



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP600

Только для профессионального применения



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom (Великобритания).

Тел.: +44 (0) 1382 422000, *Факс:* +44 (0) 1382 422088.

Эл. почта: shield@axis-shield.com

Интернет: www.axis-shield.com

НА РУССКОМ ЯЗЫКЕ (ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО): ЦЕЛЕВОЕ НАЗНАЧЕНИЕ

Анализ Axis-Shield Anti-CCP - это полуколичественный/качественный твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), предназначенный для обнаружения класса иммуноглобулинов аутоантител, специфичных к циклическим цитруллинированным пептидам (CCP) в сыворотке крови человека (включая пробирки сепаратора сыворотки) или плазмы (EDTA, лития гепарин или натрия цитрат). Обнаружение антител к CCP используется в качестве средства диагностики ревматоидного артрита (РА), и должно применяться в сочетании с другой клинической информацией. Уровень аутоантител является одним из параметров в многопараметрическом процессе диагностики, включающем как клинические, так и лабораторные оценки. Предназначен для диагностики *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) - это часто встречающееся, системное аутоиммунное заболевание, уровень заболеваемости которым составляет 0,5-1,0% взрослого населения. РА характеризуется хроническим воспалением синовиальной ткани, которое может приводить к прогрессирующему разрушению суставов и, во многих случаях, к нетрудоспособности и снижению качества жизни.¹ В целом, считается, что раннее вмешательство жизненно важно для предотвращения необратимого поражения суставов, поэтому важно диагностировать РА как можно раньше.^{2,3} Диагноз РА основывается, прежде всего, на клинических, рентгенографических и иммунологических признаках. Наиболее часто используемым серологическим анализом является измерение ревматоидного фактора (РФ).⁴ Хотя анализ на РФ отличается хорошей чувствительностью, он не специфичен для РА, и часто бывает положительным у здоровых лиц и пациентов с другими ревматическими или воспалительными заболеваниями, аутоиммунными нарушениями или хроническими инфекциями.⁵

В течение нескольких лет признавалось, что антитела к анти-перинуклеарному фактору (АПФ) и кератину (АКА) высоко специфичны к РА. Впоследствии были получены сообщения, что оба этих антитела реагируют с натуральным флаггрином, и теперь они рассматриваются как анти-флаггрин антитела (АФА).^{6,7,8} Недавно были представлены доказательства того, что все эти антитела управляются цитруллин-содержащими эпитопами.⁹ Цитруллин - нестандартная аминокислота, поскольку он не встраивается в белок во время синтеза белка. Однако его можно получить путем постпереходной модификации остатков аргинина ферментом пептидил-аргинин деиминазой (ПАД).¹⁰ В 1998 году Шеллекенс (Schellekens) со своими коллегами сообщил, что аутоантитела, реагирующие с линейными синтетическими пептидами, содержащими цитруллин, были высокоспецифичны к РА в анализе ELISA.¹¹ Последующие исследования продемонстрировали, что циклические варианты этих линейных пептидов, заканчивающиеся циклическими цитруллинированными пептидами (CCP) также высокоспецифичны к РА, но обладают более высокой чувствительностью, чем линейные пептиды.¹² В попытке еще более улучшить чувствительность анализа CCP специальная библиотека цитруллин-содержащих пептидов была проверена с РА сыворотки, и был обнаружен новый тип пептидов (CCP2), обеспечивающий лучшую эффективность, чем анализ CCP1.¹³ За последние несколько лет множество публикаций подтвердили диагностическую эффективность анализа CCP2.¹⁴ Было обнаружено, что анти-CCP антитела, которые также часто называют антителами к цитруллинированным белкам/пептидам (АСРА), присутствуют в организме на очень ранней стадии заболевания, часто при отсутствии клинических симптомов. Во многих отчетах указывается, что повышенные уровни анти-CCP антител могут помочь в прогнозировании развития эрозийного заболевания.^{15,16,17,18,19,20} Эти данные позволяют сделать вывод о важной роли циклических цитруллинированных пептидов в диагностике РА на ранней стадии заболевания.







В 2010 г. были опубликованы *Критерии классификации ревматоидного артрита ACR / EULAR*, заменившие "старую" редакцию критериев ACR от 1987 г., которые были широко признаны, но непригодны для ранней диагностики РА. В измененных критериях классификации, опубликованных совместно Американским колледжем ревматологии (ACR) и Европейской лигой по борьбе с ревматизмом (EULAR), рекомендуется использовать систему оценки от 0 до 10. Новые критерии классификации применимы к любому лицу, у которого имеются признаки синовита (недифференцированного воспалительного артрита). Были добавлены четыре дополнительных критерия, а именно: количество вовлеченных суставов, отклонения в серологических анализах, ответ в острой фазе и длительность симптоматики в вовлеченных суставах. Впервые серологические критерии включали измерение АСРА, таких, как анти-CCP, а также некоторые определения низкого положительного и высокого положительного серологического результата.²¹

Анализ Axis-Shield Anti-CCP представляет собой анализ ELISA, основанный на определении аутоантител в человеческой сыворотке или плазме к синтетическому циклическому пептиду, содержащему модифицированные остатки аргинина (пептиды CCP2). Анализ представляет дополнительный инструмент для диагностики пациентов с РА.

П Р И Н Ц И П А Н А Л И З А

Стенки микротитровальных пластин покрыты высокоочищенным синтетическим цитруллинированным пептидом, содержащим модифицированные остатки аргинина. Во время первой инкубации специфические аутоантитела в разбавленной сыворотке или плазме связываются с поверхностью, покрытой антигеном. Затем ячейки промывают для удаления несвязанных компонентов. Во время второй инкубации конъюгат, меченое ферментом поликлональное антитело к человеческому иммуноглобулину, связывается с аутоантителами, связанными на поверхности. После очередного промывания специфические аутоантитела отслеживаются путем инкубации с субстратом. Добавление фиксирующего раствора завершает реакцию, приводя к появлению окрашенного конечного продукта, а количество связанного конъюгата измеряется в единицах поглощения. При качественном анализе количество конъюгата, связанного с пробой, сравнивается с количеством, связавшимся с контрольным образцом. В полуколичественном анализе концентрация анти-ССР аутоантител может быть оценена путем экстраполяции по кривой "доза-ответ", построенной на основании данных калибровочных образцов (далее упоминаются как калибраторы).

К О М П О Н Е Н Т Ы Н А Б О Р А

CONJ	1 × 15,0 мл	Поликлональное антитело козы, меченое пероксидазой хрена, к человеческому иммуноглобулину, 0,1% (масс./об.) р-гидроксифенилуксусной кислоты, 0,15% (масс./в) проклина и 1% стабилизатора белка (крупного рогатого скота) (масс./об.) в буферном растворе HEPES. Готово к использованию. ПРИМЕЧАНИЕ. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ВЕЩЕСТВО	
SUBS	1 × 15,0 мл	3,3',5,5'-тетраметилбензидин, буферный раствор. Готово к использованию. Во время хранения не подвергать воздействию света. ПРИМЕЧАНИЕ. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ВЕЩЕСТВО.	 
SOLN STOP	1 × 15,0 мл	Водный раствор серной кислоты 0,25 моль/л Готово к использованию. ПРИМЕЧАНИЕ. ОПАСНОСТЬ ВЕЩЕСТВО	
BUF WASH 10 X	3 × 25,0 мл	Физиологический раствор, буферизованный фосфатным буфером, 1,3% (об./об.) Tween 20 Разбавить перед использованием.	
MTP 8 x 12	Микротитровальные (разъединяемые) пластины на 8 x 12 ячеек	Покрыты синтетическим циклическим цитруллинированным пептидом, в герметизируемой упаковке из фольги с влагопоглотителем.	
SAMPLE DIL 5 X	1 × 25,0 мл	Фосфатный буфер, стабилизатор белка (крупного рогатого скота), 0,5% (масс./об.) азида натрия. Разбавить перед использованием. ПРИМЕЧАНИЕ. ОПАСНОСТЬ ВЕЩЕСТВО	 
CAL 1	1 × 1,0 мл	Фосфатный буфер, стабилизатор белка (крупного рогатого скота), < 0,1% (масс./об.) азида натрия. 0 Ед./мл. Готово к использованию.	
CAL 2 - CAL 6	5 × 1,0 мл	Человеческая плазма, фосфатный буфер, стабилизатор белка (крупного рогатого скота), < 0,1% (масс./об.) азида натрия. 2, 8, 30, 100, 300 Ед./мл. Готово к использованию.	
CONTROL REF	1 × 1,5 мл	Человеческая плазма, буферный раствор, < 0,1% (масс./об.) азида натрия. Готово к использованию.	
CONTROL +	1 × 0,3 мл	Человеческая плазма, < 0,1% (масс./об.) азида натрия. Перед использованием разбавить в соотношении 1:100 разбавителем проб, также как и образцы.	
CONTROL -	1 × 0,3 мл		

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Стабильность открытого набора

После открывания набора рабочие характеристики набора не ухудшаются при трехкратном использовании в течение трех месяцев. После использования компоненты следует вернуть для хранения при температуре 2-8°C.

Инструкции по обращению и работе

1. Компоненты набора следует хранить при температуре 2-8°C и использовать до истечения срока годности, указанного на этикетках. Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.
2. Не смешивать реагенты с различными номерами партий.
3. Не замораживать наборы.
4. Концентрат буферного раствора для промывки, концентрат разбавителя проб, положительный и отрицательный контроль следует разбавлять перед использованием. Все прочие реагенты готовы к применению.
5. Следует обеспечить защиту разбавленного буферного раствора для промывания и разбавленного разбавителя проб от микробиального загрязнения, после анализа растворы хранить при температуре 2-8°C.
6. Лишние (неиспользованные) микротитровальные пластины хранить в упаковке из фольги с влагопоглотителем. Убедиться в целостности герметичной упаковки и до использования хранить при температуре 2-8°C.
7. Во время хранения не подвергать субстрат воздействию света.
8. Избегать загрязнения реагентов. Для каждого реагента или каждой манипуляции с пробой использовать новый одноразовый наконечник на пипетку.

Признаки ухудшения качества

Субстрат должен быть бесцветным или чуть голубоватого цвета. Помутнение или образование осадка в любом компоненте указывает на ухудшение качества, такой компонент должен быть утилизирован.

В растворе для промывания или разбавления проб могут быть видны кристаллы после извлечения из холодильника, они растворятся после переворачивания пробирки и достижения комнатной температуры.

Сбор проб и хранение

Анализ рекомендован для образцов человеческой сыворотки (включая пробирки сепаратора сыворотки (SST)) или плазмы (EDTA, лития гепарин или натрия цитрат). Другие типы пробирок не испытывались на применение в анализе. Не использовать грубо гемолизированные или мутные пробы. Тщательно перемешайте размороженные образцы перед анализом, избегайте повторного замораживания/размораживания. Не деактивируйте образцы нагреванием, это может привести к ложноположительным результатам.

При подготовке к анализу соблюдайте инструкции изготовителя пробирок по сбору образцов в пробирки. Образцы можно хранить в неразбавленном виде при температуре 2-8°C в течение четырех часов; для более длительного хранения температура должна составлять -20°C или ниже. Образцы, разбавленные в соотношении 1:100 в разбавленном разбавителе для проб, следует использовать в течение 24 часов после разбавления.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики in vitro

Меры обеспечения безопасности





1. Строго соблюдайте инструкции, изложенные в этом буклете, особенно в отношении обращения и условий хранения.




2. Калибраторы и контрольные образцы содержат человеческую плазму, испытанную утвержденными FDA методами анализа на HBsAg, HIV-1 RNA или HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, и anti-HCV или HCV RNA, и установлена их нереакционноспособность/негативные реакции. Поскольку не известны анализы, обеспечивающие полную уверенность в отсутствии инфицирующих компонентов, калибраторы и контрольные образцы следует рассматривать как потенциально инфицирующие, и обращаться с ними с использованием таких же мер предосторожности, как и с другими потенциально биологически опасными материалами. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) утвердил руководства "Защита сотрудников лабораторий от профессионального заражения инфекциями" (M29-A3 – третья редакция),²² в которых описывается, как следует обращаться с такими материалами в соответствии с нормами надлежащей лабораторной практики.
3. Не засасывать жидкость в пипетку ртом.

4. Не курить, не принимать пищу и напитки, не пользоваться косметикой в зонах обращения с наборами и образцами.
5. Любые травмы кожи, порезы, ссадины и другие поражения кожи должны быть надлежащим образом защищены.
6. Калибраторы, контрольные образцы и концентрат разбавителя для образцов содержат азид натрия, который может реагировать со свинцовыми и медными трубами, и образовывать металлические азиды с повышенной взрывоопасностью. При утилизации для предотвращения накопления азидов, сливайте его в канализацию с большим количеством воды.
7. Паспорта безопасности материалов для всех опасных компонентов, содержащихся в наборе, доступны по запросу в компанию Axis-Shield Diagnostics.

Внимание: федеральное законодательство США допускает продажу данного устройства только врачам или по их заказу.

 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Конъюгат	<u>ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ</u> H317 – <u>ПРОФИЛАКТИКА</u> P272 – P280 – P363 –	Може да причини алергична кожна реакция. Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. Изперете замърсеното облекло преди повторна употреба.
 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Субстрат	<u>ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ</u> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 – <u>ПРОФИЛАКТИКА</u> P260 – P280 – <u>ОТВЕТ</u> P301+310 – P304+340 – P305+351+338 –	Вреден при поглъщане. Вреден при контакт с кожата. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Вреден при вдишване Може да предизвика дразнене на дихателните пътища. Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ ПОГЛЪЩАНЕ: Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. ПРИ ВДИШВАНЕ: Изведете пострадалия на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате.
  ОПАСНОСТ Разбавител для образца	<u>ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ</u> H302 – H318 – H412 – EUH032 – <u>ПРОФИЛАКТИКА</u> P264 – P280 – <u>ОТВЕТ</u> P301+310 – P305+351+338 – P330 –	Вреден при поглъщане. Предизвиква сериозно увреждане на очите. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. При контакт с киселини се отделя силно токсичен газ. Да се измие руки старателно след употреба. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ ПОГЛЪЩАНЕ: Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате. Изплакнете устата.

 ОПАСНОСТЬ Фиксирующий раствор	ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ	H314 – Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите.
	ПРОФИЛАКТИКА	P260 – Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли. P273 – Да се избягва изпускане в околната среда. P280 – Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
	ОТВЕТ	
	P301+330+331 – ПРИ ПОГЛЪЩАНЕ: изплакнете устата. НЕ предизвиквайте повръщане. P303+361+353 – ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА (или косата): Незабавно свалете цялото замърсено облекло. Облейте кожата с вода/вземете душ.	
	P304+340 – ПРИ ВДИШВАНЕ: Изведете пострадалия на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането. P305+351+338 – ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате.	

ПОДГОТОВКА

Необходимые, но не входящие в комплект материалы/оборудование

1. Аппарат для чтения планшетов на 96 ячеек/пластин с фильтром 450 нм.
2. Прецизионные пипетки для дозирования 10 мкл, 100 мкл, 1 мл. Автоматическая пипетка для дозирования 100 мкл. Автоматическая пипетка для дозирования 300 мкл для ручного промывания; автоматическая машина для мойки планшетов (не обязательно).
3. Стекланные/пластмассовые мерные цилиндры: 1×100 мл, 1×500 мл.
4. Контейнеры объемом 1 мл.
5. Дистиллированная/деионизированная вода.
6. Бумажные салфетки.
7. Таймер для установки интервалов 30 и 60 минут.

Подготовка к анализу

Перед использованием дайте всем компонентам набора, включая микротитровальные пластины, согреться до 18-25°C в течение 30-60 минут. Перемешайте реагенты, осторожно переворачивая их.

Не разбавляйте контрольный образец.

Разбавьте указанные ниже реагенты и тщательно перемешайте их.

Реагент	Объем	Добавить
Концентрат буферного раствора для промывания	1 флакон	225 мл дистиллированной/деионизированной воды
Концентрат для разбавления проб	1 флакон	100 мл дистиллированной/деионизированной воды
Положительный и отрицательный контроль/образцы	10 мкл	1 мл разбавленного разбавителя для проб

Рассчитайте количество микротитровальных пластин, необходимых для текущего анализа, разместите их в держателе для микротитровальных пластин. Положите неиспользованные пластины в герметизируемый пакет из фольги с влагопоглотителем и уберите для хранения при температуре 2-8°C до следующего использования. Убедитесь, что все пластины надежно закреплены в держателе для микротитровальных пластин. На верхнем крае пластины можно указать номер для идентификации. Сохраните держатель для микротитровальных пластин для дальнейшего использования.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Протокол качественного анализа: анализ контрольного образца, положительного и отрицательного контроля и образцов.

Протокол полуколичественного анализа: анализ калибраторов (1-6), положительного и отрицательного контроля, и образцов.

1. Пометьте ячейки для идентификации.
2. Дважды отмерить пипеткой по 100 мкл контрольного препарата/калибровочных растворов и предварительно разбавленных (1:100) образцов положительного и отрицательного контроля в соответствующие ячейки планшета. Однократно или дважды отмерить пипеткой по 100 мкл предварительно разбавленных (1:100) образцов пациентов в соответствующие ячейки планшета. Анализ образцов рекомендуется дублировать, однако это не обязательно и зависит от правил местной лаборатории. Этот этап не должен занимать более **10 минут** для каждого комплекта из калибраторов/контрольных образцов/образцов пациента.
3. Инкубировать в течение 60 ± 10 минут при температуре $18-25^{\circ}\text{C}$.
4. Слить содержимое пластины, быстро перевернув ее над раковиной, пригодной для утилизации биологических материалов, подразумевая, что образцы могут быть потенциально инфицированы. Промокните перевернутые пластины бумажной салфеткой.
5. Промойте ячейки **четыре раза** не менее чем 300 мкл разбавленного буферного раствора для промывания. **Слейте жидкость и промокните после каждого промывания.**
6. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую ячейку.
7. Инкубировать в течение 30 ± 5 минут при температуре $18-25^{\circ}\text{C}$.
8. Повторите п. 4 и п. 5.
9. Добавьте 100 мкл субстрата в каждую ячейку.
10. Инкубировать 30 ± 5 минут при температуре $18-25^{\circ}\text{C}$. **Не сливать.**
11. Добавить в каждую ячейку 100 мкл фиксирующего раствора, в том же порядке и с той же скоростью, что и субстрат. Осторожно постучите по пластине для перемешивания содержимого и убедитесь, что в ячейках не видны пузырьки.
12. Измерьте оптическую плотность при 450 нм.
13. Все измерения должны быть выполнены в течение 60 минут после начала анализа.

РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При расчете и интерпретации результатов измерения данные для каждого анализа учитываются по отдельности.

Протокол качественного анализа

Рассчитайте среднее значение соотношения поглощения (оптической плотности) для положительного и отрицательного контроля, а также для каждого (среднее значение) образца относительно среднего значения оптической плотности контрольного образца:

$$\text{Коэффициент поглощения} = \frac{\text{Среднее значение поглощения контрольного образца}}{\text{Среднее значение поглощения контрольного образца}}$$

$$\text{Коэффициент поглощения} = \frac{(\text{Среднее}) \text{ значение поглощения образца}}{\text{Среднее значение поглощения контрольного образца}}$$

Пользователь должен рассчитать пределы значений между положительными и отрицательными образцами, специфичные для конкретной популяции пациентов. По результатам клинических испытаний Axis-Shield предлагает следующие пределы для популяций пациентов:

<u>Соотношение поглощения</u>	<u>Интерпретация результата</u>
< 0,95	Отрицательно
≥ 0,95 - ≤ 1,0	Пограничное значение - рекомендуется повторить анализ
> 1,0	Положительно

Протокол полуколичественного анализа

На миллиметровой бумаге постройте график зависимости среднего значения поглощения каждого калибратора от \log_{10} концентрации калибратора (см. таблицу ниже). Затем на калибровочной кривой можно найти средние концентрации позитивных и негативных контрольных образцов и (среднего значения) образцов пациента; типичный график калибровочной кривой приведен ниже для справки, не используйте его для интерпретации результатов. Удовлетворительным является 4-параметрический логарифмический подбор кривой и кубический сплайн. Другие модели подбора кривой не рекомендуются.

Образцы, поглощение которых больше, чем у калибратора 6 (300 Ед/мл) находятся за пределами диапазона применимости анализа и должны регистрироваться как > 300 Ед/мл, разбавляться и анализироваться повторно, с коррекцией на дальнейший коэффициент разбавления.

Для интерперетации результатов полуколичественного анализа и на основании справочных популяционных данных* компании Axis-Shield предлагается следующее:

(Средний) результат для образца
 ≤ 5 Ед/мл
 > 5 Ед/мл

Интерпретация результата
Отрицательно
Положительно

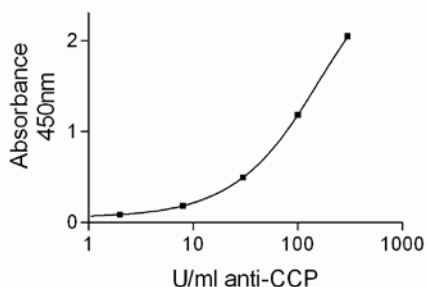
* Эти данные предлагаются только в качестве руководства. Рекомендуется, чтобы пользователи определили нормированную область значений, которая может быть уникальной для популяции.

Примечание: как и в любом анализе на антитела, в этом анализе определяется активность антител, присутствующих в образце, а не концентрация. Активность может изменяться в зависимости от ряда параметров, таких как avidность антител.

Концентрации калибраторов

Номер калибратора	Концентрация Ед./мл
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Типичная калибровочная кривая



К О Н Т Р О Л Ь К А Ч Е С Т В А

Убедитесь, что техническое обслуживание и калибровка аппарата для чтения планшетов соответствуют инструкциям изготовителя, и используется надлежащая длина волны.

Пользователи должны быть уверены в том, что они полностью ознакомились с инструкциями по проведению анализа, особенно, с разделами "Предостережения и меры предосторожности" и "Инструкции по обращению и работе". Перед тем, как сообщить результаты анализа пациенту пользователи должны продемонстрировать, что они могут получить характеристики производительности в отношении точности и пригодные для регистрации результаты анализа, сопоставимые с результатами, представленными изготовителем. Для контроля качества процедуры анализа рекомендуется всегда дублировать анализ для предварительно разбавленного положительного и отрицательного контроля. Во всех качественных анализах дублируйте анализ готового к использованию контрольного образца.

Исходя из предположения, что соблюдаются спецификации воспроизводимости, указанные изготовителем, ошибка для любого контрольного образца, при которой соотношение для контрольных образцов будет ниже заданных в спецификации значений, означает неверный анализ, результаты которого не следует сообщать пациенту. Оператор может повторить анализ, проверив процедуру его выполнения, или должен обратиться к поставщику/изготовителю. При повторении анализа приготовьте свежеразбавленные растворы для каждого контрольного образца и образца пациента. При выполнении каждого анализа лаборатории могут использовать применяемые в учреждении средства контроля. Хранить такой контрольный материал при температуре не выше -

20°C и не допускать повторных циклов заморозки/оттаивания. Консерванты, такие как азид натрия в концентрации 0,1% (в отношении веса к объёму), не влияют на результаты анализа проб.

Уровни анализируемых веществ, идентифицируемые при конкретных заболеваниях, определены изготовителем для конкретных популяций, и могут быть не отображены в литературе. Уровни частоты заболеваемости, их взаимосвязь с конкретными заболеваниями, нормированные области значений и применимые пределы должны рассчитываться для конкретных популяций, с которыми работает пользователь.

Спецификации соотношения для контрольных образцов

Протокол	Спецификации
Качественный (соотношения)	Поглощение образца положительного контроля
	Поглощение контрольного образца $\geq 1,1$
	Поглощение образца отрицательного контроля
	Поглощение контрольного образца $< 0,95$
Полуколичественный	Ожидаемый диапазон приемлемых значений (Ед./мл) см. на этикетке флакона с положительным контролем
	Концентрация образца отрицательного контроля < 2 Ед./мл

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При помощи анализа Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200) были проверены 200 образцов сыворотки, взятых у внешне здоровых доноров без симптомов заболевания в возрасте от 18 до 72 лет. Количество мужчин [n = 105] и женщин [n = 95] среди доноров было примерно одинаковым.

Не наблюдалось различий, которые можно было бы приписать разнице в поле и возрасте (рассчитанный возраст сравнения составил ≤ 40 лет [n = 115] и > 40 лет [n = 85]).

В целом, средняя концентрация анти-CCP для этой популяции составила $0,63 \pm 0,419$ Ед./мл (диапазон 0,05-3,8 Ед./мл).

На основании данных этой эталонной популяции и данных для клинической популяции предполагаемые пределы анализа составляют:

Нормированная область значений
 ≤ 5 Ед./мл = Отрицательно
 > 5 Ед./мл = Положительно

Эта нормированная область значений предлагается только в качестве руководства, каждая лаборатория должна установить собственный диапазон нормированных значений, который может быть уникальным для популяции, обслуживаемой лабораторией, в зависимости от географического положения, пациентов, диетических факторов, условий окружающей среды или клинической практики. Обратите внимание, что ревматоидный артрит возникает у женщин в два раза чаще, чем у мужчин.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность разбавления

Анализ Axis-Shield Anti-CCP разработан таким образом, чтобы сохранялась линейность измеряемых значений в диапазоне от предела обнаружения (ПО) до 300 Ед./мл.

На основании исследования, выполненного в соответствии с указаниями документа EP6-A²³ CLSI, анализ Axis-Shield Anti-CCP демонстрирует линейность в диапазоне значений от 1,04 Ед./мл до 300 Ед./мл.*

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных

Образцы > 300 Ед./мл демонстрируют среднее значение $\leq 100\% \pm 15\%*$ от ожидаемого результата при разбавлении в диапазоне значений, используемых для анализа, и применении правильного коэффициента разбавления.

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных

Клиническая чувствительность и специфичность

Клиническая чувствительность анализа Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) была определена для 229 пациентов с подтвержденным диагнозом РА, а клиническая специфичность была определена для 285 образцов субъектов без диагноза РА (135 образцов взяты у пациентов с другими ревматическими и не ревматическими заболеваниями, 150 образцов взяты у внешне здоровых лиц без симптоматики заболевания). При использовании порога 5,0 Ед./мл расчетная чувствительность составила 78% со специфичностью 99%. Результаты суммированы в таблицах ниже.*

Категория образца	Всего n	Положительно n	% чувствительности
РА	229	179	78

Категория образца	Всего n	Положительно n	% специфичности
Образцы не РА, всего	285	4	98,6
Здоровые без симптомов, не РА	150	1	99,3
Образцы с заболеваниями не РА ⁺	135	3	97,8

⁺ Клиническая специфичность для 135 образцов, взятых у пациентов с другими ревматоидными и неревматоидными заболеваниями подразделена на категории в следующей таблице.*

Образцы заболеваний не РА	Всего n	Положительно n	Клиническая специфичность
Всего	135	3	97,8%
Воспалительный полиартрит	41	1	97,6%
IgG, положительный к вирусу Эпштейна-Барра	18	1	94,4%
Тиреоидит Хашимото	17	0	100%
Синдром Шегрена	16	1	93,8%
Системная эритематозная волчанка	16	0	100%
Васкулит	5	0	100%
Склеродерма	5	0	100%
Остоартрит	4	0	100%
Болезнь Крона	3	0	100%
Болезнь Рейно	3	0	100%
Язвенный колит	2	0	100%
Псориатический артрит	2	0	100%
Реактивный артрит	1	0	100%
Анкилозирующий спондилоартрит и полимиозит	2	0	100%

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Сравнение методов

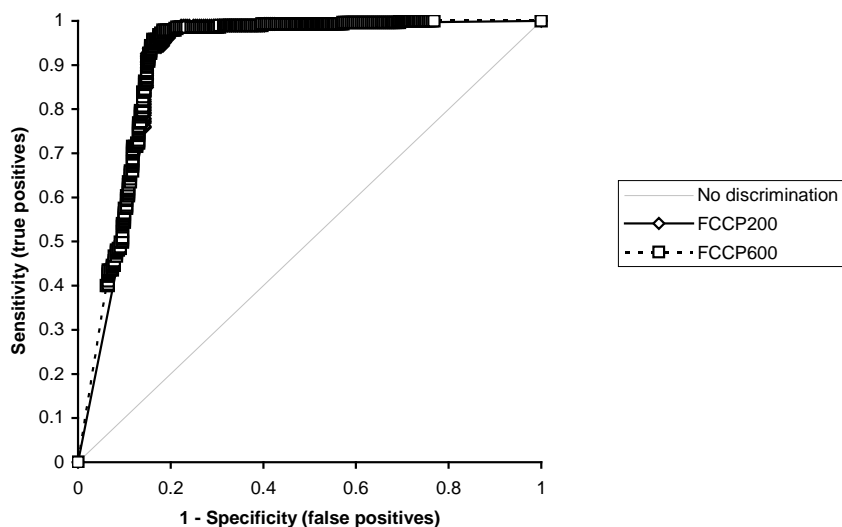
Анализ Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) разработан для обеспечения $\geq 99\%$ соответствия для РА и не РА образцов при сравнении с анализом Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200). РА и не РА образцы, описанные в разделе "Клиническая чувствительность и специфичность" использовали для сравнения анализа Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) с анализом Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200). Порог, использованный для анализа Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200), составил 5,0 Ед./мл, как указано изготовителем в листке-вкладыше. При использовании порога 5,0 Ед./мл для анализа Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) расчетное соответствие составило 99%. Результаты суммированы в таблицах ниже.*

Все образцы (514)		FCCP200	
		Положительно	Отрицательно
FCCP600	Положительно	179	4
	Отрицательно	1	330

Сравнение методов	FCCP600 и FCCP200
Количество образцов	65
Наклон кривой	0,910
Отрезок, отсекаемый на оси Y	1,226
Коэффициент корреляции	0,94

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Анализ характеристик оператора приемника (ХОР) выполнялся с использованием указанных выше данных, полученных в двух анализах. Площадь под кривой (AUC) для анализа Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) составила 0,910 (95% доверительный интервал: 0,881-0,940) и составила 0,903 (95% доверительный интервал: 0,871-0,934) для анализа сравнения Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200), указывая таким образом, что оба анализа сопоставимы в отношении их клинической дифференциации. Кривая анализа ХОР представлена ниже.*



* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Воспроизводимость

Исследование выполнялось на основании указаний документа CLSI (официальное название NCCLS) EP5-A2.²⁴ Два контрольных образца anti-CCP, шесть пластин для контроля качества (QC) и один образец сыворотки человеческой крови анализировали с использованием двух партий реагентов, каждый раз дублируя анализ, анализ выполняли два раза в день разное время, анализы выполнялись на протяжении 20 дней (n=80). Данные этого исследования суммированы в таблице ниже в виде репрезентативных данных (с округлением до 1 десятичного знака после запятой):

Образец	Набор Партия	n	Среднее (Ед./мл)	В пределах одного анализа		Между анализами		Между днями		Всего	
				CO	%KB	CO	%KB	CO	%KB	CO	%KB
Положительный контроль	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
Контрольный образец	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
Образец 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

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных

Предел обнаружения

Предел обнаружения (ПО) анализа Axis-Shield Anti-CCP, в соответствии с документом CLSI (официальное название NCCLS) EP17-A²⁵, был определен на уровне 1,04 Ед./мл*.

Определение ПО выполняли с использованием одного негативного анти-CCP образца (60 повторов) и шести низкоуровневых образцов анти-CCP (15 повторов каждый).

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Эффект высокой дозы

Эффект высокой дозы - это явление, при котором образцы с очень высоким содержанием анализируемого компонента могут считываться в динамическом диапазоне анализа. Для анализа Axis-Shield Anti-CCP при анализе образца, содержащего примерно 3000 Ед./мл анти-CCP, эффект высокой дозы не наблюдался.*

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Помехи

Анализ Axis-Shield Anti-CCP разработан таким образом, чтобы обеспечить максимальное отклонение концентрации анти-CCP от указанных ниже потенциально мешающих компонентов в пределах:

- $\pm 15\%$ для концентраций анти-CCP $\geq 10,0$ Ед./мл
- $\pm 10\%$ для концентраций анти-CCP от $\geq 4,0$ Ед./мл до $< 10,0$ Ед./мл
- $< 0,75$ Ед./мл для концентраций анти-CCP $< 4,0$ Ед./мл

Исследование было выполнено на основании руководств Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), изложенных в документе EP7-A²⁶, для анализа Axis-Shield Anti-CCP. К шести образцам с уровнем анти-CCP во всем анализируемом диапазоне добавляли потенциально мешающие соединения, указанные в таблице ниже. Во время этих исследований максимальное отклонение концентрации анти-CCP наблюдалось в образцах в диапазоне:

- от -9,4% до 3,3% для концентраций анти-CCP $\geq 10,0$ Ед./мл
- от -7,3% до 4,8% для концентраций анти-CCP от $\geq 4,0$ Ед./мл до $< 10,0$ Ед./мл
- от -0,6 Ед./мл до 0,05 Ед./мл для концентраций анти-CCP $< 4,0$ Ед./мл*

Потенциально мешающее вещество	Влияние не обнаружено до указанной концентрации
Гемоглобин	4 мг/мл
Билирубин	0,2 мг/мл
Триглицериды (интралипидный раствор)	15 мг/мл
Ревматоидный фактор	200 МЕ/мл
Общий белок (гамма-глобулины)	120 мг/мл

* Репрезентативные данные; результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от этих данных.

О Г Р А Н И Ч Е Н И Я П Р И М Е Н Е Н И Я

1. Несмотря на то, что наличие антител к CCP связано с ревматоидным артритом, положительный результат сам по себе не позволяет сделать окончательный диагноз и должен рассматриваться с учетом других клинических и лабораторных данных.
2. У некоторых людей могут быть высокие уровни анти-CCP антител с минимальными или отсутствующими клиническими признаками заболевания. И, наоборот, у некоторых пациентов с активным заболеванием могут быть неопределяемые уровни этих антител. Клиническая значимость этой информации в настоящее время неясна.
3. Поскольку результат анализа на анти-CCP не позволяет диагностически подтвердить наличие или отсутствие клинического заболевания, не следует начинать терапию на основании только положительного результата анализа на анти-CCP
4. Начало или изменение лечения должно основываться не на изменении концентрации анти-CCP аутоантител, а на клинических наблюдениях.
5. Клиническая эффективность мониторинга аутоантител к CCP как показателя прогрессирования/ремиссии ревматоидного артрита не определена.
6. Значение анти-CCP при хроническом полиартрите у детей не определено.
7. Вследствие специфических характеристик взаимодействия антигена и антител, в анализе определяется не концентрация, а активность. Поскольку в сыворотке пациента содержатся гетерогенные популяции антител, некоторые образцы могут давать нелинейные зависимости, особенно при очень высоких разведениях образца.

БИБЛИОГРАФИЯ

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






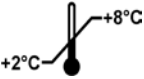

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, UK
(Великобритания).

Тел.: +44 (0) 1382 422000, Факс: +44 (0) 1382 422088.

Эл. почта: shield@axis-shield.com

Интернет: www.axis-shield.com



IVD	Устройство медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
REF	Номер по каталогу
LOT	Партия
	96 анализов
	Внимание
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Беречь от воздействия света
	Использовать до
	Хранить при температуре 2-8°C
Rx Only	Отпускается по рецепту
	Изготовлено
CONTROL +	Положительный контроль
CONTROL -	Отрицательный контроль
CONJ	Конъюгат
SUBS	Субстрат
SOLN STOP	Фиксирующий раствор
BUF WASH 10 X	Буферный раствор для промывания
MTP 8 x 12	Микротитровальные (разъединяемые) пластины
SAMPLE DIL 5 X	Разбавитель для образца
CAL 1	Калибратор 1
CAL 2 - CAL 6	Калибратор 2-6
CONTROL REF	Контрольный образец