



**A x i s - S h i e l d**

**Anti-CCP**

**IVD**



**REF FCCP600**

**Kun til professionel anvendelse**



**Axis-Shield Diagnostics Limited**

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, Storbritannien.

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

*E-mail:* [shield@axis-shield.com](mailto:shield@axis-shield.com)

*Web:* [www.axis-shield.com](http://www.axis-shield.com)

Axis-Shield Anti-CCP-analysen er en semikvantitativ/kvalitativ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) til detektion af IgG-klassen af autoantistoffer specifikke for cyklisk citrullineret peptid (CCP) i humant serum (herunder serum-separationsrør) eller plasma (EDTA, lithium-heparin eller natriumcitrat). Detektion af anti-CCP-antistoffer anvendes til at hjælpe med at diagnosticere reumatoid arthritis (RA), og bør anvendes sammen med anden klinisk information. Autoantistof-niveauer repræsenterer en parameter i en diagnostisk procedure med mange kriterier, der omfatter både kliniske og laboratoriebaserede vurderinger. Til in-vitro diagnostisk brug.

## INDLEDNING

Reumatoid arthritis (RA) er en almindelig, systemisk autoimmun-sygdom, som rammer 0,5-1,0 % af den voksne population. RA er karakteriseret ved kronisk inflammation af synovialmembranen, hvilket kan føre til progressiv nedbrydning af led, og kan i mange tilfælde føre til handicap og nedsat livskvalitet.<sup>1</sup> Det er generelt accepteret, at tidlig intervention er afgørende for at undgå irreversibel ledskade, og det er derfor vigtigt at diagnosticere RA så tidligt i sygdomsforløbet som muligt.<sup>2,3</sup> Diagnosen af RA er primært baseret på kliniske, radiologiske og immunologiske egenskaber. Den hyppigste serologiske analyse er måling af reumatoid faktor (RF).<sup>4</sup> Selvom RF-analysen har en god følsomhed, er den ikke specifik for RA, da RA ofte forefindes hos raske personer, og hos patienter med andre reumatiske eller inflammatoriske sygdomme, autoimmun-sygdomme eller kroniske infektioner.<sup>5</sup>

Det har i flere år været kendt, at antistoffer mod anti-perinuklær faktor (APF) og keratin (AKA) er meget specifikke for RA. Det blev senere rapporteret, at begge disse antistoffer reagerede med naturligt filaggrin, og de kaldes nu anti-filaggrin-antistoffer (AFA).<sup>6,7,8</sup> Det blev for nyligt vist, at alle disse antistoffer er rettet mod citrullin-indeholdende epitoper.<sup>9</sup> Citrullin er ikke en standard aminosyre, da den ikke indbygges i proteiner under proteinsyntesen. Den kan dog blive dannet via post-transitional modifikation af arginin-dele af enzymet peptidylarginindeiminase (PAD).<sup>10</sup> I 1998 rapporterede Schellekens og kolleger, at autoantistoffer, som reagerer med lineære syntetiske peptider indeholdende citrullin er højstspecifikke for RA i en ELISA-baseret analyse.<sup>11</sup> Efterfølgende undersøgelser viste, at cykliske varianter af disse lineære peptider, benævnet cykliske citrullinerede peptider (CCP) var lige så specifikke for RA, men med en højere følsomhed end de lineære peptider.<sup>12</sup> I bestræbelserne på yderligere at forbedre følsomheden af CCP-analysen, blev et dedikeret bibliotek af citrullin-indeholdende peptider screenet med RA-sera, og et nyt sæt af peptider (CCP2) blev opdaget, med bedre præstation sammenlignet med CCP1-analysen.<sup>13</sup> I løbet af de sidste par år har mange publicerede rapporter bekræftet den diagnostiske præstation af CCP2-analysen.<sup>14</sup> Anti-CCP-antistoffer, som ofte også benævnes anti-citrullinerede protein/peptid-antistoffer (ACPA'er) har vist sig at være til stede på et meget tidligt tidspunkt i sygdommen, ofte med fravær af kliniske symptomer, og mange rapporter indikerer, at forhøjede niveauer af anti-CCP-antistoffer kan forudsige den udviklingen af den eroderende sygdom.<sup>15,16,17,18,19,20</sup> Disse fund tyder på en vigtig rolle af cykliske citrullinerede peptider i diagnosen af RA på et tidligt stadium i sygdomsforløbet.







I 2010 blev *ACR / EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria* publiceret, og erstattede de "gamle" ACR-kriterier fra 1987, som i vidt omfang ikke blev anset for passende til den tidlige diagnose af RA. De reviderede klassifikationskriterier, som American College of Rheumatology (ACR) og European League Against Rheumatism (EULAR) publicerede i fællesskab, anbefaler et pointscoringssystem på mellem 0 og 10. De nye klassifikationskriterier skal anvendes til alle personer, der udviser definitive tegn på synovitis (udifferentieret inflammatorisk arthritis). De fire ekstra kriterier var antallet af involverede led, serologisk abnormalitet, akut-fase respons og varigheden af symptomer i de involverede led. For første gang omfattede de serologiske kriterier måling af ACPA'er, såsom anti-CCP, samt nogen definition på et lavt positivt og et højt positivt serologireultat.<sup>21</sup>

Axis-Shield Anti-CCP-analysen er en ELISA, baseret på detektionen af autoantistoffer i humant serum eller plasma, mod et syntetisk cyklisk peptid, der indeholder modificerede arginin-dele (CCP2-peptider). Analysen er et yderligere redskab til at diagnosticere patienter med RA.

## ANALYSEPRINCIP

Brøndene på pladen med mikrotiterstrips er belagt med højoprenset syntetisk cyklisk citrullineret peptid, der indeholder modificerede arginin-dele. I løbet af den første inkubation vil specifikke autoantistoffer i fortyndet serum eller plasma binde sig til den antigen-belagte overflade. Brøndene vaskes dernæst for at fjerne ubundne komponenter. I løbet af den anden inkubation binder Konjugatet, et enzym-mærket polyklonalt antistof rettet mod human IgG, til alle autoantistoffer, der er bundet til overfladen. Efter yderligere afvaskning kan specifikke autoantistoffer spores ved inkubation med Substratet. Tilsætning af Stopopløsningen afbryder reaktionen, resultatet er et farvet slutprodukt, og mængden af bundet Konjugat måles i absorbansenheder. I den kvalitative protokol sammenlignes mængden af Konjugat bundet af prøven med mængden af konjugat bundet af Referencekontrollen. I den semikvantitative protokol kan koncentrationen af anti-CCP-autoantistoffer estimeres ved interpolation fra en dosis-respons-kurve, på grundlag af Kalibratorer.

## KOMPONENTER I SÆTTET

<b>CONJ</b>	1 x 15,0 ml	Peberrodsperoxidase-mærkede polyklonale gede-antistoffer til humant IgG, 0,1 % (w/v) p-hydroxyphenyleddikesyre, 0,15 % (w/v) proclin og 1 % protein (bovin) stabilisator (w/v) i en HEPES-buffer. <b>Klar til brug. N.B. ADVARSEL</b>	
<b>SUBS</b>	1 x 15,0 ml	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, buffer-opløsning. <b>Klar til brug.</b> Må ikke udsættes for lys under opbevaring. <b>N.B. ADVARSEL</b>	 
<b>SOLN STOP</b>	1 x 15,0 ml	Svovlsyre 0,25 mol/l vandig opløsning <b>Klar til brug. N.B. FARE</b>	
<b>BUF WASH 10 X</b>	3 x 25,0 ml	Fosfat-bufret saltvandsopløsning, 1,3 % (v/v) Tween 20 <b>Fortyndes før brug.</b>	
<b>MTP 8 x 12</b>	Mikrotiterstrips (der kan deles) med 8 x 12 brønde	Belagt med syntetisk cyklisk citrullineret peptid, i en genlukkelig foliepakning med tørremiddel.	
<b>SAMPLE DIL 5 X</b>	1 x 25,0 ml	Fosfatbuffer, protein (bovint) stabilisator, 0,5 % (w/v) natriumazid. <b>Fortyndes før brug.</b> <b>N.B. FARE</b>	 
<b>CAL 1</b>	1 x 1,0 ml	Fosfatbuffer, protein (bovint) stabilisator, < 0,1% (w/v) natriumazid. 0 U/ml. <b>Klar til brug.</b>	
<b>CAL 2 - CAL 6</b>	5 x 1,0 ml	Humant plasma, fosfatbuffer, protein (bovint) stabilisator, < 0,1 % (w/v) natriumazid. 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. <b>Klar til brug.</b>	
<b>CONTROL REF</b>	1 x 1,5 ml	Humant plasma, buffer, < 0,1 % (w/v) natriumazid. <b>Klar</b>	
<b>CONTROL +</b>	1 x 0,3 ml	Humant plasma, < 0,1 % (w/v) natriumazid. <b>Fortyndes 1:100 med fortyndet Prøvediluent før brug, som for prøver.</b>	
<b>CONTROL -</b>	1 x 0,3 ml		

## OPBEVARING AF REAGENSER

### Stabilitet af åbnet sæt

Et sæt blev åbnet og brugt ved tre lejligheder over en periode på tre måneder, uden nogen negativ virkning på sættets ydeevne. Efter brug skal komponenterne igen opbevares ved 2-8 °C.

### Håndterings- og proceduremæssige bemærkninger

- Sættets komponenter skal opbevares ved temperaturer på 2-8 °C og bruges op til udløbsdatoen på etiketterne. Anvend ikke reagenser efter udløbsdatoen.
- Bland ikke forskellige lotnumre.
- Sættene må ikke nedfryses.
- Vaskebufferkoncentrat, Prøvediluent-koncentrat og Positive og Negative Kontroller skal fortyndes før brug. Alle andre reagenser er klar til brug.
- Undgå mikrobiel kontaminering af den fortyndede Vaskebuffer og den fortyndede Prøvediluent, og sæt tilbage på køl, 2-8 °C, efter analyse.
- Sæt overskydende (ubrugte) mikrotiterstrips tilbage i foliepakningen med tørremiddel. Sørg for, at forseglingen er intakt og sæt tilbage på køl, 2-8 °C, indtil de behøves.

7. Substratet må ikke udsættes for lys under opbevaring.
8. Undgå kontaminering af reagenserne. Brug en ny engangspipette til hver reagens eller prøvehåndtering.

### **Indikationer på nedbrydning**

Substrater skal være farveløst eller meget let lyseblåt i farven. Uklarhed eller udfældning af nogle af komponenterne er tegn på nedbrydning, og komponenten skal bortskaffes.

Hvis krystallerne er synlige i Vaske- eller Prøvediluent når de fjernes fra opbevaringen på køl, vil disse opløses ved inversion og kalibrering til stuetemperatur.

### **Prøvetagning og opbevaring**


Analysen anbefales til humane serumprøver (herunder serum-separationsrør (SST)) eller plasmaprøver (EDTA, lithium-heparin eller natriumcitrat). Andre typer rør er ikke blevet undersøgt til brug med analysen. Kraftigt hæmolyserede eller uklare prøver må ikke anvendes. Optøede prøver skal blandes grundigt før analyse, og gentagen nedfrysning/optøning skal undgås. Prøverne må ikke varmeaktiveres, dette kan give falsk-positive resultater.

Følg rørproducentens anvisninger med hensyn til opsamlingsrørerne ved analyseforberedelse. Prøverne kan opbevares uforyndet ved temperaturer på 2-8 °C i fire uger. Opbevares ved -20 °C eller derunder for længere opbevaring. Prøver, der er fortyndet i forholdet 1:100 med fortyndet Prøvediluent skal bruges i løbet af 24 timer efter fortynding.






## **ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER**

**Kun til *in vitro* diagnostisk anvendelse.**

### **Sikkerhedsforanstaltninger**

1. Vejledningen i denne indlægsseddel skal følges nøje, især med hensyn til betingelser for håndtering og opbevaring.
2.  Kalibratorer og Kontroller indeholder humant plasma analyseret ved hjælp af FDA-godkendte analyser for HBsAg, HIV-1-RNA eller HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 og anti-HCV eller HCV-RNA, og fundet at være ikke-reaktive/negative. Da der ikke er nogen kendte analyser, der kan give fuldstændig forsikring for, at der ikke er nogen infektiøse stoffer til stede, skal Kalibratorer og Kontroller anses for potentielt infektiøst materiale, og håndteres med samme forholdsregler, som alt andet potentielt biologisk farligt materiale. De godkendte retningslinjer fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections" (M29-A3 –Third Edition),<sup>22</sup> beskriver hvordan disse materialer skal håndteres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis (Good Laboratory Practice).
3. Der må ikke pipetteres med munden.
4. Der må hverken ryges eller indtages mad- og drikkevarer eller påføres kosmetik i de områder, hvor der håndteres sæt og prøver.
5. Alle hudlidelser, snitsår, afskrabninger og andre hudlæsioner skal beskyttes på passende vis.
6. Kalibratorer, Kontroller og Prøvediluentkoncentrat indeholder natriumazid, som kan reagere med bly- og kobberør og danne meget eksplosive metalazider. Ved bortskaffelse skal der skylles efter med store mængder vand for at forhindre ophobning af azid.
7. Sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter, der forefindes i dette sæt, kan fås ved forespørgsel hos Axis-Shield Diagnostics.

**Forsigtig: Ifølge amerikansk lov må dette udstyr kun sælges eller bestilles af en læge.**

 Advarsel <b>Konjugat</b>	<u><b>ADVARSEL</b></u> H317 – <u><b>FOREBYGGELSE</b></u> P272 – P280 – P363 –	Kan forårsage allergisk hudreaktion. Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse Tilsmudset tøj skal vaskes, før det kan anvendes igen.
 Advarsel <b>Substrat</b>	<u><b>ADVARSEL</b></u> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 – <u><b>FOREBYGGELSE</b></u> P260 – P280 – <u><b>REAKTION</b></u> P301+310 – P304+340 – P305+351+338 –	Farlig ved indtagelse. Farlig ved hudkontakt. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Farlig ved indånding. Kan forårsage irritation af luftvejene. Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge. VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
  Fare <b>Prøvediluent</b>	<u><b>ADVARSEL</b></u> H302 – H318 – H412 – EUH032 – <u><b>FOREBYGGELSE</b></u> P264 – P280 – <u><b>REAKTION</b></u> P301+310 – P305+351+338 – P330 –	Farlig ved indtagelse. Forårsager alvorlig øjenskade. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Vask hænder grundigt efter brug. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. Skyl munden.
 Fare <b>Stopopløsning</b>	<u><b>ADVARSEL</b></u> H314 – <u><b>FOREBYGGELSE</b></u> P260 – P273 – P280 – <u><b>REAKTION</b></u> P301+330+331 – P303+361+353 – P304+340 – P305+351+338 –	Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader. Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Undgå udledning til miljøet. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Skyl munden. Fremkald IKKE opkastning. VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Tilsmudset tøj tages straks af/fjernes. Skyl/brus huden med vand. VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

## FORBEREDELSE

### Nødvendige materialer/udstyr, som ikke medfølger

1. Aflæser af plade med 96 brønde/strips med et 450 nm filter.
2. Præcisionspipetter til tilsætning af 10 µl, 100 µl, 1 ml. Automatisk pipette til tilsætning af 100 µl. Automatisk pipette til tilsætning af 300 µl til manuel afvaskning, automatisk pladevasker valgfri.
3. Cylinderformede målebægre af glas/plastic: 1×100 ml, 1×500 ml.
4. Beholdere med et volumen på 1 ml.
5. Destilleret/deioniseret vand
6. Papirservietter.
7. Timer til 30 og 60 minutters intervaller.

### Forberedelse til analysen

Lad alle komponenter af sættet, herunder mikrotiterstrips, varme op til 18-25 °C i 30-60 minutter før brug. Reagenserne blandes ved forsigtig inversion.

#### Referencekontrollen må ikke fortyndes.

De følgende reagenser fortyndes og blandes grundigt.

Reagens	Volumen	Tilsæt
Vaskebufferkoncentrat	1 hætteglas	225 ml destilleret/deioniseret vand
Prøvediluentkoncentrat	1 hætteglas	100 ml destilleret/deioniseret vand
Positive og Negative Kontroller/prøver	10 µl	1 m fortyndet Prøvediluent

Beregn antallet af mikrotiterstrips, der er nødvendige for den aktuelle analyse, og opbevar disse i mikrotiterstrip-holderen. Overskydende strips sættes tilbage i foliepakningen med tørremiddel og de opbevares ved temperaturer på 2-8 °C, indtil de behøves. Sørg for, at alle strips er sikkert på plads i mikrotiterstrip-holderen. Brugerne kan evt. nummerere hver strip langs den øverste kant for at hjælpe med identifikationen. Mikrotiterstrip-holderen beholdes til fremtidig brug.

## ANALYSEPROTOKOL

**Kvalitativ protokol:** Analyse af Referencekontrol, Positive og Negative Kontroller og prøver.

**Semikvantitativ protokol:** Analyse af Kalibratorer (1-6), Positive og Negative Kontroller og prøver.

1. Referencebrønde til identifikation.
2. 100 µl af referencekontrollen/kalibratorer i duplikater og fortyndede (1:100) positive og negative kontroller pipetteres i de tilhørende brønde. Pipetter 100 µl fortyndede (1:100) patientprøver, enten som enkeltbestemmelser eller i duplikater, i de tilhørende brønde. Det anbefales, at prøverne analyseres som duplikater, men dette er valgfrit i henhold til lokale laboratorieregler. Dette trin bør ikke vare længere end **10 minutter** for nogen sæt af Kalibratorer/Kontroller/prøver.
3. Inkuber i 60 ± 10 minutter ved en temperatur på 18-25 °C.
4. Indholdet af strips afhældes ved en hurtig inversion over en vask, hvori der kan bortskaffes biologiske materialer, idet prøvernes potentielle infektionsfare tages i betragtning. De inverterede strips duppes med papirservietter.
5. Vask brøndene **fire gange** med mindst 300 µl fortyndet Vaskebuffer. **Efter hvert trin afhældes væsken og der duppes med papirservietter.**
6. Tilsæt 100 µl Konjugat til hver brønd.
7. Inkuber i 30 ± 5 minutter ved en temperatur på 18-25 °C.
8. Gentag trin 4 og 5.
9. Tilsæt 100 µl Substrat til hver brønd.
10. Inkuber i 30 ± 5 minutter ved en temperatur på 18-25 °C. **Væsken hældes ikke af.**
11. Tilsæt 100 µl Stopopløsning til hver brønd, i samme rækkefølge og med samme hastighed som ved tilsætningen af Substrat. Bank forsigtigt på brøndene for at blande dem og sørg for, at der ikke er nogen synlige bobler.
12. Aflæs strips ved 450 nm.
13. Aflæs analysen inden for 60 minutter efter analysen blev udført.

# BEREGNING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Betragt hver enkelt analyse separat ved beregning og fortolkning af resultater.

## Kvalitativ protocol

Beregn det gennemsnitlige forhold mellem absorbansværdien (optisk densitet) for de Positive og Negative Kontroller, samt for hver prøve til den (gennemsnitlige) Absorbansværdi for Referencekontrollen:

$$\text{Absorbansforhold} = \frac{\text{Gennemsnitlig absorbansværdi Kontrol}}{\text{Gennemsnitlig absorbansværdi af Referencekontrol}}$$
$$\text{Absorbansforhold} = \frac{(\text{Gennemsnitlig}) \text{ absorbansværdi af Prøve}}{\text{Gennemsnitlig absorbansværdi af Referencekontrol}}$$

Brugerne bør beregne en afskæringsværdi mellem positive og negative prøver, som er specifik for deres patientpopulationer. Fra resultater med patientpopulationer, der blev analyseret med Axis-Shield i kliniske undersøgelser, angives den følgende afskæringsværdi:

<u>Absorbansforhold</u>	<u>Fortolkning af resultat</u>
< 0,95	Negativ
≥ 0,95 til ≤ 1,0	På grænsen - anbefaler gentagen analyse
> 1,0	Positiv

## Semikvantitativ protokol

Den gennemsnitlige absorbansværdi for hver Kalibrator afsættes som funktion af  $\log_{10}$  Kalibrator-koncentrationen (se følgende tabel) på hensigtsmæssigt grafpapir. Gennemsnitlige koncentrationer af positive og negative Kontroller og (gennemsnitlige) prøver kan så aflæses fra kalibreringskurven. En typisk graf over kalibreringskurven ses nedenunder for reference, den må ikke bruges til at fortolke resultater. 4-parameter logistiske (4PL) og Cubic Spline kurvetilpasninger er hensigtsmæssige. Andre kurvetilpasningsmodeller anbefales ikke

Prøver med absorbanser over Kalibrator 6 (300 U/ml) er uden for denne analyses interval, og skal registreres som > 300 U/ml, fortyndes og analyseres igen, og korrigeres for denne yderligere fortyndingsfaktor.

Til fortolkning af semikvantitative resultater og på basis af Axis-Shield populationsdata til reference\*, foreslås følgende:

<u>(Gennemsnitligt) prøveresultat</u>	<u>Resultatfortolkning</u>
≤ 5 U/ml	Negativ
> 5 U/ml	Positiv

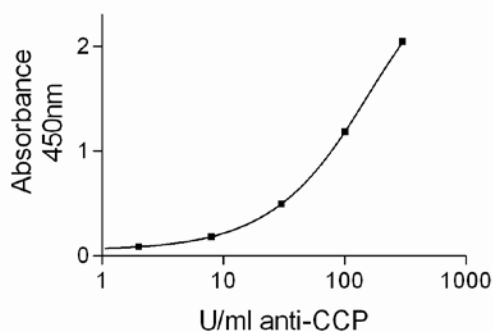
\*Dette er kun et vejledende forslag. Det anbefales, at brugerne fastsætter et referenceområde, som kan være unikt for populationen.

Bemærk: Som for alle analyser, der måler antistoffer, måler denne analyse aktiviteten af antistoffer, der er til stede i prøven, i stedet for koncentrationen. Aktiviteten kan påvirkes af flere forskellige parametre, såsom antistofaviditet.

### Kalibratorkoncentrationer

Kalibratorkoncentrationer	Koncentration U/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

### Typisk kalibreringskurve



## KVALITETSKONTROL

Sørg for, at fyldestgørende vedligeholdelse og kalibrering af plade aflæseren udføres i overensstemmelse med producentens vejledning, og at den korrekte bølgelængde anvendes.

Brugerne skal sikre, at de er helt bekendte med analysevejledningen, især afsnittene Advarsler og forholdsregler og Håndterings- og proceduremæssige bemærkninger. Brugerne skal kunne vise, at de kan opnå præstationsspecifikationer for præcision og rapporteringsområdet for analyseresultater, sammenlignet med de specifikationer, der blev fastlagt af producenten før rapportering af patientens analyseresultater. Det anbefales, at de forforyndede Positive og Negative Kontroller køres i duplikater i alle analyser, for at overvåge testprocedurens kvalitet. Kør Referencekontrollen, der er klar til brug, i duplikat i alle kvalitative analyser.

Hvis de præcisionsspecifikationer, som producenten anfører, opfyldes, er analysen ugyldig, og patientresultaterne bør ikke rapporteres, hvis Kontrollerne ikke opfylder Kontrollens forholdsmæssige specifikationer angivet nedenfor. Operatøren kan gentage analysen efter at have gennemgået proceduren eller distributøren/producenten kan kontaktes. Hvis analysen gentages, skal der fremstilles en frisk opløsning af hver kontrol og prøve. Laboratorierne kan ønske at inkludere interne kontroller i hver analysekørsel. Sådanne kontrolmaterialer opbevares ved eller under temperaturer på -20°C, og gentagne nedfrysningsoptøningscykluser skal undgås. Konserveringsmidler, såsom natriumazid ved 0,1 % (w/v), vil ikke påvirke prøveresultaterne.

De analytiske niveauer, der er blevet identificeret ved bestemte sygdomme, er de, der er blevet etableret af producenten for specifikke populationer, og vil ikke nødvendigvis afspejle litteraturen. Incidensniveauer, deres forhold til specifikke sygdomme, referenceområder og behørigt afskæringspunkter skal alle beregnes for de specifikke populationer, der servicerer af brugerne.

### Specifikationer af kontrolratio

Protokol	Specifikationer
Kvalitativ (forhold)	$\frac{\text{Positiv kontrolabsorbans}}{\text{Referencekontrolabsorbans}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Negativ kontrolabsorbans}}{\text{Referencekontrolabsorbans}} < 0,95$
Semikvantitativ	Se hætteglasetiket for Positiv Kontrol for acceptabelt forventede område (U/ml)
	Negativ Kontrol koncentration < 2 U/ml

## FORVENTEDE VÆRDIER

200 serumprøver fra asymptomatiske, tilsyneladende raske donorer, med et aldersinterval på 18-72 år, bestående af ca. lige mange mænd [n = 105] og kvinder [n = 95], blev analyseret med Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200).

Der blev ikke observeret nogen forskelle, der kunne tilskrives alder eller køn (beregnet ved at sammenligne aldersintervaller på  $\leq 40$  år [n = 115] og  $> 40$  år [n = 85]).

Den samlede gennemsnitlige anti-CCP-koncentration for denne population var  $0,63 \pm 0,419$  U/ml (område 0,05-3,8 U/ml).

På basis af data fra denne referencepopulation og data fra en klinisk population, er den foreslåede afskæringsværdi for analysen:

<i>Referenceområde</i> $\leq 5$ U/ml = Negativ $> 5$ U/ml = Positiv
---

Dette referenceområde foreslås kun som en vejledning, og hvert laboratorium skal etablere et referenceområde, som kan være unik for den population, det dækker, afhængig af geografiske, patient, diæt, miljømæssige faktorer eller klinisk praksis. Bemærk venligst at reumatoid arthritis forekommer dobbelt så ofte hos kvinder end hos mænd.

## PRÆSTATIONS DATA

### Fortyndelseslinearitet

Axis-Shield Anti-CCP-analysen er beregnet til at være lineær i hele måleområdet fra LOD til 300 U/ml.

Baseret på en undersøgelse udført med vejledning fra CLSI-dokumentet EP6-A,<sup>23</sup> Axis-Shield Anti-CCP-analysen udviste linearitet fra 1,04 U/ml til 300 U/ml.\*



\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data

Prøver > 300 U/ml udviser en gennemsnitlig genindvinding på  $\leq 100 \% \pm 15 \%$ \* af det forventede resultat, når de fortyndes i til analyseområdet og ved anvendelse af den korrekte fortyndelsesfaktor.

\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data

### **Klinisk følsomhed og specificitet**

Den kliniske følsomhed af Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) blev bestemt for 229 personer med bekræftet RA, og klinisk specificitet blev bestemt for 285 ikke-RA prøver (135 fra patienter med andre reumatiske og ikke-reumatiske sygdomme, og 150 fra asymptomatiske, tilsyneladende raske individer). Med en afskæring på 5,0 U/ml blev følsomheden beregnet til 78 % med en specificitet på 99 % . Resultaterne er opsummeret i de følgende tabeller.\*

<b>Prøvekategori</b>	<b>Total n</b>	<b>Positiv n</b>	<b>% Følsomhed</b>
RA	229	179	78

<b>Prøvekategori</b>	<b>Total n</b>	<b>Positiv n</b>	<b>% Specificitet</b>
Ikke-RA prøver i alt	285	4	98,6
Ikke-RA raske asymptomatiske	150	1	99,3
Ikke-RA sygdomsprøver <sup>+</sup>	135	3	97,8

\* Klinisk specificitet for 135 prøver fra patienter med andre reumatiske og ikke-reumatiske sygdomme kategoriseres i den følgende tabel.\*

<b>Ikke-RA sygdomsprøver</b>	<b>I alt n</b>	<b>Positive n</b>	<b>Klinisk specificitet</b>
I alt	135	3	97,8 %
Inflammatorisk polyarthritis	41	1	97,6 %
EBV IgG-positiv	18	1	94,4 %
Hashimotos tyroiditis	17	0	100 %
Sjögrens syndrom	16	1	93,8 %
Systemisk lupus erythematosus	16	0	100 %
Vaskulitis	5	0	100 %
Skleroderma	5	0	100 %
Osteoarthritis	4	0	100 %
Crohns sygdom	3	0	100 %
Raynauds fænomen	3	0	100 %
Ulcerøs kolitis	2	0	100 %
Psoriasisarthritis	2	0	100 %
Reaktiv arthritis	1	0	100 %
Ankyloserende spondylitis og polymyositis	2	0	100 %

\*Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data.

### Metodesammenligning

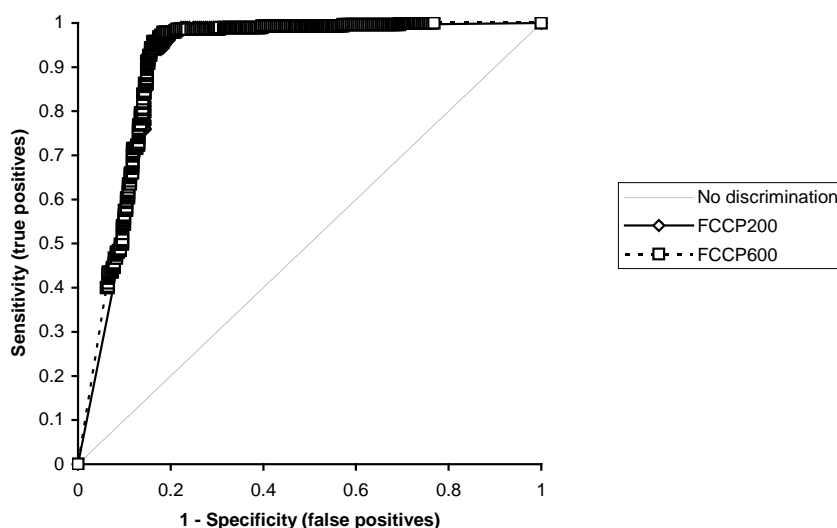
Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) er beregnet til at have en overensstemmelse på  $\geq 99\%$  for RA og ikke-RA prøver, ved sammenligning med en komparator Axis-Shield Anti-CCP-analyse (FCCP200). RA og ikke-RA prøverne beskrevet i afsnittet Klinisk følsomhed og specificitet blev anvendt til at sammenligne Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) med Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200). Afskæringsværdien, som blev anvendt for Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200) var 5,0 U/ml, som angivet i producentens indlægsseddel. Med en afskæringsværdi på 5,0 U/ml for Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600), blev overensstemmelsen beregnet til at være 99 %. Resultaterne er opsummeret i de følgende tabeller.\*

Alle prøver (514)		FCCP200	
		Positiv	Negativ
FCCP600	Positiv	179	4
	Negativ	1	330

Sammenligningsmetode	FCCP600 versus FCCP200
Antal prøver	65
Hældning af regressionslinjen	0,910
Y-skæringspunkt	1,226
Korrelationskoefficient	0,94

\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data.

En Receiver Operator Characteristic (ROC)-analyse blev udført med de ovenstående data opnået for de to analyser. Arealet under kurven (AUC) for Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) var 0,910 (95 % konfidensinterval: 0,881-0,940) og 0,903 (95 % konfidensinterval: 0,871-0,934) for komparator Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200), hvilket indikerer, at begge analyser er sammenlignelige med hensyn til deres kliniske differentiering. ROC-analysekurven vises nedenunder.\*



\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data.

### Præcision

En undersøgelse blev udført efter vejledning fra CLSI (formelt NCCLS) dokument EP5-A2.<sup>24</sup> To anti-CCP-kontroller, seks QC-panelprøver og en human serumprøve blev analyseret med reagenser fra to lot, i to replikater, på to separate tidspunkter pr. dag i 20 dage (n=80). Data fra denne undersøgelse blev opsummeret i den følgende tabel som repræsentative data (afrundet til 1 decimal):

Prøve	Sæt Lot	n	Gennemsnit (U/ml)	Under kørsel		Mellem kørsler		Mellem dage		Total	
				SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Positiv kontrol	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
Reference Kontrol	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
Prøve 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

\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data

### Detektionsgrænse

Detektionsgrænsen (limit of detection, LOD) af Axis-Shield Anti-CCP-analysen ifølge CLSI (formelt NCCLS) dokument EP17-A<sup>25</sup> blev fundet til at være 1,04 U/ml\*.

LOD-bestemmelser blev udført ved hjælp af en negativ anti-CCP-prøve (60 replikater) og 6 anti-CCP-prøver med lavt niveau (15 replikater hver).

\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data.

### Høj dosis hook

Høj dosis hook er et fænomen, hvor meget høje prøveniveauer kan aflæse inden for analysens dynamiske område. For Axis-Shield Anti-CCP-analysen blev der ikke observeret nogen høj dosis hook-effekt, da en prøve indeholdende ca. 3000 U/ml anti-CCP-antistof blev analyseret.\*

\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data.

### Interferens

Axis-Shield Anti-CCP-analysen er beregnet til at have en maksimal afvigelse i anti-CCP-koncentrationen fra de følgende potentielt set interfererende stoffer inden for:

- $\pm 15\%$  for anti-CCP-koncentrationer  $\geq 10,0$  U/ml
- $\pm 10\%$  for anti-CCP-koncentrationer  $\geq 4,0$  U/ml til  $< 10,0$  U/ml
- $< 0,75$  U/ml for anti-CCP-koncentrationer  $< 4,0$  U/ml

En undersøgelse blev udført baseret på vejledning fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dokument EP7-A2<sup>26</sup> for Axis-Shield Anti-CCP-analysen. 6 prøver med anti-CCP-niveauer over hele analyseintervallet blev suppleret med potentielt interfererende stoffer anført i tabellen nedenunder. Den maksimale afvigelse af anti-CCP-koncentrationen observeret i prøver i disse undersøgelser varierede fra:

- -9,4 % til 3,3 % for anti-CCP-koncentrationer  $\geq 10,0$  U/ml

- -7,3 % til 4,8 % for anti-CCP-koncentrationer  $\geq 4,0$  U/ml til  $< 10,0$  U/ml
- -0,6 U/ml til 0,05 U/ml for anti-CCP-koncentrationer  $< 4,0$  U/ml\*

Potentielt set interfererende stoffer	Ingen interferens fundet op til den følgende koncentration
Hæmoglobin	4 mg/ml
Bilirubin	0,2 mg/ml
Triglycerid (intralipid opløsning)	15 mg/ml
Reumatoid faktor	200 IU/ml
Totalt protein (gammaglobuliner)	120 mg/ml

\* Repræsentative data, resultaterne fra individuelle laboratorier kan variere fra disse data.

## B R U G S B E G R Æ N S N I N G E R

1. Skønt tilstedeværelsen af antistoffer mod CCP er forbundet med reumatoid arthritis, er et positivt resultat i sig selv ikke diagnostisk, data skal overvejes i lyset af andre kliniske fund og laboratoriefund.
2. Nogle personer kan have høje niveauer af anti-CCP-antistoffer med kun lidt eller ingen evidens for klinisk sygdom. Omvendt kan nogle patienter med aktiv sygdom have niveauer af disse antistoffer, som ikke kan måles. Den kliniske betydning af denne information er aktuelt ikke klarlagt.
3. Da resultatet af en anti-CCP-analyse ikke er et diagnostisk bevis for tilstedeværelse eller fravær af klinisk sygdom, bør behandlingen ikke startes kun på grundlag af et positivt anti-CCP-resultat.
4. Påbegyndelse eller ændringer i behandling bør ikke baseres på ændringer i anti-CCP-autoantistofkoncentration, men hellere på klinisk(e) observation(er).
5. Den kliniske virkning af at overvåge CCP-autoantistofniveauer som en indikation af progression/remission af reumatoid arthritis er ikke blevet defineret.
6. Værdien af anti-CCP i juvenil arthritis er ikke blevet bestemt.
7. På grund af specifikke karakteristika af antigen/antistof-interaktioner, er det ikke koncentrationen af antistof, der bestemmes, men aktiviteten. Da patientsera indeholder heterogene antistofpopulationer, kan nogle prøver udvise non-linearitet, især ved meget høje prøvefortyndinger.

## L I T T E R A T U R

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, Storbritannien.

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

E-mail: [shield@axis-shield.com](mailto:shield@axis-shield.com)

Web: [www.axis-shield.com](http://www.axis-shield.com)



**IVD**

*In vitro* diagnostisk medicinsk anordning

**REF**

Katalognummer

**LOT**

Lot



96 prøver



Forsigtig



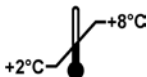
Se brugsanvisningen



Beskyttes mod lys.



Anvendes før



Opbevares ved temperaturer på 2-8 °C

**Rx Only**

**Kun til receptpligtig brug**



Produceret af

**CONTROL +**

Positiv kontrol

**CONTROL -**

Negativ kontrol

**CONJ**

Konjugat

**SUBS**

Substrat

**SOLN STOP**

Stopopløsning

**BUF WASH 10 X**

Vaskebuffer

**MTP 8 x 12**

Mikrotiterstrips (der kan deles)

**SAMPLE DIL 5 X**

Prøvediluent

**CAL 1**

Kalibrator 1

**CAL 2 - CAL 6**

Kalibrator 2-6

**CONTROL REF**

Referencekontrol