

IMMUNOSCAN RA Anti-CCP Test Kit

EURO-DIAGNOSTICA



IMMUNOSCAN RA Anti-CCP Test Kit

A microtitre plate based enzyme
immunoassay for detection of
Rheumatoid Arthritis specific autoantibodies
(anti-CCP)

Catalogue No. RA-96RT
For professional use only

Doc. no. E-23-0147-01
November 2005



INTENDED USE

The Immunoscan RA anti-CCP test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and semi-quantitation 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 RA assay offered by Euro-Diagnostica 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/plasma 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 serum 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. Do not use components past the expiration date and do not intermix components from different lots.
7. Each well is ultimately used as an optical cuvette. Therefore, do not touch the under-surface of the wells and prevent damage and dirt.
8. 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.
9. Calibrators, controls and diluent buffer contain 0.09% sodium azide.
10. 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.

KIT CONTENTS

Contents EIA-kit:

- 1 Sealed (12x8 wells) CCP peptide-coated microtitre plate. Ready to use.
- 5 Vials containing calibrators (positive human serum pool) (1.2 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing reference control human serum (1.2 mL). Ready to use (blue).
- 1 Vial containing positive control human serum (1.2 mL). Ready to use (blue).
(Value on label in U/mL).
- 1 Vial containing negative control human serum (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.

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 the following phenomena are observed, this may indicate a degeneration of the reagents:
 - A blue colouring of the chromogen solution before putting it into the wells.
 - A weak or absent colour reaction of the first calibrator A (1600 U/mL) E450 nm <0.9.

SAMPLE PREPARATION

This test is performed on serum/plasma 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 37° 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 strips 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 serum calibrators, with values expressed in relative units.
Calibrator A contains 1600 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 serum, ready to use.
10. Negative control (1.2 mL). Diluted human serum, ready to use.
11. Positive control (1.2 mL). Diluted human serum, 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 μ L 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 μ L dilution buffer in duplicate (wells A₁, A₂: blank).
2. Pipette 100 μ L of each calibrator in duplicate (wells B₁, B₂ – F₁, F₂).
3. Pipette 100 μ L of negative and positive control in duplicate (wells G₁, G₂- H₁, H₂).
4. Pipette 100 μ 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 μ 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 μ L substrate solution into each well.
11. Incubate for 30 min. \pm 5 min. at room temperature (18-25° C).
12. Add 100 μ 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 (1600 unit/mL) should have an OD of ≥ 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.

The result of the positive control should be within the range stated on the label in U/mL and the negative control should be < 25 U/mL. If this is not achieved, the test results are not valid and the test should be repeated.

For the qualitative protocol the ratio of the positive control versus the reference control should be within the range stated on the label. The ratio of the negative control versus the reference control should be < 1.0 .

INTERPRETATION OF RESULTS

Semi-Quantitative protocol

Subtract the mean absorbance value of the wells A_1 and A_2 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 25-1600 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 1600 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 Euro-Diagnostica, since no generally recognised (inter)national standard exists for expressing the titre of anti-CCP antibodies. Samples reading higher than the calibrator A (1600 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_1 and A_2 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 Euro-Diagnostica clinical trial suggest the following cut-off:

Absorbance ratio	Result Interpretation
< 0.95	Negative
≥ 0.95 to ≤ 1.0	Borderline - recommend repeat testing
> 1.0	Positive

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 RA-CCP peptide EIA measures antibodies against synthetic peptides with citrulline residues (anti-CCP). The RA-CCP peptide EIA is calibrated in the semi-quantitative assay in relative units using a positive patient serum pool. The standard curve ranges from 25-1600 U/mL. These values have been chosen arbitrarily by Euro-Diagnostica 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 RA CCP kit compared to an alternative CCP ELISA. A total of 320 frozen retrospective sera were assayed. 175 samples were from RA patients and 145 samples were normals from a blood bank. The following table summarises the results.

Alternative ELISA				
Immunoscan RA CCP Kit		Positive	Negative	Total
	Positive	135	6	141
	Negative	1	178	179
	Total	136	184	320

Positive Percent Agreement: $135/136 = 99.3\%$ 95% CI = 93.2 – 100%
 Negative Percent Agreement: $178/184 = 96.7\%$ 95% CI = 81.6 – 99.9%
 Overall Percent Agreement: $313/320 = 97.8\%$ 95% CI = 93.2 – 100%

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

Table 2. Clinical sensitivity and specificity. A total of 1052 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	184	182	2
RA	338	84	254
WG	20	20	0
MP	20	20	0
SLE	70	68	2
Sjogren's	17	16	1
IBD	100	97	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyroiditis	20	20	0
Epstein Barr Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	5	5	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
Infectious endocarditis	3	3	0
Legionella	4	4	0
AST	3	3	0
Schistosomiasis	4	4	0
Rubella	5	5	0
Chaga's syndrome	3	3	0
Scleroderma	17	16	1
Multiple Sclerosis	20	20	0
IDDM	20	20	0
PM/DM	20	20	0
MCTD	20	19	1
Routine samples	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 = 254/338 = 75.1 %

95% CI = 70.5 – 79.8 %

Clinical specificity

Blood donors	= 182/184 = 98.9%	95% CI = 96.1 - 99.9%
WG	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
MP	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
SLE	= 68/70 = 97.1 %	95% CI = 90.1 - 99.7 %
Sjogren's	= 16/17 = 94.1 %	95% CI = 71.3 - 99.8 %
IBD	= 97/100 = 97.0%	95% CI = 91.5 - 99.4%
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	95% CI = 83.9 - 100%
Thyroiditis	= 20/20 = 100%	95% CI = 83.2 - 100%
Infectious Disease	= 84/85 = 98.8%	95% CI = 93.6 - 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		Medium		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean.	1007.4	1.918	240.1	1.179	95.7	0.686
S.D.	128.5	0.05	15.5	0.04	6.7	0.03
% C.V.	12.8	2.8	6.5	3.3	7.0	4.9
	Low		Low		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean	51.7	0.187	33.6	0.128	88.1	0.284
S.D.	4.3	0.01	2.7	0.01	3.8	0.01
%C.V.	8.4	6.9	8.1	7.3	4.3	3.1

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

	High		Medium		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean.	1105.9	1955	257.4	1205	93.1	0.673
S.D.	129.5	0.05	20.2	0.04	5.6	0.04
% C.V.	11.7	2.6	7.9	3.4	6.0	6.5
	Low		Low		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean	52.5	0.313	33.3	0.216	94.9	0.479
S.D.	4.1	0.09	4.8	0.07	16.8	0.14
%C.V.	7.8	29.4	14.5	30.4	17.7	30.0

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

	High		Medium		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean.	1116.6	2.049	255.1	1.266	99.4	0.723
S.D.	136.6	0.10	22.8	0.08	8.7	0.05
% C.V.	12.2	5.1	8.9	6.0	8.7	6.4
	Low		Low		Low	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Mean	47.5	0.407	29.4	0.271	79.6	0.603
S.D.	1.8	0.02	2.2	0.03	3.8	0.04
%C.V.	3.8	4.6	7.4	9.7	4.8	6.8

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	49.1	49.1	100
	1/100	25.5	24.5	104
	1/200	11.4	12.3	93
	1/400	5.7	6.1	93
	1/800	2.7	3.1	88
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution corrected % recovery% diff.
2	1/50	32.0	32.0	100
	1/100	16.4	16.0	102
	1/200	8.7	8.0	109
	1/400	4.2	4.0	105
	1/800	2.1	2.0	104
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution corrected % recovery% diff.
3	1/50	82.0	82.0	100
	1/100	43.6	41.0	106
	1/200	22.2	20.5	109
	1/400	11.0	10.2	107
	1/800	5.2	5.1	101

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.

Trousse d'analyse IMMUNOSCAN RA Anti-CCP

Une technique d'immunodosage
sur microplaque pour la détection d'anticorps
spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde
(anti-CCP)

Catalogue n° RA-96RT

À usage strictement professionnel

UTILISATION

La trousse d'analyse Immunoscan RA anti-CCP est un dosage immunoenzymatique (ELISA) destiné à la détection et à la détermination semi-quantitative des anticorps IgG dirigés contre les 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 périmucléaire 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 RA proposée par Euro-Diagnostica 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 ou le plasma 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 sérum humain. 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. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption et ne pas mélanger les composants de lots différents.
7. 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.
8. 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.
9. Les étalons, les contrôles et le tampon de dilution contiennent 0,09% d'azide de sodium.
10. 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.

COMPOSITION DE LA TROUSSE

La trousse comprend :

- 1 plaque de micropuits revêtus de peptides CCP (12x8 puits) dans un sachet scellé. Prête à l'emploi.
- 5 flacons d'étalons (pool de sérums humains positifs) (1,2 ml). Prêts à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon de sérum humain de contrôle de référence (1,2 ml). Prêt à l'emploi (couleur bleu).
- 1 flacon de sérum humain de contrôle positif (1,2 ml). Prêt à l'emploi (couleur bleu). (La valeur du contrôle est indiquée en U/ml sur l'étiquette).
- 1 flacon de sérum humain 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.

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.
- Les phénomènes suivants indiquent une dégradation des réactifs :
 - Une coloration bleue du chromogène dans le flacon.
 - Une absence de coloration ou une faible réaction colorée avec l'étalon A (1600 U/ml) ($E_{450\text{ nm}} < 0,9$).

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Ce dosage peut utiliser des échantillons de sérum ou de plasma. 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 37 °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 barrettes 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 sérum humain positif, valeur exprimée en unités arbitraires.
L'étalon A contient 1600 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). Sérum humain dilué, prêt à l'emploi.
10. Contrôle négatif (1,2 ml). Sérum humain dilué, prêt à l'emploi.
11. Contrôle positif (1,2 ml). Sérum 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 A₁, A₂ : blanc).
2. Pipeter 100 µl de chaque étalon en double (puits B₁, B₂ – F₁, F₂).
3. Pipeter 100 µl de contrôle négatif et positif en double (puits G₁, G₂ – H₁, H₂).
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. \pm 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 (1600 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.

Le résultat du contrôle positif doit être compris dans l'intervalle en U/ml indiqué sur l'étiquette du flacon. Le contrôle négatif doit être inférieur à 25 U/ml. Si ce n'est pas le cas, le dosage ne peut pas être validé ; il doit être refait.

Pour le protocole qualitatif, le ratio de la DO du contrôle positif divisée par la DO du contrôle de référence doit être compris dans la fourchette indiquée sur l'étiquette. Le ratio de la DO du contrôle négatif divisée par la DO du contrôle de référence doit être inférieur à 1,0.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Protocole semi-quantitatif

Soustraire la valeur moyenne d'absorbance des puits A₁ et A₂ 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 1600 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 1600 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 Euro-Diagnostica, 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 (1600 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 A₁ et A₂ 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.

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

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 Euro-Diagnostica 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

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 RA-peptide 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 sérums 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 1600 U/ml. Ces valeurs ont été choisies arbitrairement par Euro-Diagnostica 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 RA CCP et une méthode alternative ELISA CCP. Au total, 320 échantillons de sérum congelé ont été dosés. 175 échantillons proviennent de patients atteints de PR ; les 145 autres échantillons sont normaux et proviennent d'un centre de transfusion. Le tableau suivant résume les résultats.

Méthode alternative ELISA				
Trousse Immunoscan RA CCP		Positif	Négatif	Total
	Positif	135	6	141
	Négatif	1	178	179
	Total	136	184	320

Pourcentage de concordance (échantillons positifs) :

$$135/136 = 99,3\% \quad \text{IC à 95\%} = 93,2 - 100\%$$

Pourcentage de concordance (échantillons négatifs) :

$$178/184 = 96,7\% \quad \text{IC à 95\%} = 81,6 - 99,9\%$$

Pourcentage de concordance globale :

$$313/320 = 97,8\% \quad \text{IC à 95\%} = 93,2 - 100\%$$

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

Tableau 2. Spécificité et sensibilité cliniques. Au total, 1052 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	184	182	2
PR	338	84	254
GW	20	20	0
PM	20	20	0
LED	70	68	2
Syndrome de Sjögren	17	16	1
MII	100	97	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	5	5	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
Sclérodémie	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 = granulomatosose 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 = 254/338 = 75,1%

IC à 95% = 70,5 – 79,8%

Spécificité clinique

Donneurs sains	= 182/184 = 98,9%	IC à 95% = 96,1 – 99,9%
GW	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
PM	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
LED	= 68/70 = 97,1%	IC à 95% = 90,1 – 99,7%
Syndr. de Sjögren	= 16/17 = 94,1%	IC à 95% = 71,3 – 99,8%
MII	= 97/100 = 97,0%	IC à 95% = 91,5 – 99,4%
Arthrose	= 21/21 = 100%	IC à 95% = 83,9 – 100%
Thyroïdite	= 20/20 = 100%	IC à 95% = 83,2 – 100%
Maladie infectieuse	= 84/85 = 98,8%	IC à 95% = 93,6 – 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. moyenne		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	1007,4	1,918	240,1	1,179	95,7	0,686
Écart-type	128,5	0,05	15,5	0,04	6,7	0,03
CV (%)	12,8	2,8	6,5	3,3	7,0	4,9
	Conc. faible		Conc. faible		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	51,7	0,187	33,6	0,128	88,1	0,284
Écart-type	4,3	0,01	2,7	0,01	3,8	0,01
CV (%)	8,4	6,9	8,1	7,3	4,3	3,1

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. moyenne		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	1105,9	1,955	257,4	1,205	93,1	0,673
Écart-type	129,5	0,05	20,2	0,04	5,6	0,04
CV (%)	11,7	2,6	7,9	3,4	6,0	6,5
	Conc. faible		Conc. faible		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	52,5	0,313	33,3	0,216	94,9	0,479
Écart-type	4,1	0,09	4,8	0,07	16,8	0,14
CV (%)	7,8	29,4	14,5	30,4	17,7	30,0

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.

	Conc. élevée		Conc. moyenne		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	1116,6	2,049	255,1	1,266	99,4	0,723
Écart-type	136,6	0,10	22,8	0,08	8,7	0,05
CV (%)	12,2	5,1	8,9	6,0	8,7	6,4
	Conc. faible		Conc. faible		Conc. faible	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Moyenne	47,5	0,407	29,4	0,271	79,6	0,603
Écart-type	1,8	0,02	2,2	0,03	3,8	0,04
CV (%)	3,8	4,6	7,4	9,7	4,8	6,8

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	49,1	49,1	100
	1/100	25,5	24,5	104
	1/200	11,4	12,3	93
	1/400	5,7	6,1	93
	1/800	2,7	3,1	88
Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/ml)	Concentration calculée (U/ml)	Taux de récupération (%)
2	1/50	32,0	32,0	100
	1/100	16,4	16,0	102
	1/200	8,7	8,0	109
	1/400	4,2	4,0	105
	1/800	2,1	2,0	104
Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/ml)	Concentration calculée (U/ml)	Taux de récupération (%)
3	1/50	82,0	82,0	100
	1/100	43,6	41,0	106
	1/200	22,2	20,5	109
	1/400	11,0	10,2	107
	1/800	5,2	5,1	101

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.

Kit de prueba anti-PCC IMMUNOSCAN AR

Kit de microplaca basada en enzimo
inmunoensayo para la detección de
anticuerpos específicos de Artritis Reumatoide
(anti-PCC)

N.º Catálogo RA-96RT
Sólo para uso profesional

USO PREVISTO

El kit de prueba anti-PCC Immunoscan AR es un enzimo-inmunoensayo (ELISA) para la detección 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 AR presentado por Euro-Diagnostica 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 o plasma 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 contienen suero 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. No use componentes pasada su fecha de caducidad y no mezcle componentes de diferentes lotes.
7. 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.
8. 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.
9. Los calibradores, los controles y el tampón de dilución contienen un 0,09% de azida sódica.
10. 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.

CONTENIDO DEL KIT

Contenido del kit de EIA:

- 1 microplaca sellada, recubierta con el péptido PCC (12 x 8 pocillos). Lista para usar.
- 5 viales con calibradores (reserva de suero humano positivo) (1,2 ml). Listos para usar (azul)
- 1 vial con suero de referencia control humano (1,2 ml). Listo para usar (azul)
- 1 vial con suero control humano positivo (1,2 ml). Listo para usar (azul)
(Valor en la etiqueta en unidades/ml).
- 1 vial con suero 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.

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.
- La observación de cualquiera de los siguientes fenómenos, puede indicar una degradación de los reactivos:
Un color azul en la solución cromógena antes de añadirse a los pocillos.
Reacción de coloración débil o ausente en el primer calibrador A (1600 unidades/ml)
 $E_{450nm} < 0,9$.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Esta prueba se realiza sobre muestras de suero/plasma. 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 37° 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 tiras restantes en el papel de aluminio con el desecante y almacene a 2-8°.
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 suero humano positivo diluido, con valores expresados en unidades relativas.
El calibrador A contiene 1600 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). Suero humano diluido, listo para usar.
10. Control negativo (1,2 ml). Suero humano diluido, listo para usar.
11. Control positivo (1,2 ml). Suero humano diluido, listo para usar.

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 µl 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 µl de tampón de dilución por duplicado (pocillos A₁, A₂: blanco).
2. Pipetee 100 µl de cada calibrador por duplicado (pocillos B₁, B₂ – F₁, F₂).
3. Pipetee 100 µl de controles negativo y positivo, por duplicado (pocillos G₁, G₂- H₁, H₂)
4. Pipetee 100 µl 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 ± 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 µl de la solución de conjugado a cada pocillo.
8. Incube durante 30 min ± 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 µl de solución de sustrato en cada pocillo.
11. Incube durante 30 min ± 5 min. a temperatura ambiente. (18-25°C).
12. Añada 100 µl 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 (1.600 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.

El resultado del control positivo debe estar dentro del rango indicado en la etiqueta en U/ml y el control negativo debe ser <25 U/ml. Si esto no se consigue, los resultados de la prueba no son válidos y debe repetirse.

Para el protocolo cualitativo, la relación control positivo frente a control de referencia debe estar dentro del rango indicado en la etiqueta. La relación entre control negativo y control de referencia debe ser $<1,0$.

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 25-1600 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 1.600 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 Euro-Diagnostica al no existir un estándar (inter)nacional reconocido para expresar el título de anticuerpos anti-PCC. Las muestras con lectura superior al calibrador A (1.600 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 A₁ y A₂ 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.

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

CRITERIOS DE EVALUACION**Protocolo semicuantitativo**

Las muestras con resultados < 25 U/ml se definen como negativas. Las muestras con ≥ 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 Euro-Diagnostica sugieren el siguiente valor de corte:

Relación de absorbancia

< 0,95
 ≥ 0,95 a ≤ 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-AR mide anticuerpos frente a péptidos sintéticos con residuos de citrulina (anti-PCC). El EIA de péptidos PCC-AR se calibra en el ensayo semicuantitativo en unidades relativas partiendo de sueros positivos de pacientes. La curva de calibración va de 25 a 1600 unidades/ml. Estos valores se han elegido de forma arbitraria por Euro-Diagnostica 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 AR en comparación con un ELISA alternativo de PCC. Se estudiaron un total de 320 sueros congelados retrospectivos. Ciento setenta y cinco muestras eran de pacientes con AR y 145 muestras eran normales, de un banco de sangre. La tabla siguiente resume los resultados.

ELISA alternativo				
Kit PCC Immunoscán AR		Positivos	Negativos	Total
	Positivos	135	6	141
	Negativos	1	178	179
	Total	136	184	320

Porcentaje de concordancia positiva: $135/136 = 99,3\%$ IC del 95% = 93,2 – 100%
 Porcentaje de concordancia negativa: $178/184 = 96,7\%$ IC del 95% = 81,6 – 99,9%
 Porcentaje de concordancia global: $313/320 = 97,8\%$ IC del 95% = 93,2 – 100%

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

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad clínicas. Se ensayaron un total de 1.052 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	184	182	2
AR	338	84	254
GW	20	20	0
PM	20	20	0
LES	70	68	2
Enfermedad de Sjögren	17	16	1
EII	100	97	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	5	5	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
Esquistosomiasis	4	4	0
Rubéola	5	5	0
Síndrome de Chagas	3	3	0
Esclerodermia	17	16	1
Esclerosis múltiple	20	20	0
DMID	20	20	0
PM/DM	20	20	0
EMTC	20	19	1
Muestras rutinarias	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 = 254/338 = 75,1 %

IC del 95% = 70,5 – 79,8 %

Especificidad clínica

Donantes de sangre	= 182/184 = 98.9%	IC del 95% = 96,1 – 99,9%
GW	= 20/20 = 100%	IC del 95% = 83,2 - 100%
PM	= 20/20 = 100%	IC del 95% = 83,2 - 100%
LES	= 68/70 = 97.1 %	IC del 95% = 90,1 – 99,7 %
Enfermedad de		
Sjögren	= 16/17 = 94.1 %	IC del 95% = 71,3 – 99,8 %
EII	= 97/100 = 97.0%	IC del 95% = 91,5 – 99,4%
Artrosis	= 21/21 = 100%	IC del 95% = 83,9 - 100%
Tiroiditis	= 20/20 = 100%	IC del 95% = 83,2 - 100%
Enfermedades		
infecciosas	= 84/85 = 98.8%	IC del 95% = 93,6 - 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		Medio		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	1007,4	1,918	240,1	1,179	95,7	0,686
D.E.	128,5	0,05	15,5	0,04	6,7	0,03
%C.V.	12,8	2,8	6,5	3,3	7,0	4,9
	Bajo		Bajo		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	51,7	0,187	33,6	0,128	88,1	0,284
D.E.	4,3	0,01	2,7	0,01	3,8	0,01
%C.V.	8,4	6,9	8,1	7,3	4,3	3,1

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		Medio		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	1105,9	1955	257,4	1205	93,1	0,673
D.E.	129,5	0,05	20,2	0,04	5,6	0,04
%C.V.	11,7	2,6	7,9	3,4	6,0	6,5
	Bajo		Bajo		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	52,5	0,313	33,3	0,216	94,9	0,479
D.E.	4,1	0,09	4,8	0,07	16,8	0,14
%C.V.	7,8	29,4	14,5	30,4	17,7	30,0

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		Medio		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	1116,6	2,049	255,1	1,266	99,4	0,723
D.E.	136,6	0,10	22,8	0,08	8,7	0,05
%C.V.	12,2	5,1	8,9	6,0	8,7	6,4
	Bajo		Bajo		Bajo	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Media	47,5	0,407	29,4	0,271	79,6	0,603
D.E.	1,8	0,02	2,2	0,03	3,8	0,04
%C.V.	3,8	4,6	7,4	9,7	4,8	6,8

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	49,1	49,1	100
	1/100	25,5	24,5	104
	1/200	11,4	12,3	93
	1/400	5,7	6,1	93
	1/800	2,7	3,1	88
Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/ml)	Concentración calculada (U/ml)	% de dif. del % de recuperación corregida por dilución
2	1/50	32,0	32,0	100
	1/100	16,4	16,0	102
	1/200	8,7	8,0	109
	1/400	4,2	4,0	105
	1/800	2,1	2,0	104
Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/ml)	Concentración calculada (U/ml)	% dif. del % de recuperación corregido por dilución
3	1/50	82,0	82,0	100
	1/100	43,6	41,0	106
	1/200	22,2	20,5	109
	1/400	11,0	10,2	107
	1/800	5,2	5,1	101

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.

IMMUNOSCAN RA Anti-CCP Test-Kit

Enzymimmunoassay
zum Nachweis von
spezifischen Autoantikörpern gegen rheumatoide Arthritis
(Anti-CCP)
Katalog-Nr. RA-96RT
Nur für den Gebrauch durch Laborpersonal

VERWENDUNGSZWECK

Das Immunoscan RA Anti-CCP Test-Kit ist ein enzymgebundener Immunosorbent-Test (ELISA) für den semiquantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen cyclische Citrullin-Peptide (CCP) in 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 RA von Euro-Diagnostica 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 / Plasma 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 Meerettichperoxidase (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 Humanserum. 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. Komponenten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden sowie Komponenten verschiedener Chargen nicht mischen.
7. Jede Kavität ist eine optische Küvette. Deshalb ist die Berührung, Beschädigung und Verschmutzung der unteren Außenfläche der Mikrotiterplatte zu vermeiden.
8. 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.
9. Kalibratoren, Kontrollen und Verdünnungspuffer enthalten 0,09 % Natriumazid.
10. 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.

TEST-KIT-KOMPONENTEN

Inhalt EIA-Kit:

- 1 mit CCP-Peptid beschichtete Mikrotiterplatte, versiegelt (12x8 Kavitäten). Gebrauchsfertig.
- 5 Fläschchen mit Kalibratoren, (positives Humanserum, gepoolt (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau).
- 1 Fläschchen mit Referenz-Kontrolle, Humanserum (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau).

- 1 Fläschchen mit Positivkontrolle, Humanserum (1,2 ml). Gebrauchsfertig (blau). (Wert auf dem Etikett in U/ml).
- 1 Fläschchen mit Negativkontrolle, Humanserum (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.

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 auszupacken.
- Jeglichen direkten Lichteinfall auf die Chromogenlösung vermeiden.
- Folgende Phänomene können auf eine Verunreinigung der Reagenzien hindeuten:
Eine Blaufärbung der Chromogenlösung vor dem Pipettieren in die Kavitäten.
Eine schwache oder fehlende Farbreaktion des ersten Kalibrators A (1600 U/ml) E450nm <0,9.

PROBENVORBEREITUNG

Dieser Test kann mit Serum/Plasmaproben 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 37 °C auflösen.

1. Nach Gebrauch alle Reagenzien wieder im Dunkeln bei 2-8 °C aufbewahren.
2. Mit CCP-Peptiden beschichtete Mikrotiterplatte. Gebrauchsfertig.
Überzählige Streifen 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 Humanserum mit Werten ausgedrückt in relativen Einheiten.
Kalibrator A enthält 1600 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 Humanserum, gebrauchsfertig.
10. Negativkontrolle (1,2 ml). Verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig.
11. Positivkontrolle (1,2 ml). Verdünntes Humanserum, 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 A₁, A₂, blank (Leerwert) pipettieren.
2. Im Doppelansatz 100 µl der einzelnen Kalibratoren (B₁, B₂ – F₁, F₂) pipettieren.
3. Im Doppelansatz je 100 µl Negativ- und Positivkontrolle (G₁, G₂- H₁, H₂) 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 \pm 5 Min. bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
9. Das Konjugat aus der Mikrotiterplatte entfernen und gemäß Anleitung waschen.
10. In jede Kavität 100 μ l Substrat pipettieren.
11. 30 Minuten \pm 5 Min. bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
12. In jede Kavität 100 μ l 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 (1600 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).

Das Ergebnis der Positivkontrolle sollte sich in dem Bereich, der auf dem Etikett in U/ml angegeben ist, befinden. Die Negativ-Kontrolle sollte < 25 U/ml liegen. Werden diese Werte nicht erreicht, sind die Testergebnisse ungültig und der Test muss wiederholt werden.

Bei der qualitativen Bestimmung muss der Bindungsindex für die Positivkontrolle zur Referenzkontrolle innerhalb des auf dem Etikett angegebenen Bereiches liegen. Der Bindungsindex der Negativkontrolle muss $< 1,0$ betragen.

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 25-1600 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 1600 U/ml (A), 800 U/ml (B), 200 U/ml (C), 50 U/ml (D) und 25 U/ml (E). Diese Werte wurden von Euro-Diagnostica 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 (1600 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.

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

BEWERTUNGSKRITERIEN**Semi-quantitative Bestimmung**

Proben mit Ergebnissen von < 25 U/ml gelten als negativ. Proben ≥ 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 Euro-Diagnostica 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 festgelegterhoben. Der diagnostische Wert von Anti-CCP Antikörpern für die juvenile Arthritis wurde nicht bestimmt.

Erwartete Ergebnisse

Der RA CCP-Peptid- EIA misst Antikörper, welche spezifisch gegen zyklische synthetische Peptide mit Citrullin-Resten (Anti-CCP) gerichtet sind. Als semi-quantitativer Test ist der RA CCP-Peptid EIA-Test unter Verwendung positiver Patientenserum in relativen Einheiten kalibriert. Die Standardkurve umfasst den Bereich zwischen 25-1600 U/ml. Diese Werte wurden von Euro-Diagnostica 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 und 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 RA CCP-Kits verglichen mit einem anderen CCP-ELISA. Es wurden retrospektiv insgesamt 320 eingefrorene Proben getestet. 175 Proben kamen von RA-Patienten und 145 Proben von normalen Spendern einer Blutbank. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Alternativer ELISA				
Immunoscan RA-CCP-Kit	Positiv	Positiv	Negativ	Gesamt
		135	6	141
	Negativ	1	178	179
	Gesamt	136	184	320

Übereinstimmung Positive (%): $135/136 = 99.3\%$ 95 % CI = 93,2 – 100 %
 Übereinstimmung Negative (%): $178/184 = 96.7\%$ 95 % CI = 81,6 – 99,9 %
 Übereinstimmung, gesamt (%): $313/320 = 97.8\%$ 95 % CI = 93,2 – 100 %

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

Tabelle 2. Klinische Sensitivität und Spezifität. Es wurden retrospektiv insgesamt 1052 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	184	182	2
RA	338	84	254
WG	20	20	0
MP	20	20	0
SLE	70	68	2
Sjögren-Syndrom	17	16	1
IBD	100	97	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyreoiditis	20	20	0
Epstein-Barr-Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	5	5	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
Schistosomiasis	4	4	0
Rubella	5	5	0
Chagas-Krankheit	3	3	0
Sklerodermie	17	16	1
Multiple Sklerose	20	20	0
IDDM	20	20	0
PM/DM	20	20	0
MCTD	20	19	1
Routineproben	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 = 254/338 = 75,1 %

95 % CI = 70,5 – 79,8 %

Klinische Spezifität

Blutspender	= 182/184 = 98.9%	95 % CI = 96,1 – 99,9 %
WG	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100 %
MP	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100 %
SLE	= 68/70 = 97.1 %	95 % CI = 90,1 – 99,7 %
Sjögren-Syndrom	= 16/17 = 94.1 %	95 % CI = 71,3 – 99,8 %
IBD	= 97/100 = 97.0%	95 % CI = 91,5 – 99,4 %
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	95 % CI = 83,9 – 100 %
Thyreoiditis	= 20/20 = 100%	95 % CI = 83,2 – 100 %
Infektionserkrankung	= 84/85 = 98.8%	95 % CI = 93,6 – 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		Mittel		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	1007,4	1,918	240,1	1,179	95,7	0,686
s	128,5	0,05	15,5	0,04	6,7	0,03
VK %	12,8	2,8	6,5	3,3	7,0	4,9
	Niedrig		Niedrig		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	51,7	0,187	33,6	0,128	88,1	0,284
s	4,3	0,01	2,7	0,01	3,8	0,01
VK %	8,4	6,9	8,1	7,3	4,3	3,1

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		Mittel		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	1105,9	1955	257,4	1205	93,1	0,673
s	129,5	0,05	20,2	0,04	5,6	0,04
VK %	11,7	2,6	7,9	3,4	6,0	6,5
	Niedrig		Niedrig		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	52,5	0,313	33,3	0,216	94,9	0,479
s	4,1	0,09	4,8	0,07	16,8	0,14
VK %	7,8	29,4	14,5	30,4	17,7	30,0

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		Mittel		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	1116,6	2,049	255,1	1,266	99,4	0,723
s	136,6	0,10	22,8	0,08	8,7	0,05
VK %	12,2	5,1	8,9	6,0	8,7	6,4
	Niedrig		Niedrig		Niedrig	
	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD	(U/ml)	OD
Mittelwert	47,5	0,407	29,4	0,271	79,6	0,603
s	1,8	0,02	2,2	0,03	3,8	0,04
VK %	3,8	4,6	7,4	9,7	4,8	6,8

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)	Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung
1	1/50	49,1	49,1	100
	1/100	25,5	24,5	104
	1/200	11,4	12,3	93
	1/400	5,7	6,1	93
	1/800	2,7	3,1	88
Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/ml)	Errechnet Konzentration (U/ml)	Verdünnungsbereinigte Wiederfindung (%) diff.
2	1/50	32,0	32,0	100
	1/100	16,4	16,0	102
	1/200	8,7	8,0	109
	1/400	4,2	4,0	105
	1/800	2,1	2,0	104
Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/ml)	Errechnet Konzentration (U/ml)	Verdünnungsbereinigte Wiederfindung (%) diff.
3	1/50	82,0	82,0	100
	1/100	43,6	41,0	106
	1/200	22,2	20,5	109
	1/400	11,0	10,2	107
	1/800	5,2	5,1	101

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/ml), 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.

Kit per test anti-CCP IMMUNOSCAN RA

Kit immunoenzimatico su micropiastra
per la rilevazione
degli autoanticorpi dell'artrite reumatoide
anti-CCP: anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato
Codice RA-96RT
Solo per uso professionale

USO PREVISTO

Il kit per il test anti-CCP Immunoscan RA è un dosaggio immunoenzimatico in fase solida (ELISA) per la rilevazione e il dosaggio semi-quantitativo degli anticorpi IgG diretti contro i 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 RA proposto da Euro-Diagnostica 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 o il plasma 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 siero di origine umana. Anche sono risultati 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. Non usare i componenti dopo la data di scadenza e non mescolare reattivi provenienti da lotti diversi.
7. Ogni pozzetto ha la funzione di una cuvetta per lettura fotometrica: quindi non toccare la superficie inferiore dei pozzetti ed evitare contaminazioni.
8. I risultati ottimali si ottengono seguendo scrupolosamente questo protocollo. È necessario pipettare e lavare con cura per ottenere la massima precisione ed accuratezza.
9. Calibratori, controlli e tamponi di diluizione contengono 0,09% di sodio azide.
10. 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.

CONTENUTO DEL KIT

Contenuto del kit:

- 1 micropiastre sigillata sensibilizzata con il peptide (12x8 pozzetti). Pronta per l'uso.
- 5 flaconi di calibratori (siero 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 (siero umano) (1,2 mL). Pronti per l'uso. Blu (lo specifico valore in U/mL è riportato sull'etichetta).
- 1 flacone di controllo negativo (siero 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.

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.
- I seguenti fenomeni possono indicare una degenerazione dei componenti:
 - colore blu del cromogeno prima della dispensazione nei pozzetti.
 - colore debole o assente del primo calibratore A (1600 U/mL) E450 nm <0,9.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Questo dosaggio si può effettuare su campioni di siero o di plasma. 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 µL di siero con 490 µL di tampone di diluizione in una provetta pulita). Usarne 100 µL 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 37° 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 strip 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 sieri umani prediluiti, con valori espressi in unità arbitrarie.
Il calibratore A contiene 1600 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). Siero umano prediluito, pronto per l'uso.
10. Controllo negativo (1,2 mL). Siero umano prediluito, pronto per l'uso.
11. Controllo positivo (1,2 mL). Siero umano prediluito, 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 μ L).
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 μ L di tampone di diluizione (pozzetti A₁, A₂: bianco).
2. Distribuire in doppio 100 μ L di ogni calibratore (pozzetti B₁, B₂ - F₁, F₂).
3. Distribuire in doppio 100 μ L di controllo negativo e positivo (pozzetti G₁, G₂- H₁, H₂).
4. Distribuire 100 μ L di sieri diluiti dei pazienti nei restanti pozzetti. Tempo massimo di esecuzione per i primi 4 passaggi: 15 minuti.
5. Incubare per 60 min. \pm 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 μ L di coniugato in tutti i pozzetti.
8. Incubare per 30 min. \pm 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 μ L di substrato in tutti i pozzetti.

11. Incubare per 30 min. \pm 5 min. a temperatura ambiente (18-25° C).
12. Aggiungere 100 μ L 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 (1600 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". Il risultato del controllo positivo (U/mL) deve rientrare nell'intervallo riportato sulle etichette ed il controllo negativo deve essere $<$ 25 U/mL. Se questi valori non sono soddisfatti, l'analisi non è valida ed il test deve essere ripetuto.

Per il protocollo qualitativo. Il rapporto fra il controllo positivo ed il controllo di riferimento deve rientrare nei limiti indicati sull'etichetta. Il rapporto fra il controllo negativo ed il controllo di riferimento deve essere $<$ a 1,0.

CALCOLO DEI RISULTATI

Protocollo semi-quantitativo

Sottrarre il valore medio dell'assorbanza dei pozzetti A_1 e A_2 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 1600 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 1600 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 Euro-Diagnostica, 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 (1600 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 A₁ e A₂ 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.

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

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 Euro-diagnostica hanno indicato i seguenti cut-off:

Rapporto fra le assorbanze

< 0,95

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

> 1,0

Interpretazione del risultato

Negativo

Valore limite - si raccomanda di ripetere il saggio

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 RA 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 sieri positivi. La curva standard va da 25 a 1600 U/mL. Tali valori sono stati scelti arbitrariamente da Euro-Diagnostica, 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 CCP RA Immunoscan rispetto ad un ELISA CCP alternativo. In totale sono stati dosati 320 campioni di siero retrospettivi congelati. 175 campioni sono stati prelevati da pazienti affetti da AR e 145 campioni da una banca del sangue. La seguente tabella riepiloga i risultati ottenuti.

ELISA alternativo				
Kit CCP RA Immunoscan	Positivo	Positivo	Negativo	Totale
		135	6	141
	Negativo	1	178	179
Totale	136	184	320	

Tasso di concordanza positiva: $135/136 = 99,9\%$ 95% CI = 93,2 – 100%
 Tasso di concordanza negativa: $178/184 = 96,7\%$ 95% CI = 81,6 – 99,9%
 Tasso di concordanza complessiva: $313/320 = 97,8\%$ 95% CI = 93,2 – 100%

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 1052 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	184	182	2
RA	338	84	254
WG	20	20	0
MP	20	20	0
SLE	70	68	2
Sjogren	17	16	1
IBD	100	97	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	5	5	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 = poliangiite 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 = 254/338 = 75,1 %

95% CI = 70,5 - 79,8 %

Specificità clinica

Donatori di sangue	= 182/184 = 98,9%	95% CI = 96,1 - 99,9%
WG	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
MP	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
SLE	= 68/70 = 97,1 %	95% CI = 90,1 - 99,7 %
Sjogren	= 16/17 = 94,1 %	95% CI = 71,3 - 99,8 %
IBD	= 97/100 = 97,0%	95% CI = 91,5 - 99,4%
Osteoartrite	= 21/21 = 100%	95% CI = 83,9 - 100%
Tiroidite	= 20/20 = 100%	95% CI = 83,2 - 100%
Malattia infettiva	= 84/85 = 98,8%	95% CI = 93,6 - 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		Media		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media.	1007,4	1,918	240,1	1,179	95,7	0,686
S.D.	128,5	0,05	15,5	0,04	6,7	0,03
% C.V.	12,8	2,8	6,5	3,3	7,0	4,9
	Bassa		Bassa		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media	51,7	0,187	33,6	0,128	88,1	0,284
S.D.	4,3	0,01	2,7	0,01	3,8	0,01
%C.V.	8,4	6,9	8,1	7,3	4,3	3,1

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		Media		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media.	1105,9	1955	257,4	1205	93,1	0,673
S.D.	129,5	0,05	20,2	0,04	5,6	0,04
% C.V.	11,7	2,6	7,9	3,4	6,0	6,5
	Bassa		Bassa		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media	52,5	0,313	33,3	0,216	94,9	0,479
S.D.	4,1	0,09	4,8	0,07	16,8	0,14
%C.V.	7,8	29,4	14,5	30,4	17,7	30,0

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		Media		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media.	1116,6	2,049	255,1	1,266	99,4	0,723
S.D.	136,6	0,10	22,8	0,08	8,7	0,05
% C.V.	12,2	5,1	8,9	6,0	8,7	6,4
	Bassa		Bassa		Bassa	
	U/mL	OD	U/mL	OD	U/mL	OD
Media	47,5	0,407	29,4	0,271	79,6	0,603
S.D.	1,8	0,02	2,2	0,03	3,8	0,04
% C.V.	3,8	4,6	7,4	9,7	4,8	6,8

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	49,1	49,1	100
	1/100	25,5	24,5	104
	1/200	11,4	12,3	93
	1/400	5,7	6,1	93
	1/800	2,7	3,1	88
Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/ml)	Concentrazione calcolata (U/ml)	Diff. % recupero % diluizione corretto
2	1/50	32,0	32,0	100
	1/100	16,4	16,0	102
	1/200	8,7	8,0	109
	1/400	4,2	4,0	105
	1/800	2,1	2,0	104
Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/ml)	Concentrazione calcolata (U/ml)	Diff. % recupero % diluizione corretto
3	1/50	82,0	82,0	100
	1/100	43,6	41,0	106
	1/200	22,2	20,5	109
	1/400	11,0	10,2	107
	1/800	5,2	5,1	101

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.

IMMUNOSCAN RA

Kit de testes anti-PCC

Imunoensaio enzimático baseado em placa de
microtitulação para a detecção de
auto-anticorpos específicos (anti-PCC) da artrite reumatóide
(anti-PCC)

Nº de catálogo: RA-96RT

Apenas para utilização profissional

UTILIZAÇÃO

O kit Immunoscan RA anti-PCC é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos IgG para Péptidos Citrulinados Cíclicos (PCC) em soro humano. 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 conjunção 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 RA fabricado pela Euro-Diagnostica 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 ou plasma 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 contêm soro de origem humana. 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. Não utilizar os reagentes para além do seu prazo de validade e não misturar os componentes de lotes diferentes.
7. Cada poço é usado como cuvete óptica. Por conseguinte, não se deve tocar na superfície do fundo dos poços, nem se deve sujar ou danificar os mesmos.
8. 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.
9. Os calibradores, controlos e tampão de diluente contêm 0,09% de azida sódica.
10. 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.

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo do kit-EIA:

- 1 placa de microtitulação de PCC revestida com péptido, fechada (12 x 8 poços). Pronto a utilizar.
- 5 frascos com calibradores (pool de soro humano positivo) (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com soro humano controlo de referência (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul).
- 1 frasco com soro humano controlo positivo (1,2 ml). Pronto a utilizar (azul). (Valor indicado no frasco em U/ml).
- 1 frasco com soro 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.

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.
- A observação dos fenómenos seguintes pode ser sinal da degeneração dos reagentes:
Uma coloração azul da solução de cromogénio antes de se colocar a mesma nos poços.
Uma ausência de coloração ou uma reacção de coloração fraca do primeiro calibrador, 'A' (1600 U/ml) E450 nm <0,9.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Este teste é efectuado em amostras de soro/plasma. 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 37 °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 tiras 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 soro humano positivos, diluídos, com os valores expressos em unidades relativas.
O calibrador A contém 1600 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). Soro humano diluído, pronto a ser utilizado.
10. Controlo de referência (1,2 ml). Soro humano diluído, pronto a ser utilizado.
11. Controlo positivo (1,2 ml). Soro humano diluído, pronto a ser utilizado.

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 A₁, A₂: a branco).
2. Pipetar 100 µl de cada calibrador em duplicado (poços B₁, B₂ – F₁, F₂).
3. Pipetar 100 µl dos controlos negativo e positivo em duplicado (poços G₁, G₂- H₁, H₂).

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. \pm 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. \pm 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. \pm 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 (1600 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.

O resultado do controlo positivo deve enquadrar-se no intervalo indicado no rótulo em U/ml, e o controlo negativo deve ser <25 U/ml. Se tal não acontecer os resultados não são válidos e o teste deve ser repetido.

No caso do protocolo qualitativo, a relação entre o controlo positivo e o controlo de referência deve enquadrar-se no intervalo indicado no rótulo. A relação entre o controlo negativo e o controlo de referência deve ser $<1,0$.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Protocolo semi-quantitativo

Subtrair o valor médio de absorvância dos poços A₁ e A₂ 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 – 1600 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): 1600 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 Euro-Diagnostica, 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 (1600 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 A₁ e A₂ 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.

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

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

Protocolo semi-quantitativo

As amostras com resultados de < 25 U/ml são definidas como sendo negativas. As amostras com resultados ≥ 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 Euro-Diagnostica sugerem o seguinte valor de corte:

Razão de absorvância

< 0,95
 ≥ 0,95 a ≤ 1,0
 > 1,0

Interpretação dos resultados

Negativo
 Limite – recomenda-se a repetição do teste
 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 AR-PCC mede os anticorpos em relação aos péptidos sintéticos com resíduos de citulina (anti-PCC) O EIA péptido da AR-PCC é calibrado no ensaio semi-quantitativo em unidades relativas, utilizando um pool sérico de doentes positivo. A curva normal varia entre 25 e 1600 U/ml. Estes valores forem seleccionados arbitrariamente pela Euro-Diagnostica, 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 RA, em comparação com um ELISA PCC alternativo. Avaliaram-se ao todo 320 amostras de soro retrospectivo congelado. 175 amostras pertenciam a doentes com AR e 148 amostras eram normais, tendo sido extraídas de um banco de sangue. O quadro abaixo contém um resumo dos resultados.

ELISA alternativo				
Kit PCC Immunoscan RA		Positivo	Negativo	Número
	Positivo	135	6	141
	Negativo	1	178	179
	Número	136	184	320

Acordo de percentagens positivas:	$135/136 = 99,3\%$	95% IC = 93,2 -100%
Acordo de percentagens negativas:	$178/184 = 96,7\%$	95% IC = 81,6-99,9%
Acordo de percentagens globais:	$313/320 = 97,8\%$	95% IC = 93,2 -100%

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

Quadro 2. Sensibilidade e especificidade clínica. Avaliaram-se ao todo 1052 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 – 1600 U/ml	Positivo = 25 – 1600 U/ml
Doadores de sangue	184	182	2
AR	338	84	254
GW	20	20	0
PM	20	20	0
LES	70	68	2
Sjogren	17	16	1
DII	100	97	3
Osteoartrite	21	21	0
Tiroidite	20	20	0
Vírus de Epstein Barr	5	5	0
Parvovírus	5	5	0
Micoplasma	9	9	0
Toxoplasma	5	5	0
Tuberculose	5	5	0
Iersiniose	8	8	0
Salmonela	3	3	0
Clamídia	5	4	1
Malária	4	4	0
Borrélia	9	9	0
Sífilis	5	5	0
Endocardite infecciosa	3	3	0
Legionela	4	4	0
TAS	3	3	0
Esquistomiase	4	4	0
Rubéola	5	5	0
Síndrome de Chaga	3	3	0
Escleroderma	17	16	1
Esclerose Múltipla	20	20	0
DMDI	20	20	0
PM/DM	20	20	0
DMTC	20	19	1
Amostras de rotina	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-estrepolisina
 DMDI = diabetes melitus dependente da insulina
 DMTC = doença mista do tecido conjuntivo

Sensibilidade clínica

AR – 254/338 = 75,1%

95% IC = 70,5 -79,8 %

Especificidade clínica

Doadores de sangue	= 182/184 = 98,9%	95% IC = 96,1 -99,9%
GW	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
PM	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
LES	= 68/70 = 97,1 %	95% IC = 90,1 – 99,7 %
Sjogren	= 16/17 = 94,1 %	95% IC = 71,3 -99,8 %
DII	= 97/100 = 97,0%	95% IC = 91,5 -99,4%
Osteoartrite	= 21/21 = 100%	95% IC = 83,9 -100%
Tiroidite	= 20/20 = 100%	95% IC = 83,2 -100%
Doença infecciosa	= 84/85 = 98,8%	95% IC = 93,6 -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		Média		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	1007,4	1,918	240,1	1,179	95,7	0,686
S.D.	128,5	0,05	15,5	0,04	6,7	0,03
%C.V.	12,8	2,8	6,5	3,3	7,0	4,9
	Baixa		Baixa		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	51,7	0,187	33,6	0,128	88,1	0,284
S.D.	4,3	0,01	2,7	0,01	3,8	0,01
%C.V.	8,4	6,9	8,1	7,3	4,3	3,1

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		Média		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	1105,9	1955	257,4	1205	93,1	0,673
S.D.	129,5	0,05	20,2	0,04	5,6	0,04
%C.V.	11,7	2,6	7,9	3,4	6,0	6,5
	Baixa		Baixa		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	52,5	0,313	33,3	0,216	94,9	0,479
S.D.	4,1	0,09	4,8	0,07	16,8	0,14
%C.V.	7,8	29,4	14,5	30,4	17,7	30,0

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		Média		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	1116,6	2,049	255,1	1,266	99,4	0,723
S.D.	136,6	0,10	22,8	0,08	8,7	0,05
%C.V.	12,2	5,1	8,9	6,0	8,7	6,4
	Baixa		Baixa		Baixa	
	U/ml	DO	U/ml	DO	U/ml	DO
Média	47,5	0,407	29,4	0,271	79,6	0,603
S.D.	1,8	0,02	2,2	0,03	3,8	0,04
%C.V.	3,8	4,6	7,4	9,7	4,8	6,8

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	49,1	49,1	100
	1/100	25,5	24,5	104
	1/200	11,4	12,3	93
	1/400	5,7	6,1	93
	1/800	2,7	3,1	88
Amostra	Diluição	Concentração média medida (U/ml)	Concentração calculada (U/ml)	Diluição corrigida % recuperação % dif.
2	1/50	32,0	32,0	100
	1/100	16,4	16,0	102
	1/200	8,7	8,0	109
	1/400	4,2	4,0	105
	1/800	2,1	2,0	104
Amostra	Diluição	Concentração média medida (U/ml)	Concentração calculada (U/ml)	Diluição corrigida % recuperação % dif.
3	1/50	82,0	82,0	100
	1/100	43,6	41,0	106
	1/200	22,2	20,5	109
	1/400	11,0	10,2	107
	1/800	5,2	5,1	101

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.

IMMUNOSCAN RA Anti-CCP Test kit

Enzymimmunoassay för detektion av
Rheumatoid Arthritis specifika autoantikroppar
(anti-CCP)
(Katalog nr RA-96RT)
Endast för professionell användning

ANVÄNDNING

Immunoscan RA anti-CCP är en enzym immuno analys (EIA) för detektion och semikvantifiering 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).

Euro-Diagnostica's Immunoscan RA, 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 RA (anti-CCP) baseras på en ELISA-metod. I testen används mikrotiterplattor med brunnar coatade med citrullinerad syntetisk peptid (antigen). Patientserum eller plasma 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 humant serum. 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 (3,3¹, 5,5¹-tetrametylbensidin) är toxiskt vid inhalation, hudkontakt eller om det sväljs.
6. Kitkomponenter får ej användas efter passerat utgångsdatum eller blandas mellan olika tillverkningssatser.
7. Varje brunn används som optisk kyvett vid slutavläsning. Undvik att vidröra undersidan av brunnarna och förhindra smuts och skada.
8. 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.
9. Kalibratorerna, kontrollerna och spädningsbufferten innehåller 0.09% natriumazid.
10. 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.

KITINNEHÅLL

Innehåll EIA-kit:

- 1 st förseglad (12x8 brunnars) peptidklädd mikrotiterplatta bruksfärdig.
- 5 st kalibratörer (humant serum á 1.2 mL) bruksfärdiga (blå)
- 1 st referenskontroll (humant serum, 1.2 mL) bruksfärdig (blå)
- 1 st positiv kontroll (humant serum, 1.2 mL) bruksfärdig (blå). Koncentration i enheter/mL anges på etiketten.
- 1 st negativ kontroll (humant serum, 1.2 mL) bruksfärdig (blå)
- 1 st konjugatlösning (peroxidase konjugerat anti human IgG 15mL) bruksfärdig (röd)
- 1 st substratlösning TMB (15 mL) bruksfärdig
- 2 st spädningsbuffert (35 mL) bruksfärdiga (blå)

- 1 st stopplösning (15 mL) bruksfärdig
- 2 st tvättbuffert (35 mL) 20 gånger koncentrerad

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.
- Följande fenomen kan vara tecken på nedbrytning av reagenser:
 - Blåfärgning av kromogenlösning före applikation i brunnarna
 - Avsaknad av eller svag färgreaktion i standard A (1600 E/mL) E450nm <0.9

PROVBEREDNING

Detta test utförs på serum eller plasma. För serumprov samlas venöst blod som får koagulera fullständigt. Förvara prover i högst 48 timmar vid 4-8° C. Vid längre förvaring fryses 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 37° C.

1. Samtliga reagenser förvaras mörkt i 2-8°C efter användning.
2. Peptidklädd mikrotiterplatta, bruksfärdig. Återförslut överblivna strips 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 serum, med värden uttryckta i relativa enheter (E/mL). Kalibrator A innehåller 1600 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 serum, färdigspädd lösning.
10. Negativ kontroll (1.2 mL). Humant serum, färdigspädd lösning.
11. Positiv kontroll (1.2 mL). Humant serum, 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 (1600 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”. Resultatet av den positiva kontrollen skall vara inom fastställt område E/mL, se etiketten, och den negativa kontrollen skall vara < 25 E/mL. Om ovanstående krav ej uppnås, är resultaten ogiltiga och testen måste göras om.

För det kvalitativa protokollet beräknas förhållandet mellan den positiva kontrollen och referenskontrollen och skall ligga inom det område som angivits på etiketten. Förhållandet mellan den negativa kontrollen och referenskontrollen skall vara < 1.0 .

UTVÄRDERING AV RESULTAT**Semikvantitativt protokoll**

Subtrahera medelvärdet av absorbansvärdena från brunnarna A_1 och A_2 (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 25-1600 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 1600 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 Euro-Diagnostica, eftersom generell standard för anti-CCP saknas. Prover som ger ett högre värde än kalibrator A (1600 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 medelvärde av absorbansvärdena från brunnarna A₁ och A₂ (blank) från de individuella absorbansvärdena i brunnarna med kontroller och prover.

Beräkna absorbansförhållandet (optical density) för varje enskilt prov.

$$\text{Absorbansförhållande} = \frac{\text{Kontroll eller Prov OD}}{\text{Referenskontroll OD}}$$

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 Euro-Diagnosticas 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 belägg för sjukdom. Det förekommer också att patienter med RA är negativa för/har odetekterbara nivåer av anti-CCP. Antikroppstitern 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 RA EIA detekterar antikroppar riktade mot en syntetisk peptid innehållande citrullin (anti-CCP). Immunoscan RA EIA kalibreras i relativa enheter med hjälp av en pool av positiva patientsera. Standardkurvan sträcker sig från 25 E/mL och 1600 E/mL. Värdena är valda av Euro-Diagnostica, 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 RA anti-CCP och annan CCP ELISA.
 Totalt analyserades 320 sera, 175 prover från RA patienter och 145 prover från blodgivare.
 Resultaten är summerade i tabellen.

Alternativ ELISA				
Immunoscan RA CCP Kit	Positiv	Positiv	Negativ	Totalt
		135	6	141
	Negativ	1	178	179
	Totalt	136	184	320

Sensitivitet:	$135/136 = 99.3\%$	95% KI = 93.2 – 100%
Specificitet:	$178/184 = 96.7\%$	95% KI = 81.6 – 99.9%
Precision:	$313/320 = 97.8\%$	95% KI = 93.2 – 100%

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

Tabell 2. Klinisk sensitivitet och specificitet. Totalt analyserades 1052 sera. Resultaten är summerade i tabellen.

Kontroll och Sjukdomsgrupper	Totalt antal	Negativa < 25 E/mL	Positiva ≥ 25 E/mL
Blodgivare	184	182	2
RA	338	84	254
WG	20	20	0
MP	20	20	0
SLE	70	68	2
Sjögrens syndrom	17	16	1
IBD	100	97	3
Osteoarthritis	21	21	0
Thyroiditis	20	20	0
Epstein Barr Virus	5	5	0
Parvovirus	5	5	0
Mycoplasma	9	9	0
Toxoplasma	5	5	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
Schistosomiasis	4	4	0
Rubella	5	5	0
Chaga's syndrom	3	3	0
Scleroderma	17	16	1
Multipel 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 = 254/338 = 75.1 %

95% KI = 70.5 – 79.8 %

Klinisk specificitet		95% KI =
Blodgivare	= 182/184 = 98.9%	96.1 - 99.9%
WG	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
MP	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
SLE	= 68/70 = 97.1 %	90.1 - 99.7 %
Sjögrens syndrom	= 16/17 = 94.1 %	71.3 - 99.8 %
IBD	= 97/100 = 97.0%	91.5 - 99.4%
Osteoarthritis	= 21/21 = 100%	83.9 - 100%
Thyroiditis	= 20/20 = 100%	83.2 - 100%
Infektionssjukdomar	= 84/85 = 98.8%	93.6 - 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.

	Hög		Mellan		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	1007.4	1.918	240.1	1.179	95.7	0.686
S.D.	128.5	0.05	15.5	0.04	6.7	0.03
% C.V.	12.8	2.8	6.5	3.3	7.0	4.9
	Låg		Låg		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	51.7	0.187	33.6	0.128	88.1	0.284
S.D.	4.3	0.01	2.7	0.01	3.8	0.01
%C.V.	8.4	6.9	8.1	7.3	4.3	3.1

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

	Hög		Mellan		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	1105.9	1955	257.4	1205	93.1	0.673
S.D.	129.5	0.05	20.2	0.04	5.6	0.04
% C.V.	11.7	2.6	7.9	3.4	6.0	6.5
	Låg		Låg		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	52.5	0.313	33.3	0.216	94.9	0.479
S.D.	4.1	0.09	4.8	0.07	16.8	0.14
%C.V.	7.8	29.4	14.5	30.4	17.7	30.0

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

	Hög		Mellan		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	1116.6	2.049	255.1	1.266	99.4	0.723
S.D.	136.6	0.10	22.8	0.08	8.7	0.05
% C.V.	12.2	5.1	8.9	6.0	8.7	6.4
	Låg		Låg		Låg	
	E/mL	OD	E/mL	OD	E/mL	OD
Medelvärde	47.5	0.407	29.4	0.271	79.6	0.603
S.D.	1.8	0.02	2.2	0.03	3.8	0.04
%C.V.	3.8	4.6	7.4	9.7	4.8	6.8

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	49.1	49.1	100
	1/100	25.5	24.5	104
	1/200	11.4	12.3	93
	1/400	5.7	6.1	93
	1/800	2.7	3.1	88
Prov	Spädning	Medelvärde uppmätt koncentration (E/mL)	Beräknad koncentration (E/mL)	Överensstämmelse %
2	1/50	32.0	32.0	100
	1/100	16.4	16.0	102
	1/200	8.7	8.0	109
	1/400	4.2	4.0	105
	1/800	2.1	2.0	104
Prov	Spädning	Medelvärde uppmätt koncentration (E/mL)	Beräknad koncentration (E/mL)	Överensstämmelse %
3	1/50	82.0	82.0	100
	1/100	43.6	41.0	106
	1/200	22.2	20.5	109
	1/400	11.0	10.2	107
	1/800	5.2	5.1	101

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 / 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.,
Citruiline 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 / 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 på etiketterna

	<p>Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Lotto No. Número do lote. Satsnummer.</p>
	<p>Catalogue number. Numéro de catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nr. Codice No. Número de catálogo. Katalognummer.</p>
	<p>Use by. À utiliser avant. Usar antes de. Verfallsdatum. Utilizzare entro. Utilizar até. Utgångsdatum.</p>
	<p>Temperature limitation. Conserver à. Limites de temperatura. Lagertemperatur. Limiti di temperatura. Limites de temperatura. Förvaringstemperatur.</p>
	<p>Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefahr. Rischio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.</p>
	<p>Read instructions for use. Lire le manuel d'utilisation. Leer instrucciones de uso. Siehe Arbeitsanleitung vor Gebrauch. Leggere le istruzioni per l'uso. Ler as instruções de utilização. Läs instruktionsmanualen.</p>
	<p>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 diagnostika.</p>
	<p>Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Tillverkare.</p>
	<p>Number of tests. Nombre de tests. Número de pruebas. Anzahl der Tests. Numero di test. Número de testes. Siffror i symbolen anger antalet test.</p>

Ag	Antigen (coated plate). Antigène (plaque revêtue). Antigeno (placa recubierta). Antigen (beschichtete Platte). Antigene (pozzetti sensibilizzati). Antígeno (placa revestida). Antigen (klädd platta).		
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungspuffer. Diluente. Diluente. Spädningsbuffert.		
BUF	WASH	20X	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. Tvättbuffert koncentrerad 20 gånger
H₂SO₄	0.5M	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). Svavelsyra 0.5 molar (stopplösning).	
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat.		
SOLN	TMB	Solution TMB (substrate solution). Solution de TMB (substrat). Solución TMB (solución substrato). TMB (Substratlösung). Cromogeno (TMB) / Substrato. Solução TMB (solução substrato). Substratlösning, TMB.	
CAL	Calibrator. Étalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Kalibrator.		
+	CONTROL	Positive control. Contrôle positif. Control positivo. Positivkontrolle. Controllo positivo. Controllo positivo. Positiv kontroll.	
-	CONTROL	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Controllo negativo. Negativ kontroll.	
R	CONTROL	Reference control. Contrôle de référence. Control de referencia. Referenzkontrolle. Controllo di riferimento. Controllo de referência. Referenskontroll.	

EURO-DIAGNOSTICA AB
Medeon, SE-205 12 MALMÖ, Sweden
Phone: +46 40 32 11 00, Fax: +46 40 92 31 50
E-mail: info@eurodiagnostica.se
www.eurodiagnostica.com