



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP600

Určeno pouze pro použití odborníky



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, Velká Británie.

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

E-mail: shield@axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

Test Axis-Shield Anti-CCP test je semi-kvantitativní/kvalitativní enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) k detekci autoprotilátek třídy IgG, specifických proti cyklickým citrulinovaným proteinům (CCP) v humánním séru (včetně zkumavky se separačním gelem (SST)) nebo plazmě (EDTA, lithium heparin nebo citrát sodný). Detekce protilátek anti-CCP slouží jako pomůcka při stanovování diagnózy revmatoidní artritidy (RA) a je třeba ji používat ve spojení s dalšími klinickými informacemi. Stav autoprotilátek představuje jeden z parametrů v diagnostickém procesu hodnotícím více kritérií, zahrnující klinické i laboratorní hodnocení. Určeno pro použití v diagnostice in vitro.

ÚVOD

Revmatoidní artritida (RA) je známé, systémové autoimunitní onemocnění, které postihuje 0,5–1 % dospělé populace. Pro RA je charakteristický chronický zánět kloubní nitroblány, který může vést k progresivní destrukci kloubu a v mnoha případech způsobuje invaliditu a vede tak ke snížení kvality života.¹ Je všeobecně uznáváno, že včasná intervence je zásadní v prevenci nevratného poškození kloubů a tudíž je velmi důležité, aby diagnóza RA byla stanovena co možná nejdříve.^{2,3} Diagnóza RA je v první řadě založena na klinických, radiologických a imunologických aspektech. Nejčastěji prováděným sérologickým testem je měření revmatoidního faktoru (RF).⁴ Ačkoli je test RF dostatečně citlivý, není specifický pro RA, neboť je často přítomen i u zdravých jedinců a u pacientů s dalšími revmatickými a zánětlivými onemocněními, autoimunitními onemocněními nebo chronickými infekcemi.⁵

Již před řadou let bylo zjištěno, že protilátky na anti-perinukleární faktor (APF) a keratin (AKA) jsou vysoce specifické pro RA. Později bylo zjištěno, že obě tyto protilátky reagují s nativním filagrinem a nyní se uvádějí jako anti-filagrin protilátky (AFA).^{6,7,8} Poslední důkaz prokázal, že všechny tyto protilátky jsou nasměrované na epitopy obsahující citrulin.⁹ Citrulin je nestandardní aminokyselina, která není inkorporována do proteinů během proteinové syntézy. Je vytvářena až modifikací po translaci, deiminací argininu, který je součástí peptidu, a to pomocí enzymu peptidylarginin deiminázy (PAD).¹⁰ V roce 1998 prokázal Schellekens a spol., že autoprotilátky reagující s lineárními syntetickými peptidy obsahujícími citrulin jsou v testech na bázi ELISA vysoce specifické pro RA.¹¹ Pozdější studie prokázaly, že cyklické varianty těchto lineárních peptidů, označované jako cyklické citrulinované peptidy (CCP) byly také pro RA specifické, avšak s větší citlivostí než lineární peptidy.¹² Po dalším úsilí k zlepšení citlivosti testu CCP byl vyvinut nový test (CCP2) obsahující antigeny, které byly identifikovány při prohledávání knihovny peptidů obsahujících citrulin s pomocí sér nemocných s RA. V porovnání s testem CCP1 má test CCP2 vynikající účinnost.¹³ V posledních letech potvrdila řada publikovaných zpráv účinnost testu CCP2 v procesu stanovení diagnózy RA.¹⁴ Bylo prokázáno, že anti-CCP protilátky, nazývané také jako protilátky proti citrulinovaným proteinům/peptidům (ACPA), jsou přítomné v časném stádiu onemocnění, často bez klinických příznaků, a mnoho zpráv ukazuje, že zvýšené hladiny anti-CCP protilátek predikují vznik erozivního onemocnění.^{15,16,17,18,19,20} Tyto závěry naznačují, že cyklické citrulinované peptidy hrají důležitou roli při stanovování diagnózy RA v raném stádiu onemocnění.







V roce 2010 *EULAR (European League Against Rheumatism)* vydala ve spolupráci s *ACR (American College of Rheumatology)* přepracovala a nahradila „stará“ kritéria ACR pro revmatoidní artritidu z roku 1987, která byla považována za nevhodná pro časnou diagnózu RA. Revidovaná klasifikační kritéria, publikována společně *American College of Rheumatology (ACR)* a *European League Against Rheumatism (EULAR)*, doporučují používat skórovací systém od 0 do 10. Nová klasifikační kritéria by se měla aplikovat u každého jedince vykazujícího definitivní synovitidu (nediferencovanou zánětlivou synovitidu). Nová čtyři kritéria jsou počet postižených kloubů, sérologická abnormalita, zvýšená odpověď akutní fáze a trvání symptomů v postižených kloubech. Poprvé zahrnují sérologická kritéria měření protilátek ACPA, například anti-CCP, a rovněž definici výsledku sérologie s nízkou a vysokou pozitivitou.²¹

Test Axis-Shield Anti-CCP se detekce autoprotilátek na bázi ELISA v humánním séru nebo plazmě proti syntetickým cyklickým peptidům s obsahem modifikovaných argininových zbytků (CCP2 peptidy). Test je dalším nástrojem v diagnostifikování pacientů s RA.

PRINCIPY METODY

Jamky mikrotitrových stripů jsou potaženy vysoce purifikovanými cyklickými citrulinovanými peptidy s obsahem modifikovaných argininových zbytků. Během první inkubace vytváření specifické autoprotilátky v naředěném séru nebo plazmě vazbu na povrch potažený antigeny. Jamky se potom vymývají, aby se odstranil nenavázaný materiál. Během druhé inkubace se váže konjugát, enzymem značená polyklonální protilátka proti humánnímu IgG, na autoprotilátky navázané na povrchu. Po dalším promytí se inkubováním se substrátem vyhledávají specifické autoprotilátky. Přidáním zastavovacího roztoku se reakce ukončí; jejím výsledkem je zbarvený konečný produkt a měří se množství navázaného konjugátu v tzv. absorbančních jednotkách. V protokolu o kvalitě se porovnává množství navázaného konjugátu vzorkem s referenčním kontrolním množstvím. V semi-kvantitativním protokolu se provádí odhad koncentrace anti-CCP autoprotilátky interpolací z křivky odpovědi dávky na bázi kalibrátorů.

KOMPONENTY SOUPRAVY

CONJ	1 × 15,0 ml	Kozí polyklonální protilátka značená křenovou peroxidázou proti humánnímu IgG, 0,1 % (w/v) p-hydroxyfenyloctová kyselina, 0,15 % (w/v) Proclinu a 1 % proteinového (bovinního) stabilizátoru (w/v) v pufru HEPES. Připraveno k okamžitému použití. N.B. VAROVÁNÍ	
SUBS	1 × 15,0 ml	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, pufrový roztok. Připraveno k okamžitému použití. Během skladování chraňte před světlem. N.B. VAROVÁNÍ	 
SOLN STOP	1 × 15,0 ml	Kyselina sírová 0,25 mol/l vodný roztok Připraveno k okamžitému použití. N.B. NEBEZPEČÍ	
BUF WASH 10 X	3 × 25,0 ml	Fyziologický roztok pufrovaný fosfátem, 1,3 % (v/v) Tween 20 Před použitím nařed'te.	
MTP 8 x 12	8 x 12 jamek na mikrotitrových (odlomitelných) stripech	Potahované syntetickým cyklickým citrulinovaným peptidem, ve fóliovém, znovu uzavíratelném obalu s desikantem.	
SAMPLE DIL 5 X	1 × 25,0 ml	Fosfátový pufr, proteinový (bovinní) stabilizátor, 0,5 % (w/v) azidu sodného. Před použitím nařed'te. N.B. NEBEZPEČÍ	 
CAL 1	1 × 1,0 ml	Fosfátový pufr, proteinový (bovinní) stabilizátor, < 0,1% (w/v) azidu sodného. 0 U/ml. Připraveno k okamžitému použití.	
CAL 2 - CAL 6	5 × 1,0 ml	Humánní plazma, fosfátový pufr, proteinový (bovinní) stabilizátor, < 0,1 % (w/v) azid sodný. 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. Připraveno k okamžitému použití.	
CONTROL REF	1 × 1,5 ml	Humánní plazma, pufr, < 0,1 % (w/v) azid sodný. Připraveno	
CONTROL +	1 × 0,3 ml	Humánní plazma, < 0,1 % (w/v) azid sodný. Nařed'te v poměru 1:100 naředěným ředidlem pro vzorky, jako vzorky.	
CONTROL -	1 × 0,3 ml		

UCHOVÁVÁNÍ ČINIDEL

Stabilita otevřené soupravy

Souprava byla otevřena a opakovaně použita třikrát během tří měsíců bez nepříznivého vlivu na účinnost soupravy. Po použití se komponenty musí vrátit a uchovávat při teplotě 2–8 °C.

Procedurální poznámky a zacházení se soupravou

1. Komponenty soupravy uchovávejte při 2–8 °C a spotřebujte do data použitelnosti na etiketě. Činidla s prošlým datem použitelnosti nepoužívejte.
2. Nemíchejte různá čísla šarží.
3. Chraňte před mrazem.
4. Koncentrát promývacího pufru, koncentrát ředidla pro vzorky a pozitivní a negativní kontroly se musí před použitím naředit. Všechna ostatní činidla jsou připravena k použití.
5. Chraňte naředěný promývací pufr a naředěné ředidlo pro vzorky před mikrobiální kontaminací a po použití je uchovávejte při 2–8 °C.
6. Zbytek (nepoužitých) mikrotitrových stripů vraťte do fóliového obalu s desikantem. Zajistěte, aby byly dobře uzavřené a až do doby dalšího použití uchovávejte při 2–8 °C.
7. Substrát během skladování chraňte před světlem.
8. Zabraňte kontaminaci činidel. Pro každé činidlo a každou manipulaci se vzorkem použijte vždy novou jednorázovou špičku pipety.

Indikace deteriorizace

Substrát musí být bezbarvý až velmi světle modrý. Zákal nebo sraženiny v některé z komponent indikují deteriorizaci a taková komponenta se musí zlikvidovat.

Jestliže v promývacím nebo ředícím roztoku jsou po vyjmutí z chladného uchovávání viditelné krystalky, tyto po převrácení nebo vyrovnání na pokojovou teplotu zmizí.

Sběr vzorků a uchovávání


Test je doporučen pro vzorky humánního séra (včetně zkumavky se separačním gelem (SST)) nebo plazmy (EDTA, lithium heparin nebo citrát sodný). Jiné typy zkumavek nebyly pro použití v tomto testu testovány. Nepoužívejte silně hemolyzované nebo zakalené vzorky. Pečlivě promíchejte rozmražené vzorky a opakovaně je nezmrazujte/nerozmrazujte. Neaktivní vzorky nezahřívajte, to by mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům.

Při přípravě na analýzu postupujte podle pokynů výrobce zkumavky pro odběrné zkumavky. Nerozředěné vzorky je možné uchovávat při 2–8 °C po dobu čtyř týdnů; pro dlouhodobé skladování při -20 °C nebo méně. Vzorky naředěné v poměru 1:100 v ředícím roztoku pro vzorky se musí spotřebovat během 24 hodin od naředění.






VÝSTRAHY A UPOZORNĚNÍ

Pouze k diagnostice *in vitro*.

Bezpečnostní opatření

1. Držte se striktně pokynů v této příručce, zejména v části manipulace a podmínky uchovávání.
2.  Kalibrátory a kontroly obsahují humánní plazmu testovanou testy FDA prováděnými pro HBsAg, HIV-1 RNA nebo HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 a anti-HCV nebo HCV RNA a prokázány jako nereaktivní/negativní. Jelikož žádný známý test neposkytuje stoprocentní jistotu, že neobsahuje infekční látky, je třeba s kalibrátory a kontrolami zacházet jako s potencionálně infekčním materiálem a dodržovat tudíž stejná bezpečnostní opatření jako u jiných potencionálně biologicky nebezpečných materiálů. Pokyny „Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections“ (M29-A3– třetí vydání), schválené organizací Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),²² uvádějí, jakým způsobem zacházet s těmito materiály v souladu se zásadami správné laboratorní praxe.
3. Nepipetujte ústy.
4. Nekuřte, nepijte, nejezte ani neaplikujte kosmetické přípravky v prostorách, kde se manipuluje se vzorky a soupravami s činidly.
5. Jakákoli poškození kůže, jako například oděrky, říznutí a další kožní léze je třeba vhodně ochránit.
6. Kalibrátory, kontroly a koncentrát ředidla vzorků obsahují azid sodný, který může reagovat s olovem a mědí v potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy kovů. Při likvidaci splachujte velkým množstvím vody, aby nedocházelo k usazeninám azidu.
7. Bezpečnostní materiálové listy pro všechny nebezpečné komponenty obsažené v této soupravě jsou k dispozici na vyžádání ve společnosti Axis-Shield Diagnostics.

Upozornění: Prodej tohoto přípravku je, na základě Federálního zákona, možný pouze lékařem nebo na lékařský předpis.

 <p>VAROVÁNÍ</p> <p>Konjugát</p>	<p><u>VAROVÁNÍ</u> H317 –</p> <p><u>PREVENCE</u> P272 – P280 – P363 –</p>	<p>Může vyvolat alergickou kožní reakci.</p> <p>Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte.</p>
 <p>VAROVÁNÍ</p> <p>Substrát</p>	<p><u>VAROVÁNÍ</u> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 –</p> <p><u>PREVENCE</u> P260 – P280 –</p> <p><u>REAKCE</u> P301+310 – P304+340 – P305+351+338 –</p>	<p>Zdraví škodlivý při požití. Zdraví škodlivý při styku s kůží. Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Zdraví škodlivý při vdechování. Může způsobit podráždění dýchacích cest.</p> <p>Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.</p> <p>PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte jej v klidu v poloze usnadňující dýchání. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.</p>
  <p>NEBEZPEČÍ</p> <p>Ředidlo pro vzorek</p>	<p><u>VAROVÁNÍ</u> H302 – H318 – H412 – EUH032 –</p> <p><u>PREVENCE</u> P264 – P280 –</p> <p><u>REAKCE</u> P301+310 – 305+351+338 – P330 –</p>	<p>Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje vážné poškození očí. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.</p> <p>Po manipulaci důkladně omyjte Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.</p> <p>PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Vypláchněte ústa</p>
 <p>NEBEZPEČÍ</p> <p>Zastavovací roztok</p>	<p><u>VAROVÁNÍ</u> H314 –</p> <p><u>PREVENCE</u> P260 – P273 – P280 –</p> <p><u>REAKCE</u> P301+330+331 – P303+361+353 – P304+340 – P305+351+338 –</p>	<p>Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.</p> <p>Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.</p> <p>PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení. PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte jej v klidu v poloze usnadňující dýchání. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.</p>

Ř Í P R A V A

Potřebné materiály/vybavení, které se nedodává

1. Snímač 96jamkové destičky/stripu s 450nm filtrem.
2. Přesné pipety k dávkování 10 µl, 100 µl, 1 ml. Automatická pipeta k dávkování 100 µl. Automatická pipeta k dávkování 300 µl pro manuální promývání; volitelně automatická myčka destiček.
3. Skleněné/plastové odměrné válce: 1×100 ml, 1×500 ml.
4. Nádoby o objemu 1 ml.
5. Destilovaná/deionizovaná voda.
6. Papírové utěrky.
7. Časovač pro intervaly 30 a 60 minut.

Příprava k testu

Před použitím nechte všechny komponenty soupravy, včetně mikrotitrových stripů, zahřát na teplotu 18–25 °C po dobu 30–60 minut. Činidla jemným převrácením promíchejte.

Referenční kontrolu neředte.

Následující činidla naředte a řádně promíchejte.

Činidlo	Množství	Přidat
Koncentrát promývacího pufru	1 lahvička	225 ml destilované/deionizované vody
Koncentrát ředidla pro vzorky	1 lahvička	100 ml destilované/deionizované vody
Pozitivní a negativní kontroly/vzorky	10 µl	1 ml naředěného ředidla pro vzorky

Vypočítejte počet mikrotitrových stripů potřebných pro aktuální test a ponechte je v držáku mikrotitrových stripů. Zbytek stripů vraťte do fóliového, znovu uzavíratelného obalu s desikantem a uchovávejte až do dalšího použití při 2–8 °C. Zkontrolujte, zda všechny stripy jsou bezpečně uloženy v držáku mikrotitrových stripů. Uživatelé mohou každý strip na horním okraji očíslovat, aby se usnadnila identifikace. Ponechte si držáky mikrotitrových stripů pro další použití.

PROTOKOL TESTU

Kvalitativní protokol: referenční kontrola testu, pozitivní a negativní kontroly a vzorky.

Semi-kvantitativní protokol: kalibrátory testu (1-6), pozitivní a negativní kontroly a vzorky.

1. Referenční jamky pro identifikaci.
2. Do správných jamek dvojmo napipetujte 100 µl referenční kontroly/kalibrátorů a předem naředěné (1:100) pozitivní a negativní kontroly. Do správných jamek napipetujte, jednou nebo dvojmo, 100 µl předem naředěných (1:100) patientských vzorků. Doporučuje se vzorky analyzovat dvojmo, není to však povinné a záleží to na předpisech místní laboratoře. Tento krok nesmí trvat déle než **10 minut** pro každou sadu kalibrátorů/kontrol/vzorků.
3. Inkubujte 60 ± 10 minut při 18–25 °C.
4. Obsah stripu slijte rychlým obrácením do vhodného umyvadla pro likvidaci biologických materiálů a mějte na paměti, že vzorky mohou být potencionálně infekční. Převrácené stripy dobře vysajte papírovými utěrkami.
5. Jamky promyjte **čtyřikrát** minimálně 300 µl naředěného promývacího pufru. **Po každém promývacím kroku slijte a vysajte.**
6. Přidejte 100 µl konjugátu do každé jamky.
7. Inkubujte 30 ± 5 minut při 18–25 °C.
8. Opakujte kroky 4 a 5.
9. Přidejte 100 µl substrátu do každé jamky.
10. Inkubujte 30 ± 5 minut při 18–25 °C. **Neslívejte.**
11. Přidejte 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky, ve stejném pořadí a rychlosti jako jste přidávali substrát. Opatrně jamky vytřeste, aby se smísila činidla a dávejte pozor, aby tam nebyly vzduchové bubliny.
12. Stripy odečtěte při 450 nm.
13. Výsledky testu odečtěte během 60 minut od dokončení testu.

VÝPOČET A INTERPRETACE VÝSLEDKU

Při výpočtu a interpretaci výsledků posuzujte každý test zvlášť.

Kvalitativní protokol

Vypočtete poměr průměrných hodnot (optické hustoty) pro pozitivní a negativní kontroly a pro každý (průměrný)vzorek k průměrné hodnotě absorbance referenční kontroly:

$$\text{Poměr absorbance} = \frac{\text{Průměrná hodnota absorbance kontroly}}{\text{průměrná hodnota absorbance referenční kontroly}}$$

$$\text{Poměr absorbance} = \frac{\text{(Průměrná) hodnota absorbance vzorků}}{\text{průměrná hodnota absorbance referenční kontroly}}$$

Uživatelé musí vypočítat mezní hodnotu (cut-off) mezi pozitivními a negativními vzorky, která je specifická pro jejich populace pacientů. Výsledky populace pacientů používané v klinické zkoušce Axis-Shield vedou k následujícím hodnotám cut-off:

<u>Poměr absorbance</u>	<u>Interpretace výsledku</u>
< 0,95	Negativní
≥ 0,95 až ≤ 1	Hraniční stav – doporučuje se opakovat testování
> 1,0	Pozitivní

Semi-kvantitativní protokol

Na vhodný milimetrový papíre sestrojte diagram průměrné hodnoty absorbance každého kalibrátoru vůči log₁₀ koncentrace kalibrátoru (viz následující tabulka). Průměrná koncentrace pozitivních a negativních kontrol a (průměrný) vzorků se potom odečtou z kalibrační křivky; jako ukázka slouží typický graf kalibrační křivky na obrázku níže, k interpretaci výsledků se nesmí použít. Čtyřparametrové (4PL) logaritmické a kubické spline aproximace křivky jsou přijatelné. Nedoporučují se jiné modely aproximace křivky.

Vzorky s hodnotami absorbance nad kalibrátorem 6 (300 U/ml) jsou mimo rozsah testu a musí se hlásit jako > 300 U/ml, naředěné a opakovaně testované, korekční pro tento další faktor ředění.

Pro interpretaci semikvantitativních výsledků a na základě údajů o populaci Axis-Shield jako reference* se doporučuje následující:

<u>(Průměrný) výsledek vzorku</u>	<u>Interpretace výsledku</u>
≤ 5 U/mL	Negativní
> 5 U/mL	Pozitivní

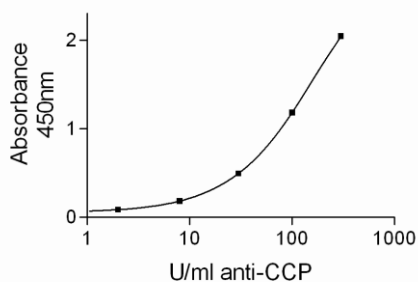
*Tento návrh je pouze vodítkem. Doporučuje se, aby uživatel vytvořil vlastní referenční rozmezí, které je unikátní pro populaci.

NB: Jako v kterémkoli testu s měřením protilátek, určuje tento test spíše aktivitu protilátky přítomné ve vzorku, než její koncentraci. Aktivita může být ovlivněna řadou parametrů, například aviditou protilátky.

Koncentrace kalibrátoru

Číslo kalibrátoru	Koncentrace U/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Typická kalibrační křivka



KONTROLA KVALITY

Zajistěte, aby se prováděla v souladu s pokyny výrobce adekvátní údržba a kalibrace snímače destičky a aby byla použita správná délka křivky.

Uživatelé musí zajistit plné obeznámení se s pokyny pro tento test, zejména s částmi Výstrahy a upozornění a Procedurální poznámky a zacházení se soupravou. Uživatelé musí před hlášením výsledků testu pacienta prokázat, že jsou schopni získat specifickou účinnost pro přesné a hlásitelné rozmezí výsledků testu, srovnatelné s údaji stanovenými výrobcem. Doporučuje se, aby předem naředěné pozitivní a negativní kontroly byly zpracovávány dvojmo s každým testem, aby se dala sledovat kvalita postupu. Referenční kontrolu spouštějte dvojmo s každým kvalitativním testem.

Za předpokladu, že jsou splněny všechny požadavky výrobce ohledně přesnosti, nesplnění specifikací rozmezí kontrol uvedených níže u jakékoli kontroly činí test neplatným a výsledky pacienta se nesmí hlásit. Operátor by měl po překontrolování postupu testování opakovat nebo kontaktovat distributora/výrobce. Jestliže test opakujete, připravte čerstvý roztok k ředění pro každou kontrolu a vzorek. Laboratoře mohou mít přání připojit vlastní kontroly ke každému testovacímu cyklu. Materiál pro kontroly uchovávejte při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší a zabraňte tomu, aby byl opakovaně zmrazován/rozmrazován. Konzervační látky, například azid sodný v koncentraci 0,1 % (w/v) neovlivní výsledky vzorku.

Hladiny analytů identifikované pro specifické nemoci byly stanoveny výrobcem pro zvlášť definované populace a nemusí nutně odrážet literaturu. Úrovně incidence, jejich vztah k specifickému onemocnění, referenční rozsahy a příslušné body cut-off se musí vypočítávat pro specifické populace, pro které uživatelé test provádějí.

Specifikace kontrolních poměrů

Protokol	Specifikace
Kvalitativní (poměry)	$\frac{\text{Absorbance pozitivní kontroly}}{\text{Absorbance referenční kontroly}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Absorbance negativní kontroly}}{\text{Absorbance referenční kontroly}} < 0,95$
Semikvantitativní	Viz etiketa lahvičky pozitivní kontroly k očekávanému rozmezí akceptace (U/mL)
	Koncentrace negativní kontroly $< 2\text{ U/mL}$

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Pomocí testu Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200) bylo testováno 200 vzorků séra od asymptomatických zdravých dárců ve věku 18–72 let, zhruba stejný počet mužů [n = 105] a žen [n = 95].

Nebyly pozorovány žádné rozdíly vyplývající z pohlaví nebo věku (výpočet prováděn porovnáním věkové kategorie ≤ 40 let [n = 115] a > 40 let [n = 85]).

Celková průměrná koncentrace anti-CCP u této populace byla $0,63 \pm 0,419\text{ U/ml}$ (rozmezí 0,05–3,8 U/ml).

Na základě těchto údajů referenční populace a údajů klinické populace je doporučena cut-off hodnota testu:

<i>Referenční rozmezí</i> $\leq 5\text{ U/mL} = \text{negativní}$ $> 5\text{ U/mL} = \text{pozitivní}$
--

Referenční rozmezí se uvádí pouze jako návod, každá laboratoř musí stanovit vlastní referenční rozmezí, které může být pro danou populaci unikátní, v závislosti na geografických, patientských, dietních, environmentálních faktorech nebo na klinické praxi. Revmatoidní artritida postihuje dvakrát častěji ženy než muže.

ÚDAJE O ÚČINNOSTI

Linearita ředění

Test Axis-Shield Anti-CCP je vytvořen tak, aby byl lineární ve všech rozmezích měření od LOD do 300 U/ml. Na základě studie provedené podle dokumentu EP6-A CLSI,²³ prokázal test Axis-Shield Anti-CCP linearitu od 1,04 U/ml do 300 U/ml.*

* Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit

Vzorky > 300 U/ml vykazují průměrnou výtěžnost $\leq 100 \% \pm 15 \%$ * očekávaného výsledku, pokud jsou naředěny v rozsahu testu a pomocí správného ředícího faktoru.

* Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit

Klinická senzitivita a specifická

Klinická senzitivita testu Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) byla stanovena pro 229 jedinců s potvrzenou RA a klinická specifická byla stanovena pro 285 vzorků, které nebyly od jedinců s RA (135 od pacientů s jinými revmatickými a nereumatickými onemocněními a 150 od asymptomatických zdravých jedinců). Při použití cut-off hodnoty 5 U/ml měla vypočtená senzitivita hodnotu 78 % se specifickou 99 %. Výsledky jsou sumarizovány v následujících tabulkách.*

Kategorie vzorků	Celkem n	Pozitivní n	Senzitivita v %
RA	229	179	78

Kategorie vzorků	Celkem n	Pozitivní n	Specifická v %
Vzorky bez RA celkem	285	4	98,6
Zdraví asymptomatictí jedinci bez RA	150	1	99,3
Vzorky nemocných jedinců bez RA ⁺	135	3	97,8

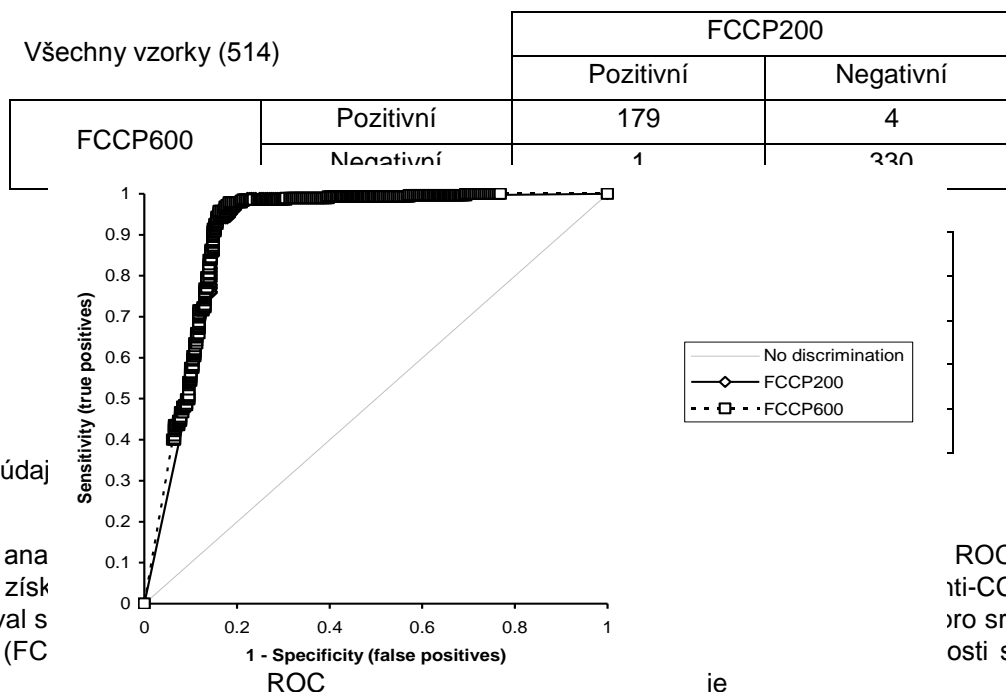
⁺ Klinickou specifickou 135 vzorků pacientů s jinými revmatickými a nereumatickými onemocněními podle kategorií znázorňuje následující tabulka.*

Vzorky jedinců s jinými (než RA) onemocněními	Celkem n	Pozitivní n	Klinická specifická
Celkem	135	3	97,8 %
zánětlivá polyartritida	41	1	97,6 %
EBV IgG pozitivní	18	1	94,4 %
tyroiditida Hashimotova typu	17	0	100 %
Sjögrenův syndrom	16	1	93,8 %
systémový lupus erythematos	16	0	100 %
vaskulitida	5	0	100 %
skleroderma	5	0	100 %
osteoartritida	4	0	100 %
Crohnova nemoc	3	0	100 %
Raynaudův fenomén	3	0	100 %
ulcerózní kolitida	2	0	100 %
psoriatická artritida	2	0	100 %
reaktivní artritida	1	0	100 %
ankylozující spondylitida a polymyositida	2	0	100 %

*Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

Porovnání metod

Test Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) je vytvořen tak, aby byl ve shodě $\geq 99 \%$ pro vzorky s RA a pro vzorky bez RA v porovnání s testem Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200). Vzorky s RA a vzorky bez RA popsány v části Klinická senzitivita a specifická byly použity pro porovnání testu Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) s testem Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200). Hodnota cut-off zjištěná u testu Axis-Shield Anti-CCP (FCCP200) byla 5 U/ml, jak bylo stanoveno v příbalové informaci k výrobku. Při použití hodnoty cut-off o velikosti 5 U/ml pro test Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) byla vypočtena shoda mající hodnotu 99 %. Výsledky jsou sumarizovány v následujících tabulkách.*



*Reprezentativní údaj

Byla provedena analýza uvedených údajů získána 0,910 (95% interval s Shield Anti-CCP (FC) analýzy níže.*

ROC) za použití výše uvedeného srovnávacího testu Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) byla provedena pro srovnávací test. Křivka srovnatelná. Křivka je zobrazena

*Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

Přesnost

Studie byla provedena podle dokumentu EP5-A2 CLSI (dříve NCCLS) EP5-A2.²⁴ Byly testovány dvě kontroly anti-CCP, šest členů panelu QC (kontrola kvality) a jeden vzorek humánního séra za použití dvou šarží činidel, dvojmo ve dvou různých denních dobách v období 20 dnů (n=80). Údaje z této studie jsou sumarizovány v následující tabulce (zaokrouhloeno na 1 desetinné místo):

Vzorek	Souprava Šarže	n	Průměr (U/ml)	Uvnitř cyklu		Mezi cykly		Mezi dny		Celkem	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Pozitivní kontrola	001	80	20,30	1,05	5,2	1,24	6,1	0,00	0,0	1,63	8,0
	003		20,62	0,43	2,1	1,20	5,8	0,00	0,0	1,27	6,2
QC 1	001	80	3,72	0,33	8,8	0,17	4,5	0,13	3,6	0,39	10,5
	003		3,92	0,23	5,8	0,35	8,9	0,04	1,1	0,42	10,7
QC 2	001	80	8,17	0,34	4,2	0,72	8,8	0,00	0,0	0,80	9,8
	003		8,47	0,30	3,6	0,70	8,3	0,25	2,9	0,80	9,5
QC 3	001	80	15,30	0,37	2,4	0,93	6,0	0,30	1,9	1,04	6,8
	003		15,98	0,36	2,2	0,92	5,8	0,00	0,0	0,99	6,2
QC 4	001	80	53,55	2,30	4,3	3,19	6,0	1,71	3,2	4,29	8,0
	003		55,49	2,36	4,2	3,35	6,0	0,00	0,0	4,09	7,4
QC 5	001	80	94,26	3,17	3,4	7,31	7,8	2,01	2,1	8,22	8,7
	003		97,15	2,61	2,7	5,56	5,7	4,79	4,9	7,79	8,0
QC 6	001	80	134,77	4,58	3,4	5,84	4,3	5,74	4,3	9,38	7,0
	003		142,41	5,69	4,0	9,02	6,3	0,00	0,0	10,67	7,5
Ref: kontrola	001	80	5,18	0,34	6,6	0,24	4,6	0,21	4,0	0,46	9,0
	003		5,09	0,26	5,1	0,21	4,1	0,21	4,2	0,39	7,7
Vzorek 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

* Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit

Limit detekce

Limit detekce (LOD) testu Axis-Shield Anti-CCP v souladu s dokumentem EP17-A CLSI (dříve NCCLS)²⁵ byl prokázán jako 1,04 U/ml*.

Stanovení hodnot LOD bylo provedeno použitím jednoho anti-CCP negativního vzorku (60 duplikátů) a šesti anti-CCP vzorků nízké úrovně (vždy 15 duplikátů).

*Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

Snížení signálu při měření (High Dose Hook)

High dose hook je jev, kdy může dojít k odečtu vzorků s velmi vysokou úrovní uvnitř dynamického rozsahu testu. U testu Axis-Shield Anti-CCP nebyl zjištěn efekt high dose hook, pokud byly testovány vzorky s obsahem přibližně 3 000 U/ml anti-CCP protilátky.*

*Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

Interference

Test Axis-Shield Anti-CCP byl vytvořen tak, aby maximální odchylka v koncentraci anti-CCP od následujících potencionálně interferujících sloučenin byla:

- $\pm 15\%$ pro koncentrace anti-CCP ≥ 10 U/ml
- $\pm 10\%$ pro koncentrace anti-CCP ≥ 4 U/ml až < 10 U/ml
- $< 0,75$ U/ml pro koncentrace anti-CCP < 4 U/ml

Pro test Axis-Shield Anti-CCP byla provedena studie podle dokumentu EP7-A2 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)²⁶. Šest vzorků s hladinami anti-CCP přes celé spektrum rozsahu testu bylo nahrazeno potencionálně interferujícími sloučeninami uvedenými v tabulce níže. Maximální odchylky koncentrace anti-CCP pozorované u vzorků v této studii byly v rozmezí od:

- -9,4 % do 3,3 % pro koncentrace anti-CCP ≥ 10 U/ml
- -7,3 % do 4,8 % pro koncentrace anti-CCP ≥ 4 U/ml do < 10 U/ml
- -0,6 U/ml do 0,05 U/ml pro koncentrace anti-CCP < 4 U/ml*

Potencionálně interferující látka	Nebyla prokázána interference až do následujících koncentrací
Hemoglobin	4 mg/ml
Bilirubin	0,2 mg/ml
Triglycerid (roztok Intralipid)	15 mg/ml
Revmatoidní faktor	200 IU/ml
Protein celkem (gama globuliny)	120 mg/ml

*Reprezentativní údaje; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

OMEZENÍ POUŽITÍ

1. Ačkoli přítomnost protilátek na CCP je spojována v revmatoidní artritidou, pozitivní výsledek sám o sobě nemůže představovat podklad pro diagnózu, údaje musí být posuzovány v kontextu dalších klinických a laboratorních nálezů.
2. Někteří jedinci mohou mít vysoké úrovně přítomnosti anti-CCP protilátek s malým nebo žádným průkazem klinického onemocnění. A naopak, někteří pacienti s aktivním onemocněním mohou mít nedetekovatelnou úroveň těchto protilátek. Klinická signifikance této informace je doposud nejasná.
3. Jelikož výsledek testu anti-CCP není diagnostickým důkazem výskytu nebo absence klinického onemocnění, léčbu nelze zahájit pouze na základě pozitivního výsledku anti-CCP.
4. Zahájení léčby nebo změny v léčbě musí být prováděny na základě klinických vyšetření a nikoli jenom na základě koncentrace autoprotilátek anti-CCP.
5. Klinická účinnost monitorování úrovní autoprotilátek CCP jako indikace progrese/remise revmatoidní artritidy nebyla dosud definována.
6. Hodnota anti-CCP v juvenilní artritidě nebyla určena.
7. Vzhledem k specifickým vlastnostem interakcí antigenu/protilátky se nestanovuje koncentrace protilátky, nýbrž aktivita. Jelikož sérum pacienta obsahuje heterogenní populace protilátek, mohou některé vzorky vykazovat nelinearit, obzvláště při vysokém naředění vzorku.

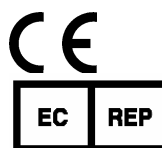
L I T E R A T U R A

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.

Tel: +44 (0) 1382 422000,
Fax: +44 (0) 1382 422088.
E-mail: shield@axis-shield.com
Web: www.axis-shield.com



EC Authorized Representative:

Medical Device Safety Service GmbH (MDSS)
Schiffgraben 41,
30175 Hannover,
Germany

Tel.: + (49) 511 6262 8630

Fax: + (49) 511 6262 8633

IVD*In vitro* diagnostický zdravotnický prostředek**REF**

Katalogové číslo

LOT

Šarže



96 testů



Upozornění



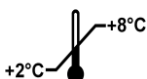
Seznamte se s pokyny k použití



Chraňte před světlem



Použít do



Uchovávejte při 2–8 °C

Rx Only

K použití pouze na lékařský předpis



Výrobce

CONTROL +

Pozitivní kontrola

CONTROL -

Negativní kontrola

CONJ

Konjugát

SUBS

Substrát

SOLN STOP

Zastavovací roztok

BUF WASH 10 X

Promývací pufr

MTP 8 x 12

Mikrotitrové (odlomitelné) stripy

SAMPLE DIL 5 X

Ředidlo pro vzorek

CAL 1

Kalibrátor 1

CAL 2 - CAL 6

Kalibrátor 2-6

CONTROL REF

Referenční kontrola