføre 96 analyser (inklusive kalibratorer og kontrolanalyser).

Kalibratorer og kontroller analyseres i duplikat.

Bufferkoncentrater kan indeholde saltkrystaller, som skulle være opløst ved stuetemperatur (18-25° C).

1. Samtlige reagenser skal opbevares mørkt ved 2-8° C umiddelbart efter brug.
2. CCP-peptidbelagt mikrotiterplade. Klar til brug.  
Genforsegl overskydende brønde i foliepose med tørremiddel og opbevar ved 2-8° C.
3. Vaskebuffer (35 ml). Vaskebufferen leveres 20 gange koncentreret. Tilbered fortyndinger før brug. Tilsæt 35 ml vaskebuffer til 665 ml destilleret vand og bland grundigt.
4. Substratopløsning TMB (15 ml). Klar til brug. Skal opbevares mørkt.
5. Fortyndingsbuffer (35 ml). Klar til brug.
6. Konjugatopløsning (15 ml). Klar til brug.
7. Stopopløsning (15 ml). Klar til brug.
8. Kalibrator A-E (1,2 ml). Fem fortyndede positivt humant plasma-kalibratorer med værdier udtrykt i relative enheder. Kalibrator A indeholder 3200 U/ml, B 800 U/ml, C 200 U/ml, D 50 U/ml og E 25 U/ml. Kalibratorene er klar til brug.
9. Referencekontrol (1,2 ml). Fortyndet humant plasma, 25 U/ml, klar til brug.
10. Negativ kontrol (1,2 ml). Fortyndet humant plasma, klar til brug.
11. Positiv kontrol (1,2 ml). Fortyndet human plasma, klar til brug.

## ANALYSEPROCEDURE

### Vaskeprotokol

I EIA'er skal ubunde komponenter fjernes effektivt mellem hvert immunologisk inkubationstrin. Dette opnås med behørig vask. Hver eneste vaskeprocedure skal udføres omhyggeligt for at garantere gode resultater. Vask kan udføres manuelt eller med automatisk pladevaskeapparat som følger:

### Manuel vask

1. Tøm indholdet ud af hver eneste brønd ved at vende op og ned på mikrotiterpladen og derefter udføre en hurtig og kort lodret bevægelse.
2. Fyld alle brøndene med 300 µl vaskebuffer.
3. Denne vaskecyklus (1 og 2) skal udføres 3 gange.
4. Vend op og ned på pladen og tøm brøndene med en hurtig og kort lodret bevægelse.

5. Placér den omvendte plade på absorberende papirservietter og slå bestemt på pladen for at fjerne resterende vaskeopløsning i brøndene.
6. Fortsæt umiddelbart derefter til det næste reagenstilsætningstrin.

### **Vask med automatisk vaskeapparat til mikrotiterplader**

Når der bruges et automatisk pladevaskeapparat, skal det kontrolleres, at alle brønde kan aspireres fuldstændigt og at vaskebufferen afgives korrekt, så den når kanten af hver brønd under hver eneste vaskecyklus. Vaskeapparatet skal programmeres til at udføre tre vaskecykluser. Fortsæt umiddelbart derefter til det næste reagenstilsætningstrin.

### **Analyseprotokol**

Præparér prøver i henhold til afsnittet Prøvepræparation (dvs. fortynd 1:50 i fortyndingsbuffer) og reagenser i henhold til Præparation og håndtering af reagenser. Mikrotiterpladen er klar til brug, må ikke vaskes! Patientprøver kan testes enten enkeltvis eller i duplikat.

### **Semikvantitativ protokol**

1. Pipettér 100 µl fortyndingsbuffer i duplikat (brønde A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: blank).
2. Pipettér 100 µl af hver kalibrator i duplikat (brønd B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).
3. Pipettér 100 µl af negativ og positiv kontrol i duplikat (brønd G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>).
4. Pipettér 100 µl af fortyndede patientprøver i deres respektive brønde på mikrotiterpladen. Den totale tid for pipettering i trin 1-4 må ikke overstige 15 minutter.
5. Inkubér i 60 min. ± 5 min. ved stuetemperatur (18-25° C).
6. Tøm opløsningen ud af mikrotiterpladen og vask i henhold til vaskeprotokollen.
7. Pipettér 100 µl konjugatopløsning i hver brønd.
8. Inkubér i 30 min. ± 5 min. ved stuetemperatur (18-25° C).
9. Tøm konjugatopløsningen ud af mikrotiterpladen og vask i henhold til vaskeprotokollen.
10. Pipettér 100 µl substratopløsning i hver brønd.
11. Inkubér i 30 min. ± 5 min. ved stuetemperatur (18-25° C).
12. Tilsæt 100 µl stopopløsning til hver brønd.
13. Aflæs absorbansværdier indenfor 10 min. ved 450 nm.

### **Kvalitativ protokol**

Analysér som beskrevet i semi-kvantitativ protokol med en enkelt undtagelse: Erstat kalibratorsæt (A-E) med referencekontrol.

## KVALITETSKONTROL

For den semi-kvantitative protokol skal kalibrator A (3200 U/ml) have en OD  $\geq 0,9$ . Beregn duplikatbrøndenes middelværdi for hver kalibrator og kontrol. Kontrollernes værdi skal derefter beregnes som i Fortolkning af resultater, se nedenfor.

Der henvises til mærkatet på den positive kontrol vedrørende godkendte, positive kontrolområder. Den negative kontrol bør være  $< 25$  U/mL.

Hvad angår den kvalitative protokol henvises der til mærkatet på den positive kontrol vedrørende et godkendt forhold mellem den positive kontrol og referencekontrollen.

Forholdet mellem den negative kontrol og referencekontrollen bør være  $< 0,95$ .

Hvis nogle af værdierne ikke befinder sig inden for deres respektive område, skal testen betragtes som ugyldig og gentages.

## FORTOLKNING AF RESULTATER

### Semikvantitativ protokol

Træk middelabsorbansværdierne for brønd  $A_1$  og  $A_2$  fra den individuelle absorbans for de brønde, som indeholder kalibratører, kontroller og prøver. Absorbansværdierne for de fem kalibratører (duplikaternes middelværdier) kan plottes manuelt på den lineære y-akse mod enhederne på en logaritmisk x-akse. Kalibreringskurven er næsten lineær i området 25-2962 U/ml. Antistoftiteren udtrykkes i enheder, som bestemmes med kalibratorsera ved at aflæse den enhedsværdi, der svarer til prøvens middelabsorbans på kalibreringskurven. Alternativt kan der bruges et softwareprogram, der anvender en 4-parameterkurvetilpasning, til denne beregning.

De fem kalibratører (A - E) er blevet tildelt en værdi på 3200 U/ml (A), 800 U/ml (B), 200 U/ml (C), 50 U/ml (D) og 25 U/ml (E). Disse værdier er blevet vilkårligt valgt af Svar Life Science, eftersom der ikke findes nogen generelt anerkendt (inter)national standard for at udtrykke titeren for anti-CCP antistoffer. Prøver, som giver en højere værdi end kalibrator A (3200 U/ml), kan testes igen i en højere prøvefortynding. På nuværende tidspunkt findes der intet bevis for, at de enheder der måles, kan bruges som et mål for sygdommens sværhedsgrad. Antistoffer fra forskellige patienter kan have forskellig affinitet, hvilket indebærer, at autoantistoffets immunreaktivitet, snarere end dets koncentration, måles.

Kalibreringskurven kan ikke anvendes for absorbansværdier under kalibrator E (25 U/ml). Værdier skal rapporteres som  $< 25$  U/ml.

### Kvalitativ protokol

Træk middelabsorbansværdierne for brønd  $A_1$  og  $A_2$  fra den individuelle absorbans for de brønde, som indeholder kontroller og prøver.

Beregn absorbansforholdet (optisk densitet) for kontrollen og hver enkelt prøve.

$$\text{Absorbansforhold} = \frac{\text{Kontrol *eller* Prøve OD}}{\text{Referencekontrol OD}}$$

## EVALUERINGSKRITERIER

### Semikvantitativ protokol

Prøver med resultater  $< 25$  U/ml defineres som negative. Prøver  $\geq 25$  U/ml defineres som positive.

### Kvalitativ protokol

Brugere skal beregne en cut-off værdi mellem positive og negative prøver, der er specifik for deres patientpopulationer. Resultater fra patientpopulationerne, der blev brugt i Svar Life Sciences kliniske undersøgelse, forslår den følgende cut-off:

#### Absorbansforhold

$< 0,95$   
 $\geq 0,95$  til  $\leq 1,0$   
 $> 1,0$

#### Resultatsfortolkning

Negativ  
 Grænseværdi – omtestning anbefales  
 Positiv

### Begrænsninger

1. Et positivt resultat skal bruges sammen med klinisk evaluering og andre diagnostiske procedurer. Værdierne, der fås ved denne analyse, er kun beregnet til at bistå diagnosen. Hver enkelt læge må fortolke resultaterne sammen med patientens anamnese, fysiske fund og andre diagnostiske procedurer.
2. Forhøjede anti-CCP-antistoffer kan ses hos personer uden evidens på klinisk sygdom. Nogle personer med RA kan endvidere have ikke-påviselige antistoffer. Anti-CCP antistofniveauer korrelerer ikke nødvendigvis med sygdomstilstand.
3. Da anti-CCP antistofniveauer ikke nødvendigvis korrelerer med sygdomstilstand, bør behandling ikke initieres eller ændres alene på basis af et positivt resultat. Kliniske fund skal tages i betragtning ved alle behandlingsbeslutninger.
4. Mulighed for at monitorere CCP antistofniveauer for progression og/eller remission RA er ikke blevet etableret.
5. Denne analyses præstationskarakteristika er ikke blevet etableret for pædiatriske prøver. Den diagnostiske værdi af anti-CCP antistoffer er ikke blevet bestemt for juvenil arthritis.

### Forventede resultater

Anti-CCP EIA måler antistoffer mod syntetiske peptider med rester af citrullin. Anti-CCP EIA kalibreres i den semi-kvantitative analyse i relative enheder ved hjælp af en pool af positive patientplasma. Standardkurven rangerer fra 25-3200 U/ml. Disse værdier er blevet vilkårligt valgt af Svar Life Science, eftersom der ikke findes nogen generelt anerkendt international standard for at udtrykke titeren for anti-CCP antistoffer. Specificiteten og sensitiviteten er blevet evalueret i tidligere studier med 311 RA-patienter, 942 syge non-RA-patienter (inklusive andre autoimmune samt et bredt udvalg af andre infektionssygdomme) og 330 sunde kontroller. Sensitiviteten var 70%. Specificiteten var 97% med syge non-RA patienter og 99% med sunde personer. (15)



## PRÆSTATIONSKARAKTERISTIKA

**Tabel 1. Procent overensstemmelse af Immunoscan CCPlus® kit i sammenligning med en alternativ CCP ELISA.** I alt 628 frosne retrospektive sera blev analyseret. 368 prøver var fra RA-patienter og 260 prøver var fra tilsyneladende sunde bloddonorer. Den følgende tabel opsummerer resultaterne.

Alternativ ELISA				
Immunoscan CCPlus® Kit		Positiv	Negativ	I alt
	Positiv	275	5	280
	Negativ	2	346	348
	I alt	277	351	628

Positiv procent overensstemmelse:  $275/277 = 99.3\%$       95% CI = 97.4-99.9%  
 Negativ procent overensstemmelse:  $346/351 = 98.6\%$       95% CI = 96.7-99.5%  
 Samlet procent overensstemmelse:  $621/628 = 98.9\%$       95% CI = 97.7-99.6%

95% konfidensintervallet (CI) blev beregnet med den eksakte metode.

**Tabel 2. Klinisk sensitivitet og specificitet.** I alt 1180 frosne retrospektive sera med klinisk karakterisering blev analyseret. Den følgende tabel opsummerer resultaterne

Kontrol og sygdomsgrupper	Samlet antal	Negative < 25 U/ml	Positive ≥ 25 U/ml
Bloddonorer	260	257	3
RA	399	90	309
WG	20	18	2
MP	20	20	0
SLE	66	64	2
Sjögrens syndrom	13	13	0
IBD	98	95	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyroiditis	20	20	0
Epstein-Barr Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	6	6	0
Tuberculosis	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonella	3	3	0
Chlamydia	5	4	1
Malaria	4	4	0
Borrelia	9	9	0
Syphilis	5	5	0
Infektøs endocarditis	3	3	0
Legionella	4	4	0
AST	3	3	0
Schistomiasis	4	4	0

<b>Rubella</b>	5	5	0
<b>Chaga's syndrom</b>	3	3	0
<b>Scleroderma</b>	17	16	1
<b>Multipel sclerose</b>	20	20	0
<b>IDDM</b>	20	20	0
<b>PM/DM</b>	20	20	0
<b>MCTD</b>	20	19	1
<b>Rutineprøver</b>	80	78	2

RA = reumatoid arthritis  
 WG = Wegener's granulomatose  
 MP = mikroskopisk polyangiitis  
 SLE = systemisk lupus erythematosus  
 PM/DM = Polymyositis/Dermatomyositis  
 IBD = inflammatorisk tarmsygdom  
 AST = anti-Streptolysin test  
 IDDM = insulin afhængig diabetes mellitus  
 MCTD = mixed connective tissue disease

### Klinisk sensitivitet

RA = 309/399 = 77,4 %

95% CI = 73,3 - 81,5%

### Klinisk specificitet

Bloddonorer	= 257/260 = 98,8%	95% CI = 96,7 - 99,8%
WG	= 18/20 = 90,0%	95% CI = 68,3 - 98,8%
MP	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
SLE	= 64/66 = 97,0 %	95% CI = 89,5 - 99,6%
Sjogren's	= 13/13 = 100 %	95% CI = 75,3 - 100%
IBD	= 95/98 = 96,9%	95% CI = 91,3 - 99,4%
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	95% CI = 83,9 - 100%
Thyroiditis	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
Infektionssygdomme	= 85/86 = 98,8%	95% CI = 93,7 - 100%
Scleroderma	= 16/17 = 94,1%	95% CI = 71,3 - 99,8%
Multipel sclerose	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
IDDM	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
MCTD	= 19/20 = 95,0%	95% CI = 75,1 - 99,9%
Rutineprøver	= 78/80 = 97,5 %	95% CI = 91,3 - 99,7 %

95% konfidensintervallet (CI) blev beregnet med den eksakte metode.

**Tabel 3. Intra-analyse præcision** blev bestemt ved at teste seks forskellige prøver otte gange hver.

	Høj		Høj		Høj	
	U/ml	OD	U/ml	OD	U/ml	OD
Middel	2672	1,421	2685	1,432	1150	1,664
S,D,	138	0,01	205	0,01	55,3	0,02
% C.V.	5,2	0,4	7,6	0,4	4,8	0,9

	Medium		Lav		Lav	
	U/ml	OD	U/ml	OD	U/ml	OD
Middel	239	1.014	56	0,421	28	0,232
S,D,	2,3	0,01	2,1	0,01	0,5	0,01
% C.V.	1,0	0,4	3,8	2,8	3,6	1,3

**Table 4. Inter-analyse præcision** blev bestemt ved at teste seks forskellige prøver otte gange hver. Resultater blev indhentet for tre forskellige serier.

	Høj		Høj		Høj	
	U/ml	OD	U/ml	OD	U/ml	OD
Middel	2696	1,426	2600	1,422	1168	1,706
S.D.	328	0,01	299	0,01	101,7	0,07
% C.V.	12,2	0,7	11,5	0,8	8,7	3,8
	Medium		Lav		Lav	
	U/ml	OD	U/ml	OD	U/ml	OD
Middel	242	1,031	59	0,428	28	0,232
S.D.	5,0	0,03	3,1	0,02	0,5	0,01
% C.V.	2,1	2,5	5,2	3,8	1,8	0,9

**Tabel 5. Lot til lot variation** blev bestemt ved at teste seks forskellige prøver otte gange hver. Resultater blev indhentet for tre forskellige lot.

	Høj		Høj		Høj	
	U/ml	OD	U/ml	OD	U/ml	OD
Middel	2896	1,408	2870	1,408	1530	1,807
S,D,	405	0,02	335	0,02	260,4	0,03
% C.V.	14,0	1,4	11,7	1,5	17,0	1,6
	Medium		Lav		Lav	
	U/ml	OD	U/ml	OD	U/ml	OD
Middel	259	1,100	60	0,462	62	0,471
S,D,	21,8	0,04	4,2	0,02	6,6	0,04
% C.V.	8,4	3,9	6,9	4,4	10,8	8,2

**Table 6. Linearitet** blev bestemt ved at teste tre forskellige prøver i 5 seriefortyndinger.

Prøve	Fortynding	Middelværdi målt koncentration (U/ml)	Beregnet koncentration (U/ml)	Linearitet %
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Prøve	Fortynding	Middelværdi målt koncentration (U/ml)	Beregnet koncentration (U/ml)	Linearitet %
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Prøve	Fortynding	Middelværdi målt koncentration (U/ml)	Beregnet koncentration (U/ml)	Linearitet %
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

To yderligere prøver blev fortyndet 1/50-1/1600 i det lineære område. Middelkoncentrationen var henholdsvis 164-6,0 U/ml og 321-11 U/ml, med en fortyndingskorrigeret recovery mellem 98-105%.

#### Detektionsgrænse

Analysens detektion blev bestemt ved at køre den blanke standard 14 gange med tre forskellige satser. Detektionsgrænsen på 1,6 U/ml blev beregnet ved at finde middelværdien plus to standardafvigelse.

#### Interferensundersøgelse

Tre lav-positive prøver blev tilsat bilirubin 0,2 mg/ml, haemoglobin 400 mg/dl, lipid 15 mg/ml og rheumatoid faktor 200 IU/ml. Dataene indikerer, at de analyserede koncentrationer ikke interfererer med anti-CCP resultaterne.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER /. LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
Arthritis Rheum. 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
Ann. Rheum. Dis. 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
Ann. Rheum. Dis. 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
Arthritis Rheum. 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot number. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<table border="1"> <tr> <td><b>Ag</b></td> </tr> </table>	<b>Ag</b>	<p>Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antígeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).</p>		
<b>Ag</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>DIL</b></td> </tr> </table>	<b>DIL</b>	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
<b>DIL</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>BUF</b></td> <td><b>WASH</b></td> <td><b>20X</b></td> </tr> </table>	<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>	<p>Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger</p>
<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>		
<table border="1"> <tr> <td><b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b></td> <td><b>0.5M</b></td> </tr> </table>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>	<p>Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).</p>	
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CONJ</b></td> </tr> </table>	<b>CONJ</b>	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
<b>CONJ</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>SUBS</b></td> <td><b>TMB</b></td> </tr> </table>	<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>	<p>Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.</p>	
<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CAL</b></td> </tr> </table>	<b>CAL</b>	<p>Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.</p>		
<b>CAL</b>				



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

## **IMMUNOSCAN CCPlus®**

Kun til bruk av fagpersonell

### **TILTENKT BRUK**

Immunoscan CCPlus® testsett er en ELISA-metode (enzyme-linked immunosorbent assay) for kvalitativ og semikvantitativ bestemmelse av IgG-antistoffer mot CCP (cyclic citrullinated peptides) i humant serum.

Assayet brukes til å påvise antistoffer i en enkelt serumprøve. Resultatet av assayet skal brukes som en hjelp ved diagnostiseringen av revmatoid artritt (RA), sammen med andre laboratoriefunn og kliniske funn. Analysen bør utføres av opplært laboratoriepersonell. "For bruk ved in vitro diagnostiske formål".

### **SAMMENDRAG OG FORKLARING**

Revmatoid artritt (RA) er en av de vanligste systemiske autoimmune sykdommene. Etiologien til sykdommen, som rammer opp til 1-2 % av verdens befolkning, er ukjent. Diagnosen på RA avhenger primært av kliniske symptomer på sykdommen. Den eneste serologiske testen som brukes rutinemessig er bestemmelse av revmatoide faktorer (RF) i serum. RF er antistoffer styrt mot det konstante området av immunglobuliner av IgG-klassen. Disse antistoffene finnes imidlertid i relativt høy prosentdel ved andre autoimmune sykdommer, infeksjoner og hos opp til 15 % av friske personer.

Antistoffer av en mer spesifikk art er også funnet i sera fra RA-pasienter (se (1) for en oversikt). APF-antistoffer (anti-perinukleær faktor) er rapportert å være til stede hos rundt 50 % av RA-pasienter med en spesifisitet på over 70 % (2). En rekke syklisk syntetiske peptider som ikke er tilknyttet filaggrin eller andre kjente proteiner ble beskrevet som spesielt gjenkjent av autoantistoffer i sera fra RA-pasienter (3). Disse peptidene ble deretter brukt i en EIA for påvisning av RA-spesifikke autoantistoffer (3). Kliniske evalueringsstudier viste at EIA var positiv i et signifikant antall veldefinerte sera fra RA-pasienter med en fremragende spesifisitet mot sykdomskontrollpersoner (3-8). En diagnostisk og prognostisk verdi for måling av antistoffer som er reaktive overfor anti-CCP-antistoffer (anti-sykliske citrullinerte peptider) ble funnet i forbindelse med leddangrep og radiologisk skade i tidlig fase av RA (7, 9-14). Anti-CCP-antistoffer kan påvises mange år før det utvikles kliniske symptomer (14). En prospektiv kohortstudie viste at 93 % av anti-CCP-positive pasientene med uddifferensiert artritt til slutt utviklet revmatoid artritt, og viste den sterke positive prediktive verdien for disse antistoffene (14). Immunoscan CCPlus®-assayet som leveres av Svar Life Science bygger på høyrensede syntetiske peptider som inneholder citrullinkonsentrasjoner og er et verdifullt tilskudd ved diagnostiseringen av RA. Dette anti-CCP-settet inneholder forbedrede syntetiske peptider utvalgt på grunnlag av overlegen ytelse ved påvisning av RA-autoantistoffer (8-14).

## PRINSIPPET FOR RA PEPTID EIA

Anti-CCP-antistoffsettet er basert på en ELISA-metode. Testen anvender mikrotiterplatebrønner dekket med citrullinerte syntetiske peptider (antigen). Fortynnet pasientserum tilsettes brønnene og inkuberes. Hvis spesifikke antistoffer er tilstede, vil de binde til antigenet i brønnene. Ubundne materialer skylles vekk, og eventuelle bundne antistoffer påvises ved å tilsette HRP-merket (pepperrotperoksidase) anti-human IgG, etterfulgt av et nytt vasketrinn og inkubasjon med substrat.

Tilstedeværelsen av aktive antistoffer vil resultere i utvikling av farge som er proporsjonal med mengden bundne antistoffer, og dette fastslås fotometrisk.

## FORSIKTIGHETSREGLER

1. Stoppløsningen inneholder 0,5 M svovelsyre. Det må unngås at reagensen kommer i kontakt med huden.
2. Unngå kontakt mellom alt biologisk materiale med huden og slimhinnene.
3. Unngå pipettering med munnen.
4. Kontrolløsninger og kalibratorer inneholder humant plasma. Selv om materialet er testet og bekreftet negativt for HIV 1+2, HCV, HbsAg og HIV-1 Ag, må det behandles som smittefarlig. Sentra for sykdomskontroll og forebygging og helsemyndighetene anbefaler at smittestoffer håndteres på sikkerhetsnivå (biosafety level) 2.
5. TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidin) er giftig ved innånding, hudkontakt og svelging. Utvis forsiktighet ved håndtering av substratet.
6. Konjugatløsningen inneholder 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EC-nr. 247-500-7] og 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EC-nr. 220-239-6] (3:1) Det kan forårsake en allergisk hudreaksjon.
7. Ikke bruk komponenter etter utløpsdatoen, og ikke bland komponenter fra ulike serienumre.
8. Hver brønn skal til slutt brukes som en optisk skål. Derfor må ikke underflaten på brønnene berøres; unngå skade og smuss.
9. Nøye overholdelse av denne protokollen vil gi optimale resultater. Nøye pipettering og vasking gjennom hele denne prosedyren er nødvendig for å oppnå presisjon og nøyaktighet.
10. Kalibratorer, kontrolløsninger og fortynningsbuffer inneholder 0,09 % natriumazid. Det er rapportert at natriumazid kan reagere med bly og kobber i rør og danne eksplosive sammensetninger. Ved deponering må avløpet skylles med vann for å redusere oppbygging av metall-/azidforbindelser.
11. For bruk ved in vitro diagnostiske formål.

På forespørsel Svar Life Science gi HMS-datablad på alle komponenter som inngår i settet.

### Konjugatløsning:



**ADVARSEL**

Indeholder: Blanding av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion  
P261 Unngå innånding av spray.  
P280 Bruk vernehansker.  
P333 + P313 Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp

## **INNHold I SETTET**

Innhold i EIA-sett:

- 1 forseglet (96 brønner) CCP peptidbelagt mikrotiterplate. Klar til bruk.
- 5 hetteglass som inneholder kalibratorer (positiv pool av humant plasma) (1,2 ml). Klar til bruk (blå).
- 1 hetteglass som inneholder referansek kontroll av humant plasma (1,2 ml). Klar til bruk (blå).
- 1 hetteglass som inneholder positiv kontrolløsning av humant plasma (1,2 ml). Klar til bruk (blå).
- 1 hetteglass som inneholder negativ kontrolløsning av humant plasma (1,2 ml). Klar til bruk (blå).
- 1 hetteglass som inneholder konjugatløsning (peroksidase konjugert til anti-human IgG-antistoffer) (15 ml) Klar til bruk (rød).
- 1 hetteglass som inneholder substratløsning TMB (15 ml). Klar til bruk.
- 2 hetteglass som inneholder fortynningsbuffer (35 ml). Klar til bruk (blå).
- 1 hetteglass som inneholder stoppløsning (15 ml). Klar til bruk.
- 2 hetteglass som inneholder vaskebuffer (35 ml) 20 x konsentrert.

## **NØDVENDIGE MATERIALER/UTSTYR SOM IKKE FØLGER MED**

- Mikroplateleser med filter, 450 nm.
- Automatisk mikrotiterplatevasker.

## **HÅNTERING OG OPPBEVARING**

- Oppbevar settet ved + 2 til + 8 °C på et mørkt sted.
- Reagensene må ikke brukes etter utløpsdatoene.
- Det anbefales å pakke opp den forseglede mikrotiterplaten rett før bruk.
- Unngå å få direkte lys på den kromogene løsningen.

Hvis det observeres svak eller manglende fargereaksjon i første kalibrator A (3200 E/ml) E450 nm <0,9, er testresultatet ugyldig.

## **KLARGJØRING AV PRØVEN**

Denne testen utføres på serumprøver. For serumprøver samles det veneblodprøver som får koagulere fullstendig. Oppbevar prøvene i maks. 48 timer ved 4-8 °C. For lengre oppbevaring fryses de ved

-20° C. Fortynn pasientprøven 1:50. (Bland 10 µl prøve i et rør med 490 µl fortynningsbuffer. Bruk 100 µl i testen. (Se assayprotokollen).

## KLARGJØRING OG HÅNDTERING AV REAGENSER

Før testen igangsettes bør mikrotiterplaten og reagensene oppnå romtemperatur.

Platforseglingen må ikke åpnes før platen har oppnådd romtemperatur.

Bland reagensene grundig før bruk.

Reagensene som følger med i settet er tilstrekkelig til å utføre 96 analyser (inkludert kalibrator og kontrollanalyser).

Kalibratorene og kontrolløsninger analyseres i duplikat.

Bufferkonsentrater kan inneholde saltkrystaller, som skal oppløses ved romtemperatur (18-25° C).

1. Sett alle reagenser på et mørkt sted ved 2-8° C rett etter bruk.
2. CCP peptidbelagt mikrotiterplate. Klar til bruk.  
Forsegle overfløydige brønner i folie med tørkemiddel, og oppbevar dem ved 2-8° C.
3. Vaskebuffer (35 ml). Vaskebuffer leveres konsentrert 20 ganger. Klargjør fortyninger før bruk. Tilsett 35 ml vaskebuffer til 665 ml destillert vann og bland grundig.
4. Substratløsning TMB (15 ml). Reagens klar til bruk. Oppbevares mørkt.
5. Fortynningsbuffer (35 ml). Klar til bruk.
6. Konjugatløsning (15 ml). Klar til bruk.
7. Stopppløsning (15 ml). Klar til bruk.
8. Kalibrator A-E (1,2 ml). Fem fortyndede positive kalibratorene av humant plasma, med verdier uttrykt i relative enheter.  
Kalibrator A inneholder 3200 E/ml, B 800 E/ml, C 200 E/ml, D 50 E/ml og E 25 E/ml. Kalibratorene er klare til bruk.
9. Referansekontroll (1,2 ml). Fortyndet humant plasma, 25 E/ml, klart til bruk.
10. Negativ kontrolløsning (1,2 ml). Fortyndet humant plasma, klart til bruk.
11. Positiv kontroll (1,2 ml). Fortyndet humant plasma, klart til bruk.

## PRØVEPROSEDYRE

### Skylling

I EIA-er må ubundne komponenter fjernes effektivt mellom hvert immunologiske inkubasjonstrinn. Dette oppnås ved tilstrekkelig skylling. Det må understrekes at hver skylleprosedyre må utføres med forsiktighet for å garantere gode resultater. Skylling kan utføres manuelt eller med automatisk platevaskeutstyr på følgende måte:

### Manuell skylling

1. Tøm innholdet i hver brønn ved å snu mikrotiterplaten opp-ned etterfulgt av en bestemt, kort vertikal bevegelse.
2. Fyll alle brønnene med 300 µl vaskebuffer.
3. Denne skyllesyklusen (1 og 2) må utføres tre ganger.
4. Snu platen opp-ned og tøm brønnene med en bestemt, kort vertikal bevegelse.
5. Plasser platen opp-ned på absorberende papirhåndkle og bank bestemt på platen for å fjerne rester av vaskeløsning i brønnene.
6. Fortsett straks til neste reagenttilsettingstrinn.

### Skylling med automatisk vaskeutstyr for mikrotiterplate

Ved bruk av det automatiserte platevaskeutstyret, kontroller at alle brønner kan aspireres fullstendig og at vaskebufferen blir korrekt dosert og når til kanten av hver brønn under hver

skyllesyklus. Vaskeren må programmeres til å utføre tre skyllesykluser. Fortsett straks til neste reagenstilsettingstrinn.

### Assayprotokoll

Klargjør prøvene i henhold til avsnittet om prøveklargjøring, (dvs. fortynnes 1:50 i fortynningsbuffer) og reagensene i henhold til klargjøring og håndtering av reagenser. Mikrotiterplaten er klar til bruk, skal ikke vaskes! Pasientprøver kan testes enten enkeltvis eller i duplikat.

### Semikvantitativ protokoll

1. Pipetter 100 µl fortynningsbuffer i duplikat (brønnene A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: blank).
2. Pipetter 100 µl av hver kalibrator i duplikat (brønnene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>).
3. Pipetter 100 µl negativ og positiv kontroll i duplikat (brønnene G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>).
4. Pipetter 100 µl fortynnet pasientprøve de respektive brønnene på mikrotiterplaten. Samlet tid for pipettering i trinn 1-4 bør ikke overskride 15 minutter.
5. Inkuberes i 60 min. ± 5 min. ved romtemperatur (18-25 °C).
6. Kasser løsningen fra mikrotiterplaten og vask i henhold til skylleprotokollen.
7. Pipetter 100 µl konjugatløsning i hver brønn.
8. Inkuberes i 30 min. ± 5 min. ved romtemperatur (18-25 °C).
9. Kasser konjugatløsningen fra mikrotiterplaten og vask i henhold til skylleprotokollen.
10. Pipetter 100 µl substratløsning i hver brønn.
11. Inkuberes i 30 min. ± 5 min. ved romtemperatur (18-25 °C).
12. Tilsett 100 µl stoppløsning i hver brønn.
13. Les av absorbansverdiene i løpet av 10 min. ved 450 nm.

### Kvalitativ protokoll

Kjøres som beskrevet i den semikvantitative protokollen med ett unntak: Skift ut kalibratorsettet (A-E) med referansekontrollen.

## KVALITETSKONTROLL

For den semikvantitative protokollen skal kalibrator A (3200 E/ml) ha en OD på  $\geq 0,9$ . Beregn middelverdien for duplikatbrønner for hver kalibrator og kontrolløsning. Verdien på kontrollene beregnes deretter ut fra tolkingen av resultatene, se nedenfor.

Gyldig område for positiv kontroll finner du på etiketten for positiv kontroll. Negativ kontroll skal være  $< 25$  U/mL.

Den kvalitative protokollen kan avleses på etiketten for positiv kontroll ved hjelp av gyldig forhold av positiv kontroll i forhold til referansekontroll.

Forholdet av negativ kontroll i forhold til referansekontroll skal være  $< 0,95$ .

Hvis noen av verdiene ikke er innenfor gjeldende områder, skal testen anses som ugyldig og må gjentas.

## TOLKING AV RESULTATET

### Semikvantitativ protokoll

Trekk gjennomsnittlig absorbansverdi for brønnene A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> fra den individuelle absorbansen for brønnene som inneholder kalibratører, kontroller og prøver.

Absorbansverdiene for de fem kalibratorene (gjennomsnittlige verdier for duplikatene) kan

plottes manuelt på den lineære y-aksen kontra enhetene på en logaritmisk x-akse. Kalibreringskurven er så og si lineær i området 25-2962 E/ml. Antistofftiteret uttrykkes i enheter fastsatt ved hjelp av kalibratorsera ved avlesing av enhetens verdi som korresponderer med netto gjennomsnittlig prøveabsorbans på kalibreringskurven. Alternativt kan det brukes et dataprogram som anvender en 4-parameterkurve til beregningen.

De fem kalibratorene (A - E) er tildelt en verdi på 3200 E/ml (A), 800 E/ml (B), 200 E/ml (C), 50 E/ml (D) og 25 E/ml (E). Disse verdiene er valgt vilkårlig av Svar Life Science, siden det ikke finnes noen generelt anerkjent (inter)nasjonal standard for å uttrykke titeret for anti-CCP-antistoffer. Prøver som gir høyere avlesinger enn kalibrator A (3200 E/ml) kan testes på nytt ved høyere prøvefortynning. Det finnes i øyeblikket ikke noe bevis på at enhetene som oppnås kan brukes som et mål på alvorlighetsgraden for sykdommen. Antistoffer fra forskjellige pasienter kan ha ulike affiniteter, noe som betyr at autoantistoffimmunitet og ikke konsentrasjonen blir målt.

Kalibreringskurven kan ikke brukes for absorbansverdier under kalibrator E (25 E/ml). Verdiene rapporteres som <25 E/ml.

### Kvalitativ protokoll

Trekk gjennomsnittlig absorbansverdi for brønnene A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> fra den individuelle absorbansen for brønnene som inneholder kontrollene og prøvene. Beregn absorbansforholdet (optisk tetthet) for kontrollen og for hver prøve.

$$\text{Absorbansforhold} = \frac{\text{Kontroll eller prøve OD}}{\text{Referansekontroll OD}}$$

## EVALUERINGSKRITERIER

### Semikvantitativ protokoll

Prøver med resultater < 25 E/ml defineres som negative. Prøver ≥ 25 E/ml defineres som positive.

### Kvalitativ protokoll

Brukere må beregne en cut-off mellom positive og negative prøver som er spesifikk for deres pasientpopulasjoner. Resultater fra pasientpopulasjonene som ble brukt i Svar Life Sciences kliniske utprøving antyder følgende cut-off:

#### Absorbansforhold

< 0.95  
 ≥ 0.95 til ≤ 1.0  
 > 1.0

#### Tolking av resultatet

Negativ  
 Grensetilfelle - gjentatt testing anbefales  
 Positiv

### Begrensninger

1. Et positivt resultat må brukes sammen med klinisk evaluering og andre diagnostiske prosedyrer. Verdiene som oppnås fra dette assayet er kun ment som støtte i diagnostiseringen. Den enkelte lege må tolke resultatet i lys av pasientens sykehistorie, fysiske funn og andre diagnoseprosedyrer.

2. Forhøyet mengde anti-CCP-antistoffer kan finnes hos enkeltpersoner som ikke har symptomer på klinisk sykdom. I tillegg kan noen personer med RA ha udetekterbare antistoffer. Anti-CCP-antistoffnivåer korrelerer ikke nødvendigvis med sykdomstilstand.
3. Fordi anti-CCP-antistoffnivåene ikke nødvendigvis korrelerer med sykdomstilstand, bør ikke behandling igangsettes eller endres basert på et positivt resultat. Kliniske funn bør innlemmes ved alle beslutninger om behandling.
4. Overvåking av CCP-antistoffnivåer for progresjon eller remisjon av RA er ikke etablert.
5. Funksjonsdataene for dette assayet er ikke etablert for pediatriske prøver. Diagnostiseringsverdien for anti-CCP-antistoffer er ikke fastslått for juvenil artritt.

### Forventede resultater

Anti-CCP EIA måler antistoffer mot syntetiske peptider med citrullinkonsentrasjoner. Anti-CCP EIA er kalibrert i det semikvantitative assayet i relative enheter ved hjelp av en positiv pool av pasientplasma. Standardkurven går fra 25-3200 E/ml. Disse verdiene er valgt vilkårlig av Svar Life Science, siden det ikke finnes noen generelt anerkjent internasjonal standard for å uttrykke titeret for anti-CCP-antistoffer. Spesifisiteten og sensitiviteten ble evaluert i tidligere studier med 311 RA-pasienter, 942 syke ikke-RA-pasienter (inkludert andre autoimmune og bredt utvalg infeksjonssykdommer) og 330 friske kontrollpersoner. Sensitiviteten var 70 %. Spesifisiteten var 97 % med syke ikke-RA-pasienter og 99 % med friske personer. (15)

## FUNKSJONSDATA

**Tabell 1. Prosentvis samsvar mellom Immunoscan CCPlus®-settet og en annen CCP ELISA.**

I alt 628 fryste retrospektive sera ble analysert. 368 prøver var fra RA-pasienter og 260 prøver var fra tilsynelatende friske blodgivere. Tabellen nedenfor oppsummerer resultatet.

Alternativ ELISA				
Immunoscan CCPlus®-sett		Positiv	Negativ	Totalt
	Positiv	275	5	280
	Negativ	2	346	348
	Totalt	277	351	628

Positivt prosentvis samsvar:  $275/277 = 99.3\%$       95 % CI = 97.4–99.9%  
 Negativt prosentvis samsvar:  $346/351 = 98.6\%$       95 % CI = 96.7–99.5%  
 Samlet prosentvis samsvar:  $621/628 = 98.9\%$       95 % CI = 97.7–99.6%

95 %-konfidensintervallet (CI) ble beregnet med nøyaktig metodikk.

**Tabell 2. Klinisk sensitivitet og spesifisitet.** I alt 1180 fryste retrospektive sera med klinisk karakterisering ble testet. Tabellen nedenfor oppsummerer resultatene

Kontroll- og sykdomsgrupper	Totalt antall	Negativ < 25 E/ml	Positiv ≥ 25 E/ml
Blodgivere	260	257	3
RA	399	90	309
WG	20	18	2



MP	20	20	0
SLE	66	64	2
Sjögrens syndrom	13	13	0
IBD	98	95	3
Osteoartritt	21	21	0
Thyreoiditt	20	20	0
Epstein-Barr-virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mykoplasma	9	9	0
Toksoplasma	6	6	0
Tuberkulose	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonella	3	3	0
Klamydia	5	4	1
Malaria	4	4	0
Borrelia	9	9	0
Syfilis	5	5	0
Smittsom endokarditt	3	3	0
Legionella	4	4	0
AST	3	3	0
Schistomiasis	4	4	0
Rubella	5	5	0
Chagas syndrom	3	3	0
Skleroderma	17	16	1
Multipel sklerose	20	20	0
IDDM	20	20	0
PM/DM	20	20	0
MCTD	20	19	1
Rutineprøver	80	78	2

- RA = revmatoid artritt  
 WG = Wegeners granulomatose  
 MP = mikroskopisk polyangiitt  
 SLE = systemisk lupus erythematosus  
 PM/DM = Polymyositt/dermatomyositt  
 IBD = inflammatory bowel disease (inflammatorisk tarmsykdom)  
 AST = antistreptolysintiter  
 IDDM = insulinavhengig diabetes mellitus  
 MCTD = mixed connective tissue disease (blandet bindevevssykdom)

#### Klinisk sensitivitet

RA = 309/399 = 77,4 %

95 % CI = 73,3 - 81,5%

#### Klinisk spesifisitet

Blodgivere	= 257/260 = 98.8%	95 % CI = 96,7 - 99,8%
WG	= 18/20 = 90.0%	95 % CI = 68,3 - 98.8%
MP	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 - 100%
SLE	= 64/66 = 97.0 %	95 % CI = 89,5 - 99.6%
Sjögrens	= 13/13 = 100 %	95 % CI = 75,3 - 100%
IBD	= 95/98 = 96.9%	95 % CI = 91,3 - 99.4 %
Osteoartritt	= 21/21 = 100%	95 % CI = 83,9 - 100%

Thyreoiditt	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 - 100%
Infeksjonssykdom	= 85/86 = 98.8%	95 % CI = 93,7 - 100%
Skleroderma	= 16/17 = 94.1%	95 % CI = 71,3 - 99.8%
Multipel sklerose	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 - 100%
IDDM	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 - 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 - 100%
MCTD	= 19/20 = 95.0%	95 % CI = 75,1 - 99.9%
Rutineprøver	= 78/80 = 97.5 %	95 % CI = 91,3 - 99.7 %

95 %-konfidensintervallet (CI) ble beregnet med nøyaktig metodikk.

**Table 3. Intra-assay presisjon** ble bestemt ved å teste seks forskjellige prøver åtte ganger hver.

	Høy		Høy		Høy	
	E/ml	OD	E/ml	OD	E/ml	OD
Gj.sn.	2672	1.421	2685	1.432	1150	1.664
S.D.	138	0.01	205	0.01	55.3	0.02
% C.V.	5.2	0.4	7.6	0.4	4.8	0.9
	Medium		Lav		Lav	
	E/ml	OD	E/ml	OD	E/ml	OD
Gj.sn.	239	1.014	56	0.421	28	0.232
S.D.	2.3	0.01	2.1	0.01	0.5	0.01
% C.V.	1.0	0.4	3.8	2.8	3.6	1.3

**Tabell 4. Inter-assay presisjon** ble bestemt ved å teste seks ulike prøver åtte ganger hver. Resultatene skriver seg fra tre forskjellige kjøringene.

	Høy		Høy		Høy	
	E/ml	OD	E/ml	OD	E/ml	OD
Gj.sn.	2696	1.426	2600	1.422	1168	1.706
S.D.	328	0.01	299	0.01	101.7	0.07
% C.V.	12.2	0.7	11.5	0.8	8.7	3.8
	Medium		Lav		Lav	
	E/ml	OD	E/ml	OD	E/ml	OD
Gj.sn.	242	1.031	59	0.428	28	0.232
S.D.	5.0	0.03	3.1	0.02	0.5	0.01
% C.V.	2.1	2.5	5.2	3.8	1.8	0.9

**Table 5. Variasjon fra serie til serie** ble bestemt ved å teste seks forskjellige prøver åtte ganger hver. Resultatene skrives seg fra tre forskjellige serier.

	<b>Høy</b>		<b>Høy</b>		<b>Høy</b>	
	E/ml	OD	E/ml	OD	E/ml	OD
Gj.sn.	2896	1.408	2870	1.408	1530	1.807
S.D.	405	0.02	335	0.02	260.4	0.03
% C.V.	14.0	1.4	11.7	1.5	17.0	1.6
	<b>Medium</b>		<b>Lav</b>		<b>Lav</b>	
	E/ml	OD	E/ml	OD	E/ml	OD
Gj.sn.	259	1.100	60	0.462	62	0.471
S.D.	21.8	0.04	4.2	0.02	6.6	0.04
% C.V.	8.4	3.9	6.9	4.4	10.8	8.2

**Tabell 6. Fortynningsrestitusjon** ble bestemt ved å teste fem serielle fortynninger i tre ulike prøver.

<b>Prøve</b>	<b>Fortynning</b>	<b>Gj.sn. målt konsentrasjon (E/ml)</b>	<b>Beregnet konsentrasjon (E/ml)</b>	<b>Fortynning korrigeret % restitusjon</b>
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
<b>Prøve</b>	<b>Fortynning</b>	<b>Gj.sn. målt konsentrasjon (E/ml)</b>	<b>Beregnet konsentrasjon (E/ml)</b>	<b>Fortynning korrigeret % restitusjon</b>
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
<b>Prøve</b>	<b>Fortynning</b>	<b>Gj.sn. målt konsentrasjon (E/ml)</b>	<b>Beregnet konsentrasjon (E/ml)</b>	<b>Fortynning korrigeret % restitusjon</b>
3	1/50	2692	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

To ekstra prøver ble fortynnet 1/50-1/1600 i det lineære området. Gjennomsnittlig konsentrasjon var henholdsvis 164-6,0 E/ml og 321-11 E/ml med en fortynningskorrigert restitusjon på mellom 98-105 %.

#### **Deteksjonsgrense**

Deteksjonsgrensen til assayet ble bestemt ved å kjøre nullstandarden 14 ganger på tre ulike serier. Deteksjonsgrensen på 1,6 E/ml ble beregnet ved å finne gjennomsnittet pluss to standardavvik.

#### **Interferensstudie**

Tre lav-positive prøver ble kombinert med bilirubin ved 0,2 mg/ml, hemoglobin ved 400 mg/dl, lipid ved 15 mg/ml og revmatoid faktor ved 200 IE/ml. Dataene indikerer at de analyserte konsentrasjonene ikke innvirker på anti-CCP-resultatene.






**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER /. LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
*Arthritis Res.* 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
*Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
*J. Clin. Invest.* 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
*Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
*Arthritis Rheum.* 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
*Clinical Chemistry.* 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
*Neth. J. Med.* 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
*Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
*Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<table border="1"> <tr> <td><b>Ag</b></td> </tr> </table>	<b>Ag</b>	<p>Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antígeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).</p>		
<b>Ag</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>DIL</b></td> </tr> </table>	<b>DIL</b>	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
<b>DIL</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>BUF</b></td> <td><b>WASH</b></td> <td><b>20X</b></td> </tr> </table>	<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>	<p>Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger</p>
<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>		
<table border="1"> <tr> <td><b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b></td> <td><b>0.5M</b></td> </tr> </table>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>	<p>Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).</p>	
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CONJ</b></td> </tr> </table>	<b>CONJ</b>	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
<b>CONJ</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>SUBS</b></td> <td><b>TMB</b></td> </tr> </table>	<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>	<p>Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.</p>	
<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CAL</b></td> </tr> </table>	<b>CAL</b>	<p>Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.</p>		
<b>CAL</b>				



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

## IMMUNOSCAN CCPlus®

Endast för professionell användning

### ANVÄNDNING

Immunoscan CCPlus® är en enzym immunoanalys (EIA) för kvalitativ och semi-kvantitativ bestämning av IgG antikroppar mot Cyklisk Citrullinerad Peptid (CCP) i humant serum. Testen används vid diagnostik av Reumatoid Artrit (RA) tillsammans med övriga kliniska fynd.

Testen är avsedd för professionell användning inom laboratorium.

### INLEDNING

Reumatoid Artrit (RA) är en av våra vanligaste systemiska autoimmuna sjukdomar. Ca 1-2% av världens befolkning drabbas av sjukdomen vars aetiologi är okänd. Diagnosen RA ställs primärt genom kliniska manifestationer. Det enda serologiska test som använts rutinmässigt är detektion av reumatoid faktor (RF) i serum. RF är en antikropp riktad mot den konstanta delen på immunoglobulin G (IgG). Dessa antikroppar finns emellertid också i relativt hög utsträckning vid andra autoimmuna sjukdomar och infektioner samt hos upp till 15% friska individer.

Antikroppar av mer specifik natur har också hittats i serum från RA patienter ( se (1) för översikt). Anti-perinukleär faktor (APF) har rapporterats i 50% av RA patienterna med en specificitet på över 70% (2). 1998 beskrevs ett antal cykliska syntetiska peptider, ej besläktade med filaggrin eller andra kända proteiner som specifikt känns igen av autoantikroppar, i sera från patienter med RA (3) Dessa peptider användes således i en EIA för att detektera RA-specifika autoantikroppar (3). I kliniska utvärderingar har EIA testen visat sig ge positivt utslag i ett signifikant antal väldefinierade sera från RA-patienter med en utmärkt specificitet mot sjukdomskontroller (3-8). Man har funnit ett diagnostiskt och prognostiskt värde i att mäta antikroppar mot **Cyklisk Citrullinerad Peptid (anti-CCP)** i samband med ledengagemang och radiologisk påverkan vid tidig RA (7, 9-14). Anti-CCP antikroppar kan detekteras flera år före debut av kliniska symptom (14). En prospektiv kohortstudie visade att 93% av anti-CCP positiva patienter med odifferentierade artriter slutligen utvecklade Reumatoid Artrit vilket tyder på ett starkt positivt prediktivt värde av antikroppen (14).

Svar Life Science's Immunoscan CCPlus®, som baseras på högrenade syntetiska peptider innehållande citrullin, är ett värdefullt komplement vid diagnostik av RA. Detta anti-CCP kit innehåller förbättrade syntetiska peptider som selekterats för bästa prestanda vid detektion av RA autoantikroppar (8-9).

## PRINCIP FÖR RA-PEPTID EIA

Immunoscan CCPlus® (anti-CCP) baseras på en ELISA-metod. I testen används mikrotiterplattor med brunnar coatade med citrullinerad syntetisk peptid (antigen). Patientserum tillsätts till brunnarna i lämplig spädning och inkuberas. Om det finns specifika antikroppar kommer de att binda till antigenet i brunnarna. Obundet material tvättas bort och bundna antikroppar detekteras efter tillsats av horse radish peroxidase (HRP)-märkt anti humant IgG, följt av ett andra tvättsteg och inkubering med substrat. Närvaro av reagerande antikroppar kommer att resultera i en färgutveckling proportionell mot mängden bunden antikropp. Färgutvecklingen detekteras fotometriskt.

## FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Stopplösningen innehåller 0.5 M svavelsyra. Skall ej komma i kontakt med huden.
2. Undvik kontakt med hud och slemhinnor vid hantering av allt biologiskt material
3. Pipettera ej med munnen.
4. Standard och kontroller består av human plasma. Dessa har testats och befunnits negativa avseende HIV 1+2, HCV, HbsAg och HIV-1 Ag. Materialet hanteras trots detta som möjlig smittrisk. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) och National Institutes of Health (NIH) i USA rekommenderar att potentiellt infektiösa material hanteras i enlighet med Biosafety Level 2.
5. Iakttag försiktighet vid hantering av substratet. TMB (3,3', 5,5'-tetrametylbensidin) är toxiskt vid inhalation, hudkontakt eller om det sväljs.
6. Konjugatlösningen innehåller 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EG-nr. 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EG nr. 220-239-6] (3:1) Det kan orsaka en allergisk hudreaktion.
7. Kitkomponenter får ej användas efter passerat utgångsdatum eller blandas mellan olika tillverkningssatser.
8. Varje brunn används som optisk kyvett vid slutavläsning. Undvik att vidröra undersidan av brunnarna och förhindra smuts och skada.
9. Optimalt resultat erhålls om detta protokoll följs noggrant. För att erhålla precision och exakthet i provsvaren är det nödvändigt att iakttaga stor noggrannhet vid pipettering och tvätt genom hela proceduren.
10. Kalibratorena, kontrollerna och spädningsbufferten innehåller 0.09% natriumazid. Natriumazid kan vid kontakt med avloppsrör av koppar eller bly resultera i ackumulerad bildning av mycket explosiva azidföreningar. Vid utspolning av reagens i avloppet ska rikliga mängder vatten spolas med för att undvika uppkomst av metallisk azid.
11. För *in vitro* diagnostisk användning.

På begäran kan Svar Life Science tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla komponenter som ingår i kitet.

**Konjugat lösning:****VARNING**

Innehåller: Reaktionsmassa bestående av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Kan orsaka allergisk hudreaktion

P261 Undvik att inandas spray.

P280 Använd skyddshandskar.

P333 + P313 Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

**KITINNEHÅLL**

Innehåll EIA-kit:

- 1 st förseglad (96 brunnar) peptidklädd mikrotiterplatta bruksfärdig.
- 5 st kalibratorer (human plasma å 1.2 mL) bruksfärdiga (blå)
- 1 st referenskontroll (human plasma, 1.2 mL) bruksfärdig (blå)
- 1 st positiv kontroll (humant plasma, 1.2 mL) bruksfärdig (blå).
- 1 st negativ kontroll (humant plasma, 1.2 mL) bruksfärdig (blå)
- 1 st konjugatlösning (peroxidas konjugerat anti human IgG 15mL) bruksfärdig (röd)
- 1 st substratlösning TMB (15 mL) bruksfärdig
- 2 st spädningbuffert (35 mL) bruksfärdiga (blå)
- 1 st stopplösning (15 mL) bruksfärdig
- 2 st tvättbuffert (35 mL) 20 gånger koncentrerad

**NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIAL SOM EJ INGÅR I KITET**

- Spektrofotometer med filter för 450 nm.
- Tvättare för mikrotiterplattor.

**HANDHAVANDE OCH FÖRVARING**

- Kitet skall förvaras mörkt mellan + 2° C och + 8° C.
- Använd ej reagenser efter passerat utgångsdatum.
- De förslutna mikrotiterplattorna skall packas upp precis före användning.
- Undvik att exponera de kromogena lösningarna för direkt ljus.

Om en svag eller utebliven färgreaktion i standard A (3200 E/mL) E450nm <0.9 observeras, bedöms testresultatet som ogiltigt.

**PROVBEREDNING**

Detta test utförs på serum. För serumprov samlas venöst blod som får koagulera fullständigt. Förvara prover i högst 48 timmar vid 4-8° C. Vid längre förvaring frys i -20° C. Späd

patientprover 1:50. (Blanda 10 µL prov i ett rör med 490 µL spädningsbuffert. För testen används 100 µL/brunn. (Se analysprotokoll).

## PREPARATION OCH HANTERING AV REAGENSER

Alla reagenser och mikrotiterplattan skall vara rumstempererade före användning. Öppna inte plattans försegling förrän plattan nått rumstemperatur. Blanda reagenserna noggrant före användning.

Reagenserna i kitet är tillräckliga för att utföra 96 analyser (inklusive kalibratorer och kontroller). Kalibratorer och kontroller testas i duplikat.

Tvättbuffertkoncentrat kan innehålla saltkristaller som löses i rumstemperatur (18-25° C).

1. Samtliga reagenser förvaras mörkt i 2-8° C efter användning.
2. Peptidklädd mikrotiterplatta, bruksfärdig. Återförslut överblivna brunnar i foliepåsen och förvara i 2-8° C.
3. Tvättbuffert (35 mL):  
Tvättbufferten levereras 20 gånger koncentrerad. Späd före användning.  
Tillsätt 35 mL koncentrat av tvättbuffert till 665 mL destillerat vatten och blanda väl.
4. Substratlösning TMB (15 mL) bruksfärdig. Förvara mörkt.
5. Spädningsbuffert (35 mL) bruksfärdig.
6. Konjugatlösning (15 mL) bruksfärdig.
7. Stopplösning (15 mL) bruksfärdig.
8. Kalibrator A-E (à 1.2 mL)  
Fem färdigspädda kalibratorer av humant plasma, med värden uttryckta i relativa enheter (E/mL). Kalibrator A innehåller 3200 E/mL, B 800 E/mL, C 200 E/mL, D 50 E/mL och E 25 E/mL.
9. Referenskontroll (1.2 mL). Humant plasma, 25 E/mL, färdigspädd lösning.
10. Negativ kontroll (1.2 mL). Humant plasma, färdigspädd lösning.
11. Positiv kontroll (1.2 mL). Humant plasma, färdigspädd lösning.

## ANALYSPROCEDUR

### Tvättprotokoll

I EIA's måste obundna komponenter elimineras mellan varje inkuberingssteg. Detta uppnås genom lämplig tvätt.

För att garantera ett bra slutresultat är det viktigt att varje tvättprocedur utförs med noggrannhet. Tvätten kan utföras manuellt eller med hjälp av en automatisk tvättutrustning för mikrotiterplattor enligt nedan:

### Manuell tvätt

1. Töm innehållet i varje brunn genom att vända mikrotiterplattan upp och ner följt av en snabb vertikal rörelse.
2. Fyll alla brunnar med 300 µL tvättbuffert.
3. Denna tvättcykel (1 och 2) skall utföras 3 gånger.
4. Vänd plattan upp och ner och töm brunnarna med en snabb vertikal rörelse.
5. Placera den upp och nervända plattan på absorberande pappershanddukar och slå plattan försiktigt för att eliminera resterande tvättlösning från brunnarna.
6. Fortsätt omedelbart till nästa steg i analysprotokollet.

**Tvätt med automatisk tvättutrustning för mikrotiterplattor**

När en automatisk tvättutrustning för mikrotiterplattorna används, kontrolleras att brunnarna töms fullständigt och att tvättbuffert appliceras till bredden på varje brunn i varje tvättcykel. Tvättutrustningen programmeras för att utföra tre tvättcykler. Fortsätt omedelbart till nästa steg.

**Analysprotokoll**

Prover prepareras enligt avsnitt "provberedning" (d.v.s. späd 1:50 i spädbuffert) och reagenser enligt avsnitt "preparation och hantering av reagenser". Mikrotiterplattan är bruksfärdig, tvätta inte! Patientprover kan testas enkelt eller i duplikat.

**Semikvantitativt protokoll**

1. Pipettera 100 µL spädbuffert i duplikat (brunn  $A_1$ ,  $A_2$ : blank).
2. Pipettera 100 µL av vardera kalibrator i duplikat (brunn  $B_1$ ,  $B_2$  -  $F_1$ ,  $F_2$ ).
3. Pipettera 100 µL negativ respektive positiv kontroll i duplikat (brunn  $G_1$ ,  $G_2$  resp.  $H_1$ ,  $H_2$ ).
4. Pipettera 100 µL utspätt patientprov i sina respektive brunnar på mikrotiterplattan. Den totala tiden för pipettering i steg 1-4 får ej överstiga 15 minuter.
5. Inkubera i 60 min. i rumstemperatur (18-25° C).
6. Töm mikrotiterplattan och tvätta enligt tvättproceduren.
7. Pipettera 100 µL konjugatlösning i varje brunn.
8. Inkubera i 30 min. i rumstemperatur (18-25° C).
9. Töm konjugatlösningen från mikrotiterplattan och tvätta enligt tvättprotokollet.
10. Pipettera 100 µL substratlösning i varje brunn.
11. Inkubera i 30 min. i rumstemperatur (18-25° C).
12. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn.
13. Avläs absorbansvärden omedelbart vid 450 nm.

**Kvalitativt protokoll**

Analysera enligt beskrivning i kvantitativt protokoll med följande undantag; ersätt kalibratorerna (A-E) med referenskontroll.

**VALIDERING**

För det semikvantitativa protokollet skall kalibrator A (3200 E/mL) ha  $OD \geq 0.9$ . Beräkna medelvärdet av dubbelprover för varje kalibrator och kontroll. Kontrollernas värde skall sedan beräknas genom att skatta resultatet, se nedan. Medelvärdet av dubbelproverna beräknas för varje kalibrator och kontroll. Värdet på kontrollerna beräknas enligt avsnitt "utvärdering av resultat".

För godtagbart förväntat resultat se etiketten på den positiva kontrollen. Den negativa kontrollen bör vara  $< 25U/mL$ .

För det kvalitativa protokollet hänvisas till etiketten på den positiva kontrollen där godkända kvoten mellan positiv kontroll och referenskontroll anges.

Kvoten mellan negativ kontroll och referenskontroll bör vara  $< 0.95$ .

Om något av värdena inte faller inom sina respektive områden, ska testet betraktas som ogiltigt och analysen ska göras om.

## UTVÄRDERING AV RESULTAT

### Semikvantitativt protokoll

Subtrahera medelvärdet av absorbansvärdena från brunnarna A<sub>1</sub> och A<sub>2</sub> (blank) från de individuella absorbansvärdena i brunnarna med kalibratorer, kontroller och prover. Absorbansvärdena från de fem kalibratorerna (medelvärdet av dubbelproverna) kan plottas manuellt på den linjära y-axeln mot enheterna på en logaritmisk x-axel. Kalibreringskurvan är nära linjär i området 25-2962 E/mL. Antikroppstitern uttrycks i enheter med hjälp av kalibreringskurvan genom att avläsa enhetsvärdet i förhållande till provets medelabsorbansvärde. Alternativt kan mjukvaruprogram med en 4-parameterskurva användas vid beräkning.

De fem kalibratorerna (A-E) har tillskrivits värdena 3200 E/mL (A), 800 E/mL (B), 200 E/mL (C), 50 E/mL (D) och 25 E/mL (E). Enheten är arbiträrt vald av Svar Life Science, eftersom generell standard för anti-CCP saknas. Prover som ger ett högre värde än kalibrator A (3200 E/mL) kan testas om i högre spädning. För närvarande finns inga bevis för korrelation mellan antal enheter anti-CCP och sjukdomsgrad. Antikroppar från olika patienter kan ha olika affinitet vilket innebär att autoantikroppens immunreaktivitet snarare än dess koncentration mäts.

Kalibreringskurvan kan ej användas för absorbansvärden under kalibrator E (25 E/mL). Värden rapporteras som <25 E/mL.

### Kvalitativt protokoll

Subtrahera medelvärdet av absorbansvärdena från brunnarna A<sub>1</sub> och A<sub>2</sub> (blank) från de individuella absorbansvärdena i brunnarna med kontroller och prover. Beräkna absorbansförhållandet (optical density) för varje enskilt prov.

Absorbansförhållande =	Kontroll <i>eller</i> Prov OD ----- Referenskontroll OD
------------------------	---------------------------------------------------------------

## UTVÄRDERINGSKRITERIER

### Semikvantitativt protokoll

Prover <25 E/mL definieras som negativa. Prover ≥25 E/mL definieras som positiva.

### Kvalitativt protokoll

Ett cut-off värde mellan positiva och negativa prover skall beräknas för varje enskild patientpopulation. Resultatet från patientpopulationen som använts av Svar Life Sciences kliniska studie indikerar följande cut-off:

#### Absorbansförhållande

<0.95  
≥0.95 till ≤1.0  
>1.0

#### Resultatutvärdering

Negativt  
Gränsvärde – omtestning rekommenderas  
Positivt

## Analysens begränsningar

1. Man får inte basera kliniska bedömningar enbart med ledning av analysresultat från detta test. Analysresultatet skall användas tillsammans med andra relevanta parametrar, inte minst allmänkliniska (symptom etc.), för att korrekt bedöma den specifika kliniska situationen.
2. Vissa individer kan vara positiva för anti-CCP utan övriga kliniska belegg för sjukdom. Det förekommer också att patienter med RA är negativa för/har odetekterbara nivåer av anti-CCP. Antikropstiter korrelerar inte nödvändigtvis med graden av sjukdom.
3. Då anti-CCP titern inte nödvändigtvis korrelerar med graden av sjukdom bör inte behandling initieras eller ändras enbart baserat på ett positivt resultat. Beslut angående behandling ska baseras på den totala kliniska bilden.
4. Möjlighet att följa progression och/eller remission av RA med hjälp av anti-CCP titern är inte fastställt.
5. Testets prestanda avseende pediatrika prover är inte utredd. Det diagnostiska värdet av anti-CCP i juvenil RA patienter är inte fastställt.

## Förväntade resultat

Immunoscan CCPlus® EIA detekterar antikroppar riktade mot en syntetisk peptid innehållande citrullin (anti-CCP). Immunoscan CCPlus® EIA kalibreras i relativa enheter med hjälp av en pool av positiva patientplasma. Standardkurvan sträcker sig från 25 E/mL och 3200 E/mL. Värdena är valda av Svar Life Science, eftersom generell standard för anti-CCP saknas. Specificitet och känslighet har utvärderats i kliniska studier med 311 RA-patienter, 942 sjuka icke-RA-patienter (inklusive andra autoimmuna samt ett brett material av andra infektionssjukdomar) och 330 friska kontroller. Känsligheten var 70%. Specificiteten var 97% med sjuka icke-RA patienter och 99% med friska kontrollpersoner. (15)

## PRESTANDA

### Tabell 1. Korrelationsstudie mellan Immunoscan CCPlus® och annan CCP ELISA.

Totalt analyserades 628 sera, 368 prover från RA patienter och 260 prover från blodgivare. Resultaten är summerade i tabellen.

Alternativ ELISA				
Immunoscan CCPlus®		Positiv	Negativ	Totalt
	Positiv	275	5	280
	Negativ	2	346	348
	Totalt	277	351	628

Sensitivitet:	$275/277 = 99.3\%$	95% KI = 97.4–99.9%
Specificitet:	$346/351 = 98.6\%$	95% KI = 96.7–99.5%
Precision:	$621/628 = 98.9\%$	95% KI = 97.7–99.6%

Den exakta metoden har använts för beräkning av 95% konfidensintervall (KI).



**Tabell 2. Klinisk sensitivitet och specificitet.** Totalt analyserades 1180 sera. Resultaten är summerade i tabellen.

Kontroll och Sjukdomsgrupper	Totalt antal	Negativa < 25 E/mL	Positiva ≥ 25 E/mL
Blodgivare	260	257	3
RA	399	90	309
WG	20	18	2
MP	20	20	0
SLE	66	64	2
Sjögrens syndrom	13	13	0
IBD	98	95	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyroiditis	20	20	0
Epstein Barr Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	6	6	0
Tuberculosis	5	5	0
Yersinia	8	8	0
Salmonella	3	3	0
Chlamydia	5	4	1
Malaria	4	4	0
Borrelia	9	9	0
Syphilis	5	5	0
Infektiös endokardit	3	3	0
Legionella	4	4	0
AST	3	3	0
Schistomiasis	4	4	0
Rubella	5	5	0
Chaga's syndrome	3	3	0
Scleroderma	17	16	1
Multipl Skleros	20	20	0
IDDM	20	20	0
PM/DM	20	20	0
MCTD	20	19	1
Rutin prover	80	78	2

- RA = reumatoid artrit  
 WG = Wegeners granulomatos  
 MP = mikroskopisk polyangit  
 SLE = systemisk lupus erythematosus  
 PM/DM = Polymyosit/Dermatomyosit  
 IBD = inflammatoriska tarmsjukdomar  
 AST = anti-Streptolysin test  
 IDDM = insulinberoende diabetes mellitus  
 MCTD = mixed connective tissue disease

**Klinisk sensitivitet**

RA = 309/399 = 77.4 %

95% KI = 73.3 – 81.5 %

<b>Klinisk specificitet</b>		<b>95% KI =</b>
Blodgivare	= 257/260 = 98.8%	96.7 - 99.8%
WG	= 18/20 = 90.0%	68.3 - 98.8%
MP	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
SLE	= 64/66 = 97.0%	89.5 - 99.6%
Sjögrens syndrom	= 13/13 = 100%	75.3 - 100%
IBD	= 95/98 = 96.9%	91.3 - 99.4%
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	83.9 - 100%
Thyroiditis	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
Infektionssjukdomar	= 85/86 = 98.8%	93.7 - 100%
Scleroderma	= 16/17 = 94.1%	71.3 - 99.8%
Multipel Skleros	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
IDDM	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
PM/DM	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
MCTD	= 19/20 = 95.0%	75.1 - 99.9%
Rutin prover	= 78/80 = 97.5%	91.3 - 99.7%

Den exakta metoden har använts för beräkning av 95% konfidensintervall (KI).

**Tabell 3. Inom-analys-variation.** 8 replikat av vardera 6 sera analyserades.

	<b>Hög</b>		<b>Hög</b>		<b>Hög</b>	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	2672	1.421	2685	1.432	1150	1.664
S.D.	138	0.01	205	0.01	55.3	0.02
% C.V.	5.2	0.4	7.6	0.4	4.8	0.9
	<b>Mellan</b>		<b>Låg</b>		<b>Låg</b>	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	239	1.014	56	0.421	28	0.232
S.D.	2.3	0.01	2.1	0.01	0.5	0.01
%C.V.	1.0	0.4	3.8	2.8	3.6	1.3

**Tabell 4. Mellan-analys-variation.** 8 replikat av vardera 6 sera analyserades med 3 olika satser.

	<b>Hög</b>		<b>Hög</b>		<b>Hög</b>	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	2696	1.426	2600	1.422	1168	1.706
S.D.	328	0.01	299	0.01	101.7	0.07
% C.V.	12.2	0.7	11.5	0.8	8.7	3.8
	<b>Mellan</b>		<b>Låg</b>		<b>Låg</b>	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	242	1.031	59	0.428	28	0.232
S.D.	5.0	0.03	3.1	0.02	0.5	0.01
%C.V.	2.1	2.5	5.2	3.8	1.8	0.9

**Tabell 5. Mellan sats variation.** 8 replikat av vardera 6 sera analyserades med 3 olika satser.

	Hög		Hög		Hög	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	2896	1.408	2870	1.408	1530	1.807
S.D.	405	0.02	335	0.02	260.4	0.03
% C.V.	14.0	1.4	11.7	1.5	17.0	1.6
	Mellan		Låg		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	259	1.100	60	0.462	62	0.471
S.D.	21.8	0.04	4.2	0.02	6.6	0.04
%C.V.	8.4	3.9	6.9	4.4	10.8	8.2

**Tabell 6. Linjäritet.** 3 olika prover analyserades i 5 spädningar.

Prov	Spädning	Medelvärde uppmätt koncentration (E/mL)	Beräknad koncentration (E/mL)	Överensstämmelse %
1	1/50	395	395	100
	1/100	195	198	98
	1/200	104	99	105
	1/400	53	50	106
	1/800	26	25	104
Prov	Spädning	Medelvärde uppmätt koncentration (E/mL)	Beräknad koncentration (E/mL)	Överensstämmelse %
2	1/50	921	921	100
	1/100	486	461	105
	1/200	257	230	112
	1/400	124	115	107
	1/800	63	58	109
Prov	Spädning	Medelvärde uppmätt koncentration (E/mL)	Beräknad koncentration (E/mL)	Överensstämmelse %
3	1/50	2962	2962	100
	1/100	1496	1481	101
	1/200	771	741	104
	1/400	349	370	94
	1/800	194	185	105

Två prover späddes 1/50-1/1600 linjärt. Provens koncentrationer uppmättes till 164-6.0 U/mL och 321-11 U/mL vilket motsvarar 98-105% av nivån efter korrigerig med respektive spädningsfaktor.

**Detektionsgräns**

Analysens detektionsgräns fastställdes genom att 14 replikat av en blank analyserades med 3 olika satser, medelvärdet plus 2 standardavvikelser gav en detektionsgräns på 1.6 E/mL.

**Interferens**

3 låga positiva prover, med tillsats av bilirubin 0.2 mg/mL, hemoglobin 400 mg/dL, lipid 15 mg/mL och reumatoid faktor 200 IE/mL, analyserades. Resultaten visar att de analyserade koncentrationerna inte interfererar med anti-CCP resultaten.

**LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / REFERENCIAS / LITERATUR /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / HENVISNINGER / LITTERATUR / LITTERATUR**


1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W.  
Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value.  
Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E.  
A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor.  
Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L., Van Venrooij, W.,  
Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by  
Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies.  
J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,  
Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J.  
The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide  
antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,  
Van Venrooij, W.  
The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic  
citrullinated peptide.  
Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R.  
Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.  
Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J.  
How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent  
(erosive) arthritis.  
Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H.  
Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of  
early Rheumatoid Arthritis.  
Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W.  
Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis.  
Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A.,  
Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B.  
Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for  
predicting five year radiographic damage.  
Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).

11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W.  
Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B.  
Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095 (2004).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T.  
Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project).  
*Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089 (2004).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T.  
Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis.  
*Arthritis Rheum.* 50, 709-715 (2004).
15. Vossenaar, E. K. Thesis  
University of Nijmegen page 24 Table 1 Overview of CCP Sensitivity and Specificity (2004)

**APPENDIX / ANNEXE / APÉNDICE / ANHANG / APPENDICE / APÊNDICE /  
APPENDIKS / TILLEGG / APPENDIX**

**Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette / Simbolos utilizados nos rótulos / Symboler anvendt på etiketter / Symboler som brukes på etiketter / Symboler på etiketterna**

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Número do lote. Partnummer. Lot number. Satsnummer.
	Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Numero di catalogo. Número catalogo.. Bestillingsnummer. Katalognummer. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risiko. Biologisk risiko. Biologisk risk.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Pour le diagnostic in vitro uniquement. Para uso en diagnóstico in vitro. Nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Uso diagnóstico in vitro. Utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> . In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96. Contenuto sufficiente per 96 test. Número de testes. Ineholder tilstrækkelig for 96 test. Inehåller tillräckligt för 96 test.

	<p>Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<table border="1"> <tr> <td><b>Ag</b></td> </tr> </table>	<b>Ag</b>	<p>Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antígeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antigénio (placa revestida). Antigen (belagt plade). Antigen (belagt plate). Antigen (klädd platta).</p>		
<b>Ag</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>DIL</b></td> </tr> </table>	<b>DIL</b>	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
<b>DIL</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>BUF</b></td> <td><b>WASH</b></td> <td><b>20X</b></td> </tr> </table>	<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>	<p>Wash buffer 20x concentrate. Tampon de lavage concentré (20x). Tampón de lavado concentrado 20x. Waschpuffer 20fach, Konzentrat. Tampone di lavaggio concentrato 20x. Tampão de lavagem concentrado 20x. Vaskebuffer 20x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 20 ganger. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger</p>
<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>20X</b>		
<table border="1"> <tr> <td><b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b></td> <td><b>0.5M</b></td> </tr> </table>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>	<p>Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution). Acide sulfurique 0,5 M (solution d'arrêt). Ácido Sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada). Schwefelsäure, 0,5 M (Stopplösung). Soluzione di stop (soluzione di acido solforico). Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem). Svovlsyre 0,5 mol (topopløsning). Svovelsyre, 0,5 molær (stoppløsning). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).</p>	
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5M</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CONJ</b></td> </tr> </table>	<b>CONJ</b>	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
<b>CONJ</b>				
<table border="1"> <tr> <td><b>SUBS</b></td> <td><b>TMB</b></td> </tr> </table>	<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>	<p>Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). TMB-opløsning (substratopløsning). Løsning TMB (substratløsning). Substratlösning, TMB.</p>	
<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>			
<table border="1"> <tr> <td><b>CAL</b></td> </tr> </table>	<b>CAL</b>	<p>Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.</p>		
<b>CAL</b>				



<b>CONTROL</b>   <b>+</b>	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontrol. Positiv kontroll. Positiv kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontrol. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
<b>CONTROL</b>   <b>REF</b>	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referencekontrol. Referansekontroll. Referenskontroll.

**SVAR LIFE SCIENCE AB**

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden  
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)