



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP600

Pour usage professionnel uniquement



Axis-Shield Diagnostics Ltd.

The Technology Park, Dundee, DD2 1XA, Royaume-Uni

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

Courriel : shield@uk.axis-shield.com

Site Web : www.axis-shield.com

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

INTRODUCTION

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

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







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

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

PRINCIPE DU DOSAGE

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

COMPOSANTS DE LA TROUSSE

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

CONSERVATION DES RÉACTIFS

Stabilité de la trousse ouverte

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

Remarques relatives à la manipulation et à l'utilisation

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

Signes de détérioration

Le substrat doit être incolore à bleu très clair. Les turbidités ou précipités de tout composant indiquent une détérioration et il faut alors jeter le composant.

En présence de cristaux dans le tampon de lavage ou le diluant d'échantillon à la sortie de l'entreposage au froid, ceux-ci se dissolvent à l'inversion et l'équilibrage à température ambiante.

Recueil et conservation des échantillons


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

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

ISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS





N'utiliser que pour le diagnostic in vitro .


Précautions d'emploi

1. Il est impératif de se conformer strictement à ce mode d'emploi, en particulier en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2.  Les étalons et témoins contiennent du plasma humain testé par dosages approuvés par la FDA pour le HBsAG (antigène de surface de l'hépatite B), l'acide ribonucléique ou ARN du VIH-1 (HIV-1 RNA) ou l'antigène du VIH-1 (HIV-1 Ag), les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 (anti-HIV-1/HIV-2), et les anticorps anti-VHC (anti-HCV) ou l'ARN du VHC (HCV RNA) et avérés non-réactifs/négatifs. Comme aucun test connu ne permet de déterminer avec certitude l'absence d'agents infectieux, les étalons et témoins doivent être considérés potentiellement infectieux et manipulés avec les mêmes précautions que tout autre matériau potentiellement nocif pour l'organisme. Les recommandations approuvées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sur la Protection du personnel de laboratoire contre les infections acquises dans le cadre de leur emploi (Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections) (M29-A3 –Troisième édition)²² décrivent la méthode de manipulation de ces matériaux conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL).
3. Ne pas pipeter à la bouche.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou appliquer de cosmétiques dans les zones où les trousse et les échantillons sont manipulés.
5. Il convient de protéger convenablement toute affection, coupure ou éraflure cutanée et autres lésions cutanées.

6. Les étalons et témoins ainsi que le diluant d'échantillon concentré contiennent de l'acide de sodium. Celui-ci peut réagir avec les tuyaux en plomb ou en cuivre et former des azides de métal très explosifs. Lors de l'élimination, vider avec une grande quantité d'eau pour éviter toute accumulation d'azide.
7. Les fiches de sécurité associées à tous les composants dangereux contenus dans cette trousse sont disponibles sur demande auprès de Axis-Shield Diagnostics.

Attention : conformément à la législation fédérale des États-Unis, ce dispositif ne peut être vendu que par un médecin ou sur prescription médicale.

 Attention Conjugué	<u>Attention</u> H317 – <u>Prévention</u> P272 – P280 – P363 –	Peut provoquer une allergie cutanée. Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.
 Attention Substrat	<u>Attention</u> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 – <u>Prévention</u> P260 – P280 – <u>Réponse</u> P301+310 – P304+340 – P305+351+338 –	Nocif en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Nocif par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
  Danger Diluant d'échantillon	<u>Attention</u> H302 – H318 – H412 – EUH032 – <u>Prévention</u> P264 – P280 – <u>Réponse</u> P301+310 – P305+351+338 – P330 –	Nocif en cas d'ingestion. Provoque des lésions oculaires graves. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique. Se laver mains soigneusement après manipulation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Rincer la bouche.

 <p>Danger</p> <p>Solution d'arrêt</p>	Attention	H314 – Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
	Prévention	P260 – Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aérosols. P273 – Éviter le rejet dans l'environnement. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage.
	Réponse	P301+330+331 – EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir. P303+361+353 – EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. P304+340 – EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. P305+351+338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P R É P A R A T I O N

Matériel/équipement nécessaire, mais non fourni

1. Lecteur à filtre 450 nm pour barrette/microplaque à 96 puits.
2. Pipettes de précision délivrant 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipette automatique délivrant 100 µL. Pipette automatique délivrant 300 µL pour lavage manuel ; nettoyeur automatique de microplaque en option.
3. Éprouvette graduée à pied en verre/plastique : 1x100 mL, 1x500 mL.
4. Récipients 1 mL.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuteur pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation au dosage

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

Ne pas diluer le témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

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

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

P R O T O C O L E D E D O S A G E

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

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

1. Puits de référence pour identification.
2. Pipeter 100 µL de témoin de référence/d'étalons en double, de témoins positif et négatif prédilués (à 1:100) en double et d'échantillons patients prédilués (à 1:100) en double dans les puits appropriés. Ne pas oublier de changer d'embouts de pipettes entre les différents ajouts. Cette étape ne doit pas prendre plus de **10 minutes** pour chaque lot d'étalons/témoins/échantillons.
3. Incuber 60 ± 10 minutes entre 18 et 25 °C.

4. Décanter le contenu des barrettes par inversion rapide au-dessus d'un évier adapté à l'élimination des matériaux biologiques en gardant à l'esprit le risque infectieux potentiel des échantillons. Bien sécher les barrettes retournées avec des serviettes en papier.
5. Laver les puits **quatre fois** avec au moins 300 µL de tampon de lavage dilué. **Décanter et sécher après chaque étape de lavage.**
6. Ajouter 100 µL de conjugué à chacun des puits.
7. Incuber 30 ± 5 minutes entre 18 et 25 °C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter 100 µL de substrat à chacun des puits.
10. Incuber 30 ± 5 minutes entre 18 et 25 °C. **Ne pas décanter.**
11. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chacun des puits, dans le même ordre et au même débit que l'ajout de substrat. Tapoter doucement pour mélanger et s'assurer qu'il n'y a pas de bulle.
12. Lire les barrettes à 450 nm.
13. Lire le dosage 60 minutes maximum après le test.

CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

Protocole qualitatif

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

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

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

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

<u>Rapport d'absorbance</u>	<u>Interprétation des résultats</u>
< 0,95	Négatif
≥ 0,95 à ≤ 1,0	Ambigu : renouvellement du test recommandé
> 1,0	Positif

Protocole semi-quantitatif

Tracer la valeur moyenne d'absorbance de chaque étalon par rapport à la concentration enregistrée₁₀ de l'étalon (cf. tableau suivant) sur une feuille millimétrée adaptée. On peut ensuite lire les concentrations positives et négatives moyennes de témoins et d'échantillons (moyenne) sur la courbe d'étalonnage ; un tracé d'étalonnage type est présenté ci-dessous à titre d'exemple, il ne faut pas l'utiliser pour interpréter des résultats. Les ajustements des courbes logistique à 4 paramètres (4PL) et splines cubiques sont satisfaisants. Les autres modèles d'ajustement ne sont pas recommandés. Les échantillons à absorbances supérieures à l'étalon 6 (300 U/mL) se situent hors de la plage du dosage et il faut les signaler comme contenant > 300 U/mL, étant dilués et redosés, pour corriger ce facteur de dilution.

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

<u>Valeur (moyenne) du résultat de l'échantillon</u>	<u>Interprétation du résultat</u>
≤ 5 U/mL	Négatif
> 5 U/mL	Positif

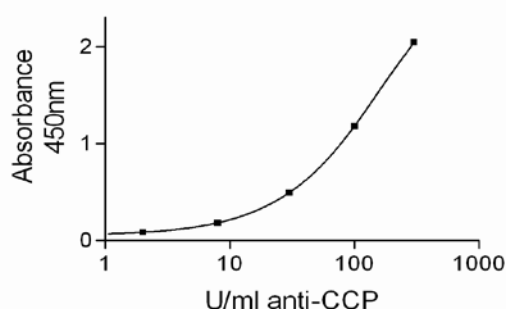
*Cette plage de référence a seulement valeur de recommandation. Il est recommandé aux utilisateurs d'établir leur propre plage de référence, qui peut s'appliquer à une seule population.

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

Concentrations d'étalons

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

Courbe type d'étalonnage



CONTRÔLE QUALITÉ

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

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

En supposant que les spécifications de précision décrites par le fabricant sont respectées, si un quelconque témoin ne respecte pas les spécifications relatives au rapport de témoin ci-dessous, le dosage s'avère non valable et il ne faut pas communiquer les résultats patient. L'utilisateur peut répéter le dosage après avoir examiné sa procédure ou contacté le distributeur/fabricant. En cas de nouveau dosage, préparer une autre dilution de chaque témoin et échantillon. Il se peut que les laboratoires souhaitent inclure des témoins internes à chaque cycle de dosage. Conserver un tel matériel de contrôle à -20 °C ou moins et éviter les cycles de congélation/décongélation à répétition. Les conservateurs tels que l'azide de sodium à 0,1 % (p/v) n'influent pas sur les résultats de l'échantillon.

Les taux d'analytes identifiés dans telle ou telle maladie sont ceux établis par le fabricant pour des populations déterminées et ne reflètent pas nécessairement les textes de référence. Il faut calculer les taux d'incidence, leur relation avec certaines maladies, les plages de référence et les seuils appropriés pour telle ou telle population couverte par les utilisateurs.

Spécifications du rapport de témoin

Protocole	Spécifications
Qualitatif (rapports)	$\frac{\text{Absorbance du témoin positif}}{\text{Absorbance du témoin de référence}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Absorbance du témoin négatif}}{\text{Absorbance du témoin de référence}} < 0,95$
Semi-quantitatif	Cf. étiquette du tube du témoin positif pour la plage d'acceptation attendue (U/mL)
	Concentration du témoin négatif < 2 U/mL

VALEURS ATTENDUES

200 échantillons sériques issus de donneurs asymptomatiques apparemment sains âgés de 18 à 72 ans, comprenant approximativement le même nombre d'hommes [n = 105] et de femmes [n = 95], ont été testés avec un dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP200).

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

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

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

Plage de référence
 ≤ 5 U/mL = négatif
 > 5 U/mL = positif

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

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Linéarité de dilution

Le dosage anti-CCP Axis-Shield vise la linéarité sur la plage de mesure allant de la limite de détection (LOD) à 300 U/mL. À partir d'une étude menée sur base du document EP6-A du CLSI,²³ le dosage anti-CCP Axis-Shield a démontré une linéarité de 1,04 U/mL à 300 U/mL.*

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

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

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

Sensibilité et spécificité cliniques

La sensibilité clinique du dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) a été déterminée pour 229 patients atteints de PR confirmée et la spécificité clinique a été déterminée pour 285 échantillons non PR (135 prélevés sur des patients présentant d'autres troubles rhumatismaux et non rhumatismaux et 150 sur des personnes asymptomatiques apparemment en bonne santé). Sur base d'un seuil de 5,0 U/mL, la sensibilité a été établie à 78 % avec une spécificité de 99 %. Les résultats sont synthétisés dans les tableaux suivants.*

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

Catégorie d'échantillon	Total n	Positif n	% de spécificité
Échantillons non PR au total	285	4	98,6
Non PR sains asymptomatiques	150	1	99,3
Échantillons de maladie non PR ⁺	135	3	97,8

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

Échantillons non PR	Total n	Positif n	Spécificité clinique
Total	135	3	97,8 %
Polyarthrite inflammatoire	41	1	97,6 %
VEB IgG positif	18	1	94,4 %
Thyroïdite de Hashimoto	17	0	100 %
Syndrome de Sjögren	16	1	93,8 %
Lupus érythémateux systémique	16	0	100 %
Vasculite	5	0	100 %
Sclérodermie	5	0	100 %
Ostéoarthrite	4	0	100 %
Maladie de Crohn	3	0	100 %
Syndrome de Raynaud	3	0	100 %
Colite ulcéreuse	2	0	100 %
Arthrite psoriasique	2	0	100 %
Arthrite réactive	1	0	100 %
Spondylarthrite ankylosante et polymyosite	2	0	100 %

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

Comparaison des méthodes

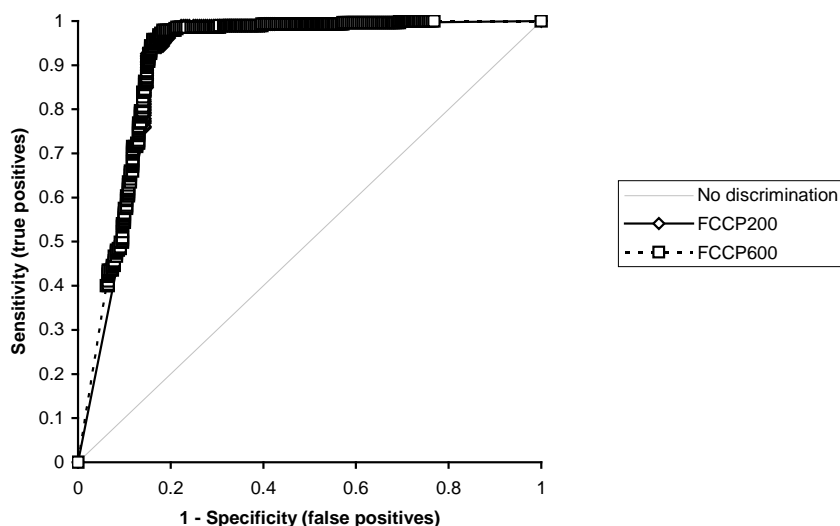
Le dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) est conçu pour obtenir une concordance de ≥ 99 % pour les échantillons PR et non PR par comparaison avec un dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP200) comparateur. Les échantillons PR et non PR décrits dans la section sensibilité et spécificité cliniques ont été exploités pour comparer l'essai anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) avec l'essai anti-CCP Axis-Shield (FCCP200). Le seuil appliqué pour le dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP200) était de 5,0 U/mL, comme indiqué sur la notice du fabricant. Sur base d'un seuil de 5,0 U/mL pour le dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP600), la concordance a été établie à 99 %. Les résultats sont synthétisés dans les tableaux suivants.*

Tous les échantillons (514)		FCCP200	
		Positif	Négatif
FCCP600	Positif	179	4
	Négatif	1	330

Méthode de comparaison	FCCP600 comparé à FCCP200
Nombre d'échantillons	65
Pente de la courbe de régression	0,910
Point d'intersection avec l'axe y	1,226
Coefficient de corrélation	0,94

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

Une analyse par caractéristique de fonctionnement du récepteur (Receiver Operator Characteristic ou ROC) a été menée en exploitant les données ci-dessus obtenues pour les deux dosages. L'aire sous la courbe (ASC) du dosage anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) était de 0,910 (intervalle de confiance de 95 % : 0,881 à 0,940) et 0,903 (intervalle de confiance de 95 % : 0,871 à 0,934) pour le dosage anti-CCP Axis-Shield comparateur (FCCP200), indiquant ainsi que les deux dosages sont comparables sur le plan de la différenciation clinique. La courbe de l'analyse ROC est présentée ci-dessous.*



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

Précision

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

Échantillon	Trousse Lot	n	Moyenne (U/mL)	Intra-cycle		Entre les cycles		Entre les journées		Total	
				ET	%CV	ET	%CV	ET	%CV	ET	%CV
Témoin positif	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
CQ 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
CQ 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
CQ 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
CQ 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
CQ 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
CQ 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
Témoin de réf,	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
Échantillon 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

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

Limite de détection

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

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

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

Effet crochet à forte dose

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

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

Interférence

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

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

Une étude a été menée sur base du document EP7-A²⁶ du CLSI sur le dosage anti-CCP Axis-Shield. On a complété six échantillons à taux anti-CCP répartis sur la plage de dosage avec les composés potentiellement interférents énumérés dans le tableau ci-dessous. L'écart maximal de la concentration anti-CCP observée dans les échantillons pendant ces études s'échelonnait de :

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

Substance potentiellement interférente	On n'a pas décelé d'interférence à la concentration suivante
Hémoglobine	4 mg/mL
Bilirubine	0,2 mg/mL
Triglycéride (solution intralipide)	15 mg/mL
Facteur rhumatoïde	200 IU/mL
Protéine totale (gammaglobulines)	120 mg/mL

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

LIMITES D'UTILISATION

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

R É F É R E N C E S

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 Ltd.

The Technology Park, Dundee, DD2 1XA, Royaume-Uni

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

Courriel : shield@axis-shield.com

Site Web : www.axis-shield.com



IVD

Dispositif médical diagnostic *in vitro*

REF

Numéro de catalogue

LOT

Lot



96 tests



Attention



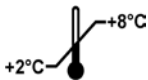
Consulter le mode d'emploi



Protéger de la lumière



À utiliser avant



Conserver entre 2 et 8 °C

Rx Only

Sur prescription médicale uniquement



Fabriqué par

CONTROL +

Témoin positif

CONTROL -

Témoin négatif

CONJ

Conjugué

SUBS

Substrat

SOLN STOP

Solution d'arrêt

BUF WASH 10 X

Tampon de lavage

MTP 8 x 12

Barrettes (détachables) de microplaque

SAMPLE DIL 5 X

Diluant d'échantillon

CAL 1

Étalon 1

CAL 2 - CAL 6

Étalons 2 à 6

CONTROL REF

Témoin de référence