



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP600

Len pre profesionálne účely



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom (Spojené kráľovstvo)

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

E-mail: shield@axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

Test Axis-Shield Anti-CCP je semi-kvantitatívny/kvalitatívny enzymaticky prepojený imunoabsorpčný test (ELISA) na detekciu imunoglobulínovej (IgG) triedy protilátok špecifických na cyklický citrulínový peptid (CCP) v ľudskom sére (včítane skúmaviek na separáciu séra (SST)) alebo plazmy (EDTA, lítium heparín alebo citran sodný). Detekcia anti-CCP protilátok sa používa ako pomôcka pri diagnostike reumatoidnej artritídy (RA) a mala by sa používať spolu s ďalšími klinickými informáciami. Hladiny auto-protilátky predstavujú v multikritériovom diagnostickom procese, ktorý zahŕňa klinické hodnotenie a laboratórne hodnotenie, jeden parameter.

ÚVOD

Reumatoidná artritída (RA) je častá systémová autoimúnna choroba postihujúca 0,5–1,0 % dospeléj populácie. RA sa vyznačuje chronickým zápalom synóvie, ktorý môže viesť k progresívnej deštrukcii kĺbu a v mnohých prípadoch vedie k invalidite a zníženiu kvality života.¹ Všeobecne sa uznáva zásada, že včasná liečba je nevyhnutná pre prevenciu nezvratného poškodenia kĺbu a preto je dôležité diagnostikovať RA v priebehu choroby tak zavčasu, ako je to len možné.^{2,3} Diagnóza RA sa zakladá predovšetkým na klinických, rádiologických a imunologických charakteristických znakoch. Najčastejším serologickým testom je meranie reumatoidného faktora (RF).⁴ Hoci test RF je značne citlivý, nie je špecifický pre RA, nakoľko RF sa často nachádza aj u zdravých jedincov a pacientov s inými reumatickými a zápalovými ochoreniami, autoimúnnymi chorobami alebo chronickými infekciami.⁵

Po niekoľko rokov prevládal názor, že protilátky anti-perinukleárneho faktora (APF) a keratínu (AKA) sú vysoko špecifické pre RA. Následne bolo oznámené, že obe tieto protilátky reagovali s prírodným filaggrínom a teraz sa o nich hovorí ako o antifilaggrínových protilátkach (AFA).^{6,7,8} Posledné dôkazy ukázali, že všetky tieto protilátky sú namierené proti epitopom obsahujúcim citrulín.⁹ Citrulín je neštandardná aminokyselina, nakoľko počas syntézy proteínu nie je včlenený do proteínov. Citrulín sa však môže generovať cestou post-tranzitívnej modifikácie arginínových zvyškov enzýmom peptidylarginín deimináza (PAD).¹⁰ Roku 1998, Schellekens a spol. oznámili, že protilátky, ktoré reagujú s lineárnymi syntetickými peptidmi obsahujúcimi citrulín, sú vysoko špecifické pre RA v teste na princípe ELISA.¹¹ Následné štúdie preukázali, že cyklické varianty týchto linerárnych peptidov označovaných ako cyklické citrulínované peptidy (CCP) sú rovnako špecifické pre RA, no s vyššou citlivosťou, ako lineárne peptidy.¹² V úsilí ďalej zvýšiť citlivosť testu CCP vymedzená knižnica peptidov obsahujúcich citrulín bola podrobená dôkladnej kontrole sérom RA a bola objavená nová množina peptidov (CCP2), ktorá v porovnaní s testom CCP1 sa vyznačovala prvotriednou výkonnosťou.¹³ V priebehu posledných niekoľkých rokov mnoho publikovaných správ potvrdilo diagnostickú výkonnosť testu CCP2.¹⁴ Zistilo sa, že protilátky anti-CCP, ktoré sa často označujú aj ako protilátky anti-citrulínovaných proteínov/peptidov (ACPA), sa pri ochorení vyskytujú veľmi zavčasu, neraz za neprítomnosti klinických príznakov a mnohé správy naznačovali, že zvýšené hladiny anti-CCP protilátok môžu predpovedať vývoj erozívneho ochorenia.^{15,16,17,18,19,20} Tieto zistenia naznačujú významnú úlohu cyklicky citrulínovaných peptidov v diagnostike RA v ranej etape vývoja choroby.







Roku 2010 boli publikované nové klasifikačné kritériá reumatoidnej artritídy *ACR / EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria*, ktoré nahradili „staré“ kritériá ACR (American College of Rheumatology) z roku 1987, ktoré sa všeobecne považovali za nevhodné pre včasnú diagnózu RA. Revidované klasifikačné kritériá, ktoré spoločne publikovali Americké kolégium pre reumatológiu (American College of Rheumatology – ACR) a Európska liga proti reumatizmu (European League Against Rheumatism – EULAR), odporúčajú použiť bodovací systém so škálou od 0 do 10. Nové klasifikačné kritériá sa musia aplikovať na každého jednotlivca s existujúcou plne vyvinutou synovitiídou (nediferencovanou zápalovou artritídou). Štyrmi doplňujúcimi kritériami sú: počet postihnutých kĺbov, serologická abnormalita, akútna fáza zápalovej reakcie a trvanie príznakov v postihnutých kĺboch. Serologické kritériá po prvý raz zahŕňajú meranie ACPA, ako anti-CCP, ako aj niektoré definície nízko pozitívneho a vysoko pozitívneho serologického výsledku.²¹

Axis-Shield anti-CCP analýza je na teste ELISA založená detekcia autoprottilátok v ľudskom sére alebo plazme zameraná na syntetické cyklické peptidy obsahujúce modifikované zvyšky arginínu (peptidov CCP2). Test predstavuje doplňujúci nástroj v diagnostike pacientov s RA.

PRINCÍP TESTU

Jamky mikrotitračných prúžkov sú potiahnuté vysoko purifikovaným cyklickým citrulínovým peptidom, ktorý obsahuje modifikované zvyšky arginínu. Počas prvej inkubácie špecifické autoprottilátky v zriedenom sére alebo plazme sa naviažu na antigénom potiahnutý povrch. Jamky sa potom opláchnu, aby sa odstránili nenaviazané zložky. Pri druhej inkubácii konjugát – enzýmom označená polyklónna protilátka k ľudskému IgG, naviaže všetky povrchovo naviazané autoprottilátky. Po ďalšom prepláchnutí sú špecifické protilátky vystopované inkubáciou so substrátom. Pridanie zastavovacieho roztoku (stop roztoku) ukončí reakciu, ktorej výsledkom je farebný konečný produkt a množstvo konjugovanej väzby sa meria v jednotkách absorbancie. V kvalitatívnom protokole množstvo väzby konjugátu na jednu vzorku sa porovnáva s väzbou konjugátu u referenčnej kontroly. V semi-kvantitatívnom protokole sa môže koncentrácia protilátok anti-CCP stanoviť interpoláciou krivky dávka–reakcia založenej na kalibrátoroch.

S Ú Č A S T I S Ú P R A V Y

CONJ	1 x 15,0 ml	Kozia polyklonálna protilátka proti ľudskému IgG označená chrenovou peroxidázou, 0,1 % (w/v) p-hydroxyfenyloctová, 0,15 % (w/v) Proclin and 1 % proteínový (bovinný) stabilizátor (w/v) v pufre HEPES. Pripravený na priame použitie. POZOR! VAROVANIE	
SUBS	1 x 15,0 ml	3,3',5,5'-tetrametylbenzidín, tlmivý roztok. Pripravený na priame použitie. Nevystavujte svetlu počas skladovania. POZOR! VAROVANIE	 
SOLN STOP	1 x 15,0 ml	Kyselina sírová 0,25mol/l, vodný roztok Pripravený na priame použitie. POZOR! NEBEZPEČENSTVO	
BUF WASH 10 X	3 x 25,0 ml	Fyziologický roztok pufrovaný fosfátom, 1,3 % (v/v) Tween 20 Nariediť pred použitím.	
MTP 8 x 12	12 mikrotitračných (odlomiteľných) prúžkov po 8 jamkách	Potiahnuté syntetickým cyklicky citrulínovaným peptidom, v zнову zalepiteľnej obalovej fólii s desikantom.	
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25,0 ml	Fosfátový ústojný roztok, proteínový (bovinný) stabilizátor, 0,5 % (w/v) azid sodný. Nariediť pred použitím. POZOR! NEBEZPEČENSTVO	 
CAL 1	1 x 1,0 ml	Fosfátový ústojný roztok, proteínový (bovinný) stabilizátor, < 0,1% (w/v) azid sodný. 0 U/ml. Pripravený na priame použitie.	
CAL 2 - CAL 6	5 x 1,0 ml	Ľudská plazma, fosfátový ústojný roztok, proteínový (bovinný) stabilizátor, < 0,1 % (w/v) azid sodný. 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. Pripravený na priame použitie.	
CONTROL REF	1 x 1,5 ml	Ľudská plazma, ústojný roztok, < 0,1 % (w/v) azid sodný. Pripravený	
CONTROL +	1 x 0,3 ml	Ľudská plazma, < 0,1 % (w/v) azid sodný. Pred použitím zriedzte v pomere 1:100 roztokom na riedenie vzoriek ako u vzoriek.	
CONTROL -	1 x 0,3 ml		

USKLADNENIE ČINIDIEL

Stabilita otvorenej súpravy

Súprava bola otvorená a opakovane použitá pri troch príležitostiach v priebehu troch mesiacov bez akýchkoľvek nežiaducich účinkov na jej výkonnosť. Po použití sa komponenty musia vrátiť a skladovať pri teplote 2-8°C.

Poznámky k manipulácii a postupu

1. Zložky súpravy skladujte pri 2–8 °C a používajte až do uplynutia dátumu expirácie vyznačeného na štítkoch. Nepoužívajte expirované činidlá.
2. Nemiešajte rozdielne čísla šarží.
3. Súpravy nezmrazujte.
4. Koncentrovaný premývací ústojný roztok, koncentrát roztoku na riedenie vzoriek a pozitívne a negatívne kontroly sa musia pre použitím zriediť. Všetky ostatné činidlá sú pripravené na použitie.
5. Zabezpečte, aby mikrobiálna kontaminácia zriedeného premývacieho ústojného roztoku a koncentrovaného roztoku na riedenie vzoriek bola vylúčená a po testovaní vráťte späť do teploty 2–8 °C.
6. Prebytočné (nepoužitú) mikrotitračné prúžky vráťte do obalovej fólie s desikantom. Presvedčte sa, či je uzáver neporušený a vráťte do 2–8 °C až pokiaľ ich znovu nepotrebuje.
7. Nevystavujte substrát svetlu počas skladovania.
8. Vyvarujte sa kontaminácie činidiel. Pri každej manipulácii s činidlom alebo vzorkou použite nový jednorazový hrot pipety.

Indikácie zhoršenia kvality

Substrát musí byť bezfarebný, až slabo bledomodrý. Zákal alebo vyzrážanie v ktorejkoľvek zložke indikuje rozklad a taká zložka sa musí znehodnotiť.

Ak v premývacom roztoku alebo roztoku na riedenie vzoriek sú po vybratí z chladného skladovacieho miesta viditeľné kryštáliky, tieto sa rozpustia inverziou a vyrovnaním na teplotu miestnosti.

Zber a skladovanie vzoriek


Analýza sa odporúča pre testovanie ľudského séra (včítane skúmavky na separáciu séra – SST) alebo vzoriek plazmy (EDTA, lítium heparín alebo citran sodný). Iné typy skúmaviek neboli testované pre použitie v tejto analýze. Nepoužívajte makroskopicky hemolyzované alebo zakalené vzorky. Rozmrazené vzorky pred analýzou dôkladne premiešajte a vyvarujte sa opakovaného zmrazenia a rozmrazenia. Vzorky nedeaktivujte zahrievaním, pretože to môže viesť k nesprávnym pozitívnym výsledkom.

Pri príprave na analýzu dodržujte pokyny výrobcu pre odberové skúmavky. Vzorky sa môžu skladovať nezriedené pri teplote 2–8 °C po dobu štyroch týždňov; pri dlhšom skladovaní skladujte pri teplote –20 °C alebo nižšie. Vzorky zriedené v pomere 1:100 roztokom na riedenie vzoriek sa musia použiť v priebehu 24 hodín po zriedení.

UPOZORNENIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA






Určené len na použitie pri *in vitro* diagnostike.

Bezpečnostné opatrenia

1. Dodržujte dôsledne všetky pokyny uvedené v tejto brožúrke, najmä pri manipulácii a podmienkach skladovania.
2.  Kalibrátory a kontroly obsahujú ľudskú plazmu testovanú analýzami, ktoré schválila FDA pre HBsAg, HIV-1 RNA alebo HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 a anti-HCV alebo HCV RNA a overenú ako nereaktívnu/negatívnu. Keďže žiaden známy test neposkytuje úplnú istotu, že nie sú prítomné žiadne infekčné látky, musia sa kalibrátory a kontroly považovať za potenciálne infekčné a musí sa s nimi manipulovať s rovnakými preventívnymi opatreniami, ako s každým biologicky nebezpečným materiálom. Spôsob, ako sa má s týmito materiálmi nárábať v súlade so zásadami správnej klinickej praxe, je opísaný v smernici „Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections” (Ochrana pracovníkov laboratórií pred infekciami získanými pri výkone profesie) (M29-A3 – Third Edition/3. vydanie),²² schválenej Ústavom klinických a laboratórnych noriem (The Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI).
3. Nepipetujte ústami.
4. V priestoroch, v ktorých sa manipuluje so súpravami a vzorkami, nefajčite, nejedzte, nepite, ani nepoužívajte kozmetiku.
5. Všetky kožné neduhy, rezy, odreniny a iné kožné lézie musia byť primerane chránené.
6. Kalibrátory, kontroly a koncentráty roztokov na riedenie vzoriek obsahujú azid sodný, ktorý v odpadovom potrubí môže reagovať s olovom alebo meďou a vytvárať výbušné azidy týchto kovov. Pri likvidácii splachujte veľkým množstvom vody, aby ste zabránili hromadeniu azidov.

7. Karty bezpečnostných údajov o všetkých nebezpečných zložkách v tejto súprave vám na vyžiadanie poskytne Axis-Shield Diagnostics.

Upozornenie: Federálne zákony vyhradujú toto zariadenie na predaj lekárovi alebo na jeho objednávku.

 Varovanie Konjugát	<u>Varovanie</u> H317 – <u>Prevenca</u> P272 - P280 - P363 -	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Je zakázané vyniesť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.
 Varovanie Substrát	<u>Varovanie</u> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 – <u>Prevenca</u> P260 – P280 – <u>Odpoveď</u> P301+310 – P304+340 – P305+351+338 –	Škodlivý po požití. Škodlivý pri kontakte s pokožkou. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Škodlivý pri vdýchnutí. Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest. Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO POŽITÍ: okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. PO VDÝCHNUTÍ: Ak nastanú ťažkosti s dýchaním, presuňte postihnutého na čerstvý vzduch a nechajte ho oddychovať v polohe, ktorá mu umožní pohodlné dýchanie. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
  nebezpečenstvo Roztok na riedenie vzoriek	<u>Varovanie</u> H302 – H318 – H412 – EUH032 – <u>Prevenca</u> P264 – P280 – <u>Odpoveď</u> P301+310 – P305+351+338 – P330 –	Škodlivý po požití. Spôsobuje vážne poškodenie očí. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje veľmi toxický plyn. Po manipulácii starostlivo umyte ruky. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO POŽITÍ: okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Vypláchnite ústa
 nebezpečenstvo Zastavovací roztok	<u>Varovanie</u> H314 – <u>Prevenca</u> P260 – P273 – P280 – <u>Odpoveď</u> P301+330+331 – P303+361+353 – P304+340 – P305+351+338 –	Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO POŽITÍ: vypláchnite ústa. Nevyvolávajte zvracanie. PRI KONTAKTE S POKOŽKOU (alebo vlasmi): Odstráňte/vyzlečte všetky kontaminované časti odevu. Pokožku ihneď opláchnite vodou/sprchou. PO VDÝCHNUTÍ: Ak nastanú ťažkosti s dýchaním, presuňte postihnutého na čerstvý vzduch a nechajte ho oddychovať v polohe, ktorá mu umožní pohodlné dýchanie. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo

vyplachovaní.

PRÍPRAVA

Materiály/zariadenie potrebné, ale nedodávané

1. Čítačka 96-jamkovej platničky/prúžku so 450 nm filtrom.
2. Mikropipety na dávkovanie 10 µl, 100 µl, 1 ml. Automatická pipeta na dávkovanie 100 µl. Automatická pipeta na dávkovanie 300 µl na ručné preplachovanie; voliteľná automatická premývačka platničiek.
3. Odmerné valce zo skla alebo plastu: 1×100 ml, 1×500 ml.
4. Nádobky o objeme 1 ml.
5. Destilovaná/deionizovaná voda.
6. Papierové utierky.
7. Časovač 30- a 60-minútových intervalov.

Príprava na analýzu

Umožnite všetkým zložkám súpravy, vrátane mikrotitračných prúžkov, aby sa po dobu 30–60 minút pred použitím ohriali na 18–25 °C. Premiešajte činidlá jemným prevracaním.

Neriedte referenčnú kontrolu.

Nasledujúce činidlá zriedte a dôkladne premiešajte.

Činidlo	Objem	Pridať
Premývací puľfovaný koncentrát	1 ampulka	225 ml destilovanej/deionizovanej vody
Koncentrovaný roztok na riedenie vzoriek	1 ampulka	100 ml destilovanej/deionizovanej vody
Pozitívne a negatívne kontroly/vzorky	10 µl	1 ml roztoku na riedenie vzoriek

Vypočítajte počet mikrotitračných prúžkov, ktoré potrebujete pre aktuálnu analýzu a umiestnite ich do držiaka mikrotitračných prúžkov. Zvyšné prúžky vráťte do znovu zalepiteľnej obalovej fólie s desikantom a uskladnite pri teplote 2–8 °C, až kým opäť nepotrebujete. Zabezpečte, aby všetky prúžky boli bezpečne uchytené v držiaku mikrotitračných prúžkov. Pre uľahčenie identifikácie môžu používatelia chcieť očíslovať každý prúžok pozdĺž vrchného okraja. Uchovajte držiak mikrotitračných prúžkov pre ďalšie použitie.

TESTOVACÍ PROTOKOL

Kvalitatívny protokol: analýza referenčných kontrol, pozitívne a negatívne kontroly a vzorky.

Semikvantitatívny protokol: analýza kalibrátorov (1–6), pozitívne a negatívne kontroly a vzorky.

1. Referenčné jamky pre identifikáciu.
2. Napipetujte dvojmo do vhodných jamôk po 100 µL referenčného kontrolného roztoku/kalibračných roztokov a predriedené (1:100) pozitívne a negatívne kontrolné roztoky. Napipetujte buď do jednej alebo do dvoch vhodných jamôk po 100 µL predriedenej (1:100) pacientovej vzorky. Odporúča sa vzorky testovať dvojmo, no postup je voliteľný podľa pravidiel daného laboratória. Tento krok by nemal prekročiť dobu **10 minút** pre každú jednu súpravu kalibrátorov/ kontrol/vzoriek.
3. Inkubujte 60 ± 10 minút pri 18–25 °C.
4. Obsah prúžkov zlejte rýchlym prevrátením nad výlevkou vhodnou pre znehodnotenie biologických materiálov, pričom majte na pamäti možné nebezpečenstvo infekcie vzorkami. Vysajte prevrátené prúžky dôkladne pomocou papierových utierok.

5. Jamky prepláchnite **štyri razy** minimálne 300 µl zriedeného ústojného roztoku. **Zlejte a vysušte po každom prepieracom kroku.**
6. Do každej jamky pridajte 100 µl konjugátu.
7. Inkubujte 30 ± 5 minút pri 18–25 °C.
8. Zopakujte kroky 4 a 5.
9. Do každej jamky pridajte 100 µl substrátu.
10. Inkubujte 30 ± 5 minút pri 18–25 °C. **Nezlejte.**
11. Do každej jamky pridajte 100 µl zastavovacieho roztoku, a to v rovnakom poradí a miere, ako ste pridali substrát. Jamky jemne poklepte, aby sa ich obsah premiešal a zabezpečte, aby v ňom neboli žiadne viditeľné bublinky.
12. Prúžky odčítajte pri 450 nm.
13. Analýzu odčítajte do 60 minút po ukončení testu.

V Ý P O Č E T A I N T E R P R E T Á C I A V Ý S L E D K O V

Keď počítate a interpretujete výsledky, zhodnoťte každú analýzu zvlášť.

Kvalitatívny protokol

Vypočítajte strednú hodnotu absorbančie (optickej hustoty) pre pozitívne a negatívne kontroly a pre každú (strednú) vzorku k priemernej hodnote absorbančie referenčnej kontroly:

$$\text{Pomer absorbančie} = \frac{\text{Stredná hodnota kontrolnej absorbančie}}{\text{Stredná referenčná hodnota kontrolnej absorbančie}}$$

$$\text{Pomer absorbančie} = \frac{\text{(Stredná) hodnota absorbančie vzorky}}{\text{Stredná referenčná hodnota kontrolnej absorbančie}}$$

Používatelia musia počítať medznú hodnotu medzi pozitívnymi a negatívnymi vzorkami, ktorá je špecifická pre populáciu ich pacientov. Výsledky populácie pacientov obvyklej v klinických skúšaníach Axis-Shield podnecujú k nasledujúcim hodnotám cut-off:

<u>Pomer absorbančie</u>	<u>Interpretácia výsledku</u>
< 0,95	negatívny
≥ 0,95 až ≤ 1,0	Hraničná hodnota – odporúča sa opakovanie testovania
> 1,0	pozitívny

Semikvantitatívny protokol

Na vhodný grafický papier vyneste hodnotu absorbančie každého kalibračného roztoku oproti log₁₀ koncentrácie kalibračného roztoku (pozri nasledujúcu tabuľku). Z kalibračnej krivky sa potom dajú odčítať stredné koncentrácie pozitívnych a negatívnych kontrol a (stredných) vzoriek; nižšie je zobrazená typická kalibračná krivka pre referenčné účely, tento sa však nesmie používať na interpretáciu výsledkov. Aproximácia štvorparametrovou logistickou krivkou (4PL) alebo kubickými splajnami je dostačujúca. Iné modely líčovania krivky sa neodporúčajú.

Vzorky s absorbančiami nad kalibrátorom 6 (300 U/ml) sú mimo rozsahu analýzy a mali by byť zaznamenané ako > 300 U/ml, zriedené a znovu analyzované, k čomu sa upraví ďalší riediaci faktor.

Pre interpretáciu semi-kvalitatívnych výsledkov a na základe referenčných údajov pozorovaného sáboru Axis-Shield* navrhuje sa nasledovné:

<u>Výsledok (strednej) vzorky</u>	<u>Interpretácia výsledku</u>
≤ 5 U/mL	Negatívny
> 5 U/mL	Pozitívny

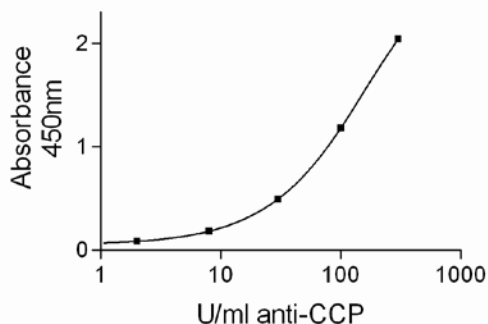
* Toto je navrhnuté len ako návod. Odprúča sa, aby užívatelia stanovili referenčný rozsah, ktorý môže byť pre tento pozorovaný súbor jedinečný.

Poznámka: Ako iné analýzy zamerané na meranie protilátok, aj táto analýza určuje skôr aktivitu protilátok prítomných vo vzorke ako ich koncentráciu. Aktivita môže byť ovplyvnená množstvom parametrov, ako je avidita protilátok.

Koncentrácie kalibrátorov

Číslo kalibrátora	Koncentrácia U/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Typická kalibračná krivka



KONTROLA KVALITY

Zabezpečte, aby sa primeraná údržba a kalibrácia platničkovej čítačky vykonávala podľa pokynov výrobcu, a aby sa používala správna vlnová dĺžka.

Používatelia musia zaistiť, aby boli plne oboznámení s návodom na analýzu, najmä s časťou Upozornenia a Bezpečnostné opatrenia a s poznámkami, ktoré sa týkajú manipulácie a postupu. Používatelia by mali pred oznámením výsledkov analýz pacientov preukázať, že dokážu získať špecifikácie výkonnosti pre presnosť a nahlásiteľný rozsah výsledkov testov porovnateľných s tými, ktoré stanovil výrobca. Odporúča sa, aby predriedené pozitívne a negatívne kontroly boli vo všetkých analýzach spracované dvojmo, aby sa monitorovala kvalita postupu. Referenčnú kontrolu pripravenú na použitie analyzujte dvojmo vo všetkých kvalitatívnych analýzach.

Ak predpokladáme, že sa podarilo dosiahnuť špecifikácie presnosti určené výrobcom, potom okolnosť, že niektorá kontrola nedosiahla špecifikácie pomeru kontroly robí analýzu neplatnou a výsledky pacienta sa nesmú zaznamenať. Operátor môže analýzu zopakovať po skontrolovaní jej postupu alebo po kontakte s dodávateľom/výrobcom. Ak analýzu opakujete, pripravte čerstvé nariadenie každej kontroly a vzorky. Niektoré laboratória si môžu želať, aby sa do každej analytickej procedúry zahrnuli jeho vlastné kontroly. Takýto kontrolný materiál skladujte pri teplote -20 °C alebo nižšej a vyhnite sa opakovaným cyklom zmrazenia a rozmrazenia. Konzervanty ako azid sodný 0,1 % (w/v) nemajú na výsledky vzoriek žiaden vplyv.

Hladiny analytov zistené u osobitných chorôb sú hladiny stanovené výrobcom pre špecifické populácie a nemusia nevyhnutne odzrkadľovať hodnoty uvedené v literárnych prameňoch. Výskyt hladín, ich vzťah k osobitným nemociam, referenčné rozsahy a vhodné body cut-off sa musia vypočítať pre špecifické populácie, ktorým poskytuje svoje služby daný používateľ.

Špecifikácie pomeru kontroly

Protokol	Technické údaje
Kvalitatívne (pomery)	$\frac{\text{Absorbancia pozitívnej kontroly}}{\text{Absorbancia referenčnej kontroly}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Absorbancia negatívnej kontroly}}{\text{Absorbancia referenčnej kontroly}} < 0,95$
Semikvantitatívny	Pozri štítok liekovky pozitívnej kontroly pre prijatie predpokladaného rozsahu (U/ml)
	Koncentrácia negatívnej kontroly < 2 U/ml

OČAKÁVANÉ HODNOTY

200 vzoriek séra z asymptomaticky zjavne zdravých darcov s vekovým rozpätím 18–72 rokov, obsahujúcich približne rovnaké počty mužov [n = 105] a žien [n = 95], bolo testovaných analýzou anti-CCP (FCCP 200) firmy Axis-Shield.

Neboli pozorované žiadne rozdiely pripísateľné pohlaviu alebo veku (vypočítané porovnávacie vekové rozpätia ≤ 40 rokov [n = 115] a > 40 rokov [n = 85]).

Celková priemerná koncentrácia anti-CCP u tejto populácie bola $0,63 \pm 0,419$ U/ml (rozsah 0,05-3,8 U/ml).

Na základe týchto referenčných populačných údajov a údajov klinickej populácie navrhovaný cut-off analýzy je:

<i>Referenčný rozsah</i> ≤ 5 U/ml = negatívny > 5 U/ml = pozitívny

Tento referenčný rozsah sa navrhuje len ako vodidlo a každé laboratórium si musí stanoviť referenčný rozsah, ktorý môže byť jedinečný pre danú populáciu, ktorú obsluhuje, v závislosti od zemepisných, pacientových, diétnych, environmentálnych faktorov alebo klinickej praxe. Pamätajte si, prosím, že výskyt reumatoidnej artritídy u žien je dvojnásobne väčší ako u mužov.

TECHNICKÉ ÚDAJE

Linearita riedenia

Axis-Shield anti-CCP test je navrhnutý tak, aby bol lineárny naprieč meracím rozsahom od LOD po 300 U/ml.

Na základe štúdie uskutočnenej podľa smerníc dokumentu EP6-A vydaného CLSI,²³ Axis-Shield anti-CCP test preukázal linearitu od 1,04 U/ml po 300 U/ml.*

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť

Vzorky > 300 U/ml prejavujú priemernú návratnosť $\leq 100\% \pm 15\%$ * z očakávaných výsledkov, keď sú zriedené tak, aby sa nachádzali v rozsahu analýzy a s použitím správneho riediaceho faktora.

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť

Klinická citlivosť a špecifickosť

Klinická citlivosť Axis-Shield anti-CCP testu (FCCP600) bola stanovená u 229 jedincov s potvrdenou RA, a klinická špecifickosť bola stanovená u 285 non-RA vzoriek (135 vzoriek bolo od pacientov s inou reumatickou a nereumatickou poruchou a 150 od asymptomaticky zjavne zdravých jedincov). S použitím cut-off s 5,0 U/ml bola vypočítaná citlivosť 78 % so špecifickosťou 99 %. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách.*

Kategória vzoriek	Celkom n	Pozitívny N	% senzitivity
RA	229	179	78

Kategória vzoriek	Celkom n	Pozitívny n	% špecifickosti
Non-RA vzorky celkom	285	4	98,6
Non-RA zdraví asymptomatickí	150	1	99,3
Vzorky non-RA nemoce ⁺	135	3	97,8

⁺ Klinická špecifickosť pre 135 vzoriek od pacientov s inými reumatickými a nereumatickými poruchami sú kategorizované v nasledovnej tabuľke.*

Porovnanie metód

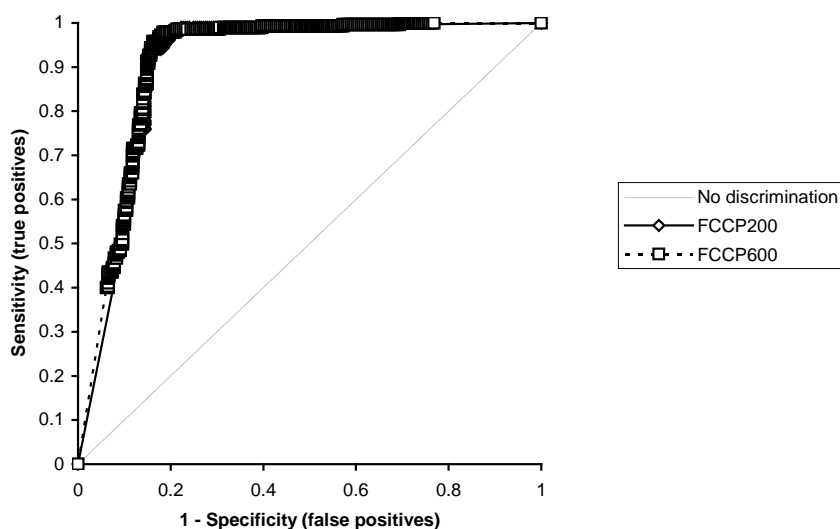
Axis-Shield anti-CCP test (FCCP600) je dimenzovaný tak, aby v porovnaní s komparátorom Axis-Shield anti-CCP test (FCCP200) sa zhodoval u $\geq 99\%$ u RA a non-RA vzoriek. RA a non-RA vzorky opísané v časti Klinická citlivosť a špecifickosť sa používajú k porovnaniu Axis-Shield anti-CCP testu (FCCP600) s Axis-Shield anti-CCP testom (FCCP200). Cut-off použitý pri Axis-Shield anti-CCP teste (FCCP200) bol 5,0 U/ml, ako je uvedené v príbalovom letáčku výrobcu. Pri použití cut-off 5,0 U/ml pre Axis-Shield anti-CCP test (FCCP600) bola vypočítaná 99 % zhoda. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách.*

Všetky vzorky (514)		FCCP200	
		Pozitívny	Negatívny
FCCP600	Pozitívny	179	4
	Negatívny	1	330

Porovnanie metód	FCCP600 vs FCCP200
Počet vzoriek	65
Strmosť regresnej línie	0,910
Úsek na súradnicovej osi Y	1,226
Korelačný koeficient	0,94

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť.

S použitím vyššie uvedených dát získaných pre obe analýzy sa uskutočnila analýza ROC (Receiver Operator Characteristic). Plocha pod krivkou (AUC) pre Axis-Shield anti-CCP test (FCCP600) bola 0,910 (95 % interval spoľahlivosti: 0,881–0,940) a 0,903 (95 % interval spoľahlivosti: 0,871–0,934) pre komparátor Axis-Shield anti-CCP test (FCCP200), čo dokazuje, že oba testy sú porovnateľné z hľadiska ich klinickej diferenciácie. Krivka analýzy ROC je zobrazená nižšie.*



* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť.

Presnosť

Na základe smernice CLSI (formálne NCCLS) dokumentu EP5-A2²⁴ sa uskutočnila štúdia. Dve anti-CCP kontroly, šesť článkov QC panelu a jedna vzorka ľudského séra boli analyzované s použitím činidiel dvoch šarží, v dvoch replikách a dvoch rozdielnych časoch denne po dobu 20 dní (n=80). Údaje z tejto štúdie sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke ako priemerné údaje (zaokrúhlené na 1 desatinné miesto):

Vzorka	Súprava Šarža	n	Priemer (U/ml)	V priebehu analýzy		Medzi analýzami		Medzi dňami		Celkom	
				SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV

Pozitívna kontrola	001	80	20,30	1,05	5,2	1,24	6,1	0,00	0,0	1,63	8,0
	003		20,62	0,43	2,1	1,20	5,8	0,00	0,0	1,27	6,2
QC 1	001	80	3,72	0,33	8,8	0,17	4,5	0,13	3,6	0,39	10,5
	003		3,92	0,23	5,8	0,35	8,9	0,04	1,1	0,42	10,7
QC 2	001	80	8,17	0,34	4,2	0,72	8,8	0,00	0,0	0,80	9,8
	003		8,47	0,30	3,6	0,70	8,3	0,25	2,9	0,80	9,5
QC 3	001	80	15,30	0,37	2,4	0,93	6,0	0,30	1,9	1,04	6,8
	003		15,98	0,36	2,2	0,92	5,8	0,00	0,0	0,99	6,2
QC 4	001	80	53,55	2,30	4,3	3,19	6,0	1,71	3,2	4,29	8,0
	003		55,49	2,36	4,2	3,35	6,0	0,00	0,0	4,09	7,4
QC 5	001	80	94,26	3,17	3,4	7,31	7,8	2,01	2,1	8,22	8,7
	003		97,15	2,61	2,7	5,56	5,7	4,79	4,9	7,79	8,0
QC 6	001	80	134,77	4,58	3,4	5,84	4,3	5,74	4,3	9,38	7,0
	003		142,41	5,69	4,0	9,02	6,3	0,00	0,0	10,67	7,5
Ref Kontrola	001	80	5,18	0,34	6,6	0,24	4,6	0,21	4,0	0,46	9,0
	003		5,09	0,26	5,1	0,21	4,1	0,21	4,2	0,39	7,7
Vzorka 1	001	80	4,83	0,16	3,3	0,38	7,9	0,24	5,0	0,48	9,9
	003		4,77	0,20	4,1	0,37	7,8	0,25	5,2	0,49	10,2

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť

Hranica detekcie

Zistilo sa, že hranica detekcie (limit of detection – LOD) Axis-Shield anti-CCP testu podľa dokumentu EP17-A, vydaného CLSI (formálne NCCLS)²⁵, je 1,04 U/ml.*

Stanovenia LOD boli vykonané s použitím jednej negatívnej anti-CCP vzorky (60 replík) a šiestich nízko úrovňových anti-CCP vzoriek (každá mala 15 replík).*

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť.

Efekt vysokej dávky (hook effect)

Efekt vysokej dávky (hook effect) je fenomén, pri ktorom sa vzorky s vysokou hladinou môžu interpretovať v rámci dynamického rozsahu analýzy. U Axis-Shield anti-CCP testu nebol tento efekt vysokej dávky pozorovaný pri testovaní vzorky obsahujúcej približne 3000 U/ml protilátok anti-CCP.*

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť.

Interferencia

Analýza Axis-Shield Anti-CCP testu je dimenzovaná tak, aby maximálna odchýlka koncentrácie anti-CCP vplynula z obsahu nasledujúcich potenciálne rušivých zlúčenín:

- $\pm 15\%$ pre koncentrácie anti-CCP $\geq 10,0$ U/ml
- $\pm 10\%$ pre koncentrácie anti-CCP $\geq 4,0$ U/ml až $< 10,0$ U/ml
- $< 0,75$ U/ml pre koncentrácie anti-CCP $< 4,0$ U/ml

Na základe smernice dokumentu EP7-A2²⁶, vydaného Ústavom klinických a laboratórnych noriem (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) sme uskutočnili štúdiu Axis-Shield Anti-CCP testu. Šesť vzoriek s hladinami anti-CCP naprieč rozsahu analýzy bolo doplnených potenciálne rušivými zlúčeninami, ktorých zoznam je uvedený v tabuľke nižšie. V štúdiu bola maximálna odchýlka v koncentrácii anti-CCP pozorovaná u vzoriek siahajúcich od:

- $-9,4\%$ až $3,3\%$ u koncentrácií anti-CCP $\geq 10,0$ U/ml
- $-7,3\%$ až $4,8\%$ u koncentrácií anti-CCP $\geq 4,0$ U/ml až $< 10,0$ U/ml
- $-0,6$ U/ml až $0,05$ U/ml u koncentrácií anti-CCP $< 4,0$ U/ml *

Potenciálne interferujúce látky	Žiadna interferencia nebola nájdená až do nasledujúcich koncentrácií
---------------------------------	--

hemoglobín	4 mg/ml
bilirubín	0,2 mg/ml
triglyceridy (roztok Intralipidu)	15 mg/ml
reumatoidný faktor	200 IU/ml
celkový proteín (gamaglobulíny)	120 mg/ml

* Priemerné údaje, od ktorých sa výsledky dosiahnuté v jednotlivých laboratóriách môžu líšiť.

O B M E D Z E N I A P R I P O U Ž I T Í

1. Hoci prítomnosť protilátok proti CCP je spojená s reumatoidnou artritídou, samotný pozitívny výsledok nie je sám osebe diagnózou, ale údaje sa musia posúdiť vo svetle iných klinických a laboratórnych nálezov.
2. Niektorí jedinci môžu mať vysoké hladiny anti-CCP látok s malým alebo nijakým dôkazom klinického onemocnění. Naproti tomu niektorí pacienti s aktívnou chorobou môžu mať detegovateľné hladiny týchto protilátok. Klinický význam tejto informácie je v súčasnosti nejasný.
3. Keďže výsledok stanovenia anti-CCP nie je diagnostickým dôkazom prítomnosti alebo absencie klinickej choroby, terapia sa nesmie začať iba na základe pozitívnych výsledkov anti-CCP.
4. Iniciácia alebo zmeny liečby sa nesmú opierať iba o zmeny v koncentrácii autoprottilátok anti-CCP, ale skôr o klinické pozorovania.
5. Klinická účinnosť monitorovania hladín autoprottilátok CCP ako indikácia progresie/remisie reumatoidnej artritídy nebola doposiaľ definovaná.
6. Hodnota anti-CCP u juvenilnej artritídy nebola zatiaľ stanovená.
7. V dôsledku špecifických vlastností interakcií antigénu a protilátky neurčuje sa koncentrácia protilátok, ale ich aktivita. Keďže sérum pacienta obsahuje heterogénne populácie protilátok, niektoré vzorky môžu prejavovať nelinearitu, najmä pri veľmi vysokých zriedeniach vzoriek.

POUŽITÁ LITERATÚRA

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

Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom
(Spojené kráľovstvo)

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

E-mail: shield@axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com



IVD

Diagnostický lekársky prípravok *in vitro*

REF

Katalógové číslo

LOT

Šarža



96 testov



Pozor



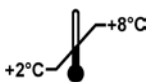
Pozri návod na použitie



Chráňte pred svetlom



Použiť do



Skladujte pri 2–8 °C

Rx Only

Iba na lekársky predpis



Výrobca:

CONTROL +

Pozitívna kontrola

CONTROL -

Negatívna kontrola

CONJ

Konjugát

SUBS

Substrát

SOLN STOP

Zastavovací roztok

BUF WASH 10 X

Premývací pufo

MTP 8 x 12

Mikrotitračné (odlomiteľné) prúžky

SAMPLE DIL 5 X

Roztok na riedenie vzoriek

CAL 1

Kalibrátor 1

CAL 2 - CAL 6

Kalibrátor 2–6

CONTROL REF

Referenčná kontrola