



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP600

Solo per uso professionale



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, Regno Unito.

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

E-mail: shield@axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

Il test anti-CCP di Axis-Shield è un dosaggio semi-quantitativo/qualitativo immunoenzimatico (ELISA) per determinare la classe IgG degli autoanticorpi specifici contro il peptide ciclico citrullinato (CCP) nel siero (comprese le provette con separatore di siero) o nel plasma (EDTA, litio-eparina o citrato di sodio) umano. La determinazione degli anticorpi anti-CCP è utilizzata per contribuire alla diagnosi di artrite reumatoide (AR), e dovrebbe essere impiegata unitamente ad altre informazioni cliniche. I livelli di autoanticorpi rappresentano solo uno dei parametri nel processo diagnostico basato su più criteri, comprendenti sia valutazioni cliniche che di laboratorio. Per uso diagnostico in vitro.

I N T R O D U Z I O N E

L'artrite reumatoide (AR) è una comune patologia sistemica autoimmune che colpisce lo 0,5-1,0% della popolazione adulta. L'AR è caratterizzata dall'infiammazione cronica della membrana sinoviale, che può portare alla progressiva distruzione dell'articolazione e, in molti casi, alla disabilità e alla riduzione della qualità della vita.¹ Generalmente si ritiene che l'intervento precoce sia fondamentale per prevenire il danno irreversibile a carico delle articolazioni, pertanto è importante diagnosticare l'AR prima possibile nel corso della malattia.^{2,3} La diagnosi di AR si basa fondamentalmente su caratteristiche cliniche, radiologiche e immunologiche. L'esame sierologico più frequente è la misurazione del fattore reumatoide (FR).⁴ Sebbene l'esame dell'FR possieda una buona sensibilità, non è specifico per l'AR, in quanto è spesso presente in soggetti sani e in pazienti con altre patologie reumatiche o infiammatorie, malattie autoimmuni o infezioni croniche.⁵

Parecchi anni si scoprì che gli anticorpi diretti contro il fattore perinucleare (APF) e l'antichieratina (AKA) sono altamente specifici per l'AR. In seguito è stato riportato che entrambi gli anticorpi reagiscono con la filaggrina nativa, per questo ora sono noti come anticorpi anti-filaggrina (AFA).^{6,7,8} Evidenze recenti hanno mostrato che tutti questi anticorpi sono diretti contro gli epitopi contenenti citrullina.⁹ La citrullina è un amminoacido non standard, in quanto non viene incorporato nelle proteine durante la sintesi proteica. Tuttavia, essa può essere prodotta tramite modificazione post-transizionale dei residui di arginina da parte dell'enzima peptidil-arginina deaminasi (PAD).¹⁰ Nel 1998, Schellekens et coll. hanno riportato che gli autoanticorpi reattivi con i peptidi sintetici lineari contenenti citrullina erano altamente specifici per l'AR in un dosaggio ELISA.¹¹ Studi successivi hanno dimostrato che le varianti cicliche di questi peptidi lineari, denominati peptidi citrullinati ciclici (CCP), erano altrettanto specifiche per l'AR, ma con una maggiore sensibilità rispetto ai peptidi lineari.¹² Nel tentativo di migliorare ulteriormente la sensibilità del test CCP, è stata esaminata con sieri AR un'intera libreria di peptidi contenenti citrullina ed è stata scoperta una nuova serie di peptidi (CCP2) in grado di offrire prestazioni superiori rispetto al test CCP1.¹³ Negli ultimi anni sono stati pubblicati molti rapporti che confermano la valenza diagnostica del test CCP2.¹⁴ Gli anticorpi anti-CCP, spesso detti anticorpi antipeptidi citrullinati (ACPA), sono risultati presenti in uno stadio molto precoce della malattia, spesso in assenza di sintomi clinici, e molti studi indicano che elevati livelli di anti-CCP possono essere indicativi dello sviluppo di malattie erosive.^{15,16,17,18,19,20} Questi risultati suggeriscono un ruolo importante dei peptidi ciclici citrullinati nella diagnosi di AR in uno stadio precoce della malattia.







Nel 2010 sono stati pubblicati i *Criteri ACR / EULAR di Classificazione dell'Artrite Reumatoide*, che hanno sostituito i "vecchi" criteri ACR del 1987 ampiamente ritenuti inadeguati alla diagnosi precoce dell'AR. I nuovi criteri di classificazione, pubblicati congiuntamente dall'American College of Rheumatology (ACR) e dall'European League Against Rheumatism (EULAR), raccomandano un sistema di scoring da 0 a 10. I nuovi criteri di classificazione vanno applicati ad ogni soggetto che presenti una sinovite definitiva (artrite infiammatoria indifferenziata). Gli altri quattro criteri sono: numero di articolazioni interessate, anormalità sierologica, aumento degli indici di fase acuta e durata dei sintomi nelle articolazioni interessate. Per la prima volta i criteri sierologici comprendono la misurazione degli ACPA, come gli anti-CCP, e la definizione di una debole e di una forte positività del risultato sierologico.²¹

Il dosaggio Anti-CCP di Axis-Shield è un test ELISA basato sulla rilevazione di autoanticorpi nel siero o nel plasma umano diretti contro un peptide sintetico ciclico contenente residui di arginina modificata (peptidi CCP2). Il test rappresenta un ulteriore strumento nella diagnosi di pazienti con AR.

P R I N C I P I O D E L D O S A G G I O

I pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con un peptide citrullinato ciclico sintetico altamente purificato, contenente residui di arginina modificata. Durante la prima incubazione, gli autoanticorpi specifici nel siero o plasma diluito si legano alla superficie rivestita con antigene. I pozzetti vengono quindi lavati per eliminare i componenti non legati. Nella seconda incubazione, il coniugato, un anticorpo policlonale marcato con un enzima verso l'IgG umano, si lega a qualsiasi autoanticorpo legato alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, gli autoanticorpi specifici vengono tracciati per incubazione con il substrato. L'aggiunta di soluzione di arresto pone fine alla reazione, dando luogo ad un prodotto finale colorato; la quantità di coniugato legato viene misurata in unità di assorbanza. Nel protocollo qualitativo, la quantità di coniugato legato dal campione viene confrontata con quella legata dal controllo di riferimento. Nel protocollo semi-quantitativo, la concentrazione degli autoanticorpi anti-CCP può essere valutata per interpolazione da una curva dose-risposta basata sui calibratori.

COMPONENTI DEL KIT

CONJ	1 x 15,0 mL	Anticorpo policlonale di capra marcato con perossidasi del rafano anti-IgG umano, 0,1% (p/vol) acido p-idrossifenilacetico, 0,15% (p/vol) proclina e 1% stabilizzante delle proteine (bovino) (p/vol) in un tampone HEPES. Pronto per l'uso. N.B. ATTENZIONE.	
SUBS	1 x 15,0 mL	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce. N.B. ATTENZIONE.	 
SOLN STOP	1 x 15,0 mL	Acido solforico 0,25 mol/L soluzione acquosa Pronto per l'uso. N.B. PERICOLO.	
BUF WASH 10 X	3 x 25,0 mL	Tampone fosfato salino, 1,3% (v/v) Tween 20 Diluire prima dell'uso.	
MTP 8 x 12	8 strip di microtitolazione x 12 pozzetti (separate)	Rivestite con peptide citrullinato ciclico sintetico, in busta di alluminio risigillabile con essiccante.	
SAMPLE DIL 5 X	1 x 25,0 mL	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine (bovino), 0,5% (p/vol) sodio azide. Diluire prima dell'uso. N.B. PERICOLO.	 
CAL 1	1 x 1,0 mL	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine (bovino), < 0,1% (p/vol) sodio azide. 0 U/mL. Pronto per l'uso.	
CAL 2 - CAL 6	5 x 1,0 mL	Plasma umano, tampone fosfato, stabilizzante delle proteine (bovino), < 0,1% (p/vol) sodio azide. 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Pronto per l'uso.	
CONTROL REF	1 x 1,5 mL	Plasma umano, tampone, < 0,1% (p/vol) sodio azide. Pronto per l'uso.	
CONTROL +	1 x 0,3 mL	Plasma umano, < 0,1% (p/vol) sodio azide. Diluire 1:100 con diluente per campioni diluito prima dell'uso, come per i campioni.	
CONTROL -	1 x 0,3 mL		

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Stabilità del kit aperto

Un kit è stato aperto e riutilizzato in tre occasioni in periodo di tempo di tre mesi senza alcun effetto negativo sulle prestazioni. Dopo l'uso, i componenti devono essere nuovamente conservati a 2-8°C.

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit ad una temperatura di 2-8°C ed utilizzarli entro la data di scadenza indicata sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.
2. Non mescolare numeri di lotto diversi.
3. Non congelare i kit.
4. Il tampone di lavaggio concentrato, il diluente per campioni concentrato e i controlli positivo e negativo devono essere diluiti prima dell'uso. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Evitare la contaminazione microbica del tampone di lavaggio diluito e del diluente per campioni diluito e riportare a 2-8°C dopo aver eseguito il test.
6. Riporre le strip di microtitolazione in eccesso (inutilizzate) nella busta di alluminio con l'essiccante. Controllare che la sigillatura sia completa e riportare a 2-8°C, fino al nuovo utilizzo.
7. Conservare il substrato al riparo dalla luce.
8. Evitare la contaminazione dei reagenti. Utilizzare un nuovo puntale monouso del pipettatore per ogni reagente o manipolazione di campione.

Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere incolore oppure presentare una colorazione che arriva fino all'azzurro molto pallido. La presenza di torbidità o precipitazione in qualsiasi componente indica deterioramento, quindi il componente deve essere scartato.

Se nel diluente per campioni o lavaggio sono visibili dei cristalli al momento del prelievo dal luogo di conservazione (al freddo), questi scompariranno capovolgendo il diluente e riportandolo a temperatura ambiente.

Prelievo e conservazione dei campioni


Il dosaggio è raccomandato per campioni sierici (compresa provetta con separatore di siero SST) o di plasma umano (EDTA, litio-eparina o citrato di sodio). Non sono stati testati altri tipi di provetta per l'uso nel dosaggio. Non utilizzare campioni emolizzati grossolanamente o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del dosaggio ed evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelamento. Non inattivare i campioni con il calore; questa procedura può produrre falsi risultati positivi.

Per la preparazione per l'analisi seguire le istruzioni del produttore per le provette di prelievo. I campioni possono essere conservati non diluiti a 2-8°C per quattro settimane; per periodi più lunghi la temperatura deve essere di -20°C o inferiore. I campioni diluiti a 1:100 nel diluente per campioni diluito devono essere utilizzati entro 24 ore dalla diluizione.






AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.

Precauzioni di sicurezza

1. Attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite nel presente foglietto illustrativo, soprattutto relativamente alle condizioni di manipolazione e conservazione.
2.  I calibratori e i controlli contengono plasma umano testato con dosaggi approvati dalla FDA e trovato non reattivo/negativo per HBsAg, HIV-1 RNA o HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 e anti-HCV o HCV RNA. Dato che nessun test garantisce totalmente l'assenza di agenti infettivi, i calibratori e i controlli devono essere considerati potenzialmente infetti e pertanto manipolati con le stesse precauzioni utilizzate per qualsiasi altro materiale potenzialmente biopercoroso. Le linee guida approvate del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) "Protezione degli operatori di laboratorio dalle infezioni contratte sul lavoro" (M29-A3 – terza edizione),²² descrivono come manipolare questi materiali in conformità con la Buona Pratica di Laboratorio.
3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree in cui si manipolano kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente eventuali affezioni cutanee, tagli, abrasioni e altre lesioni della pelle.
6. I calibratori, i controlli e il diluente per campioni concentrato contengono sodio azide, che può reagire con le tubature in piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Per lo smaltimento, far defluire i materiali con abbondante acqua per impedire la formazione di azidi.
7. Le schede tecniche di sicurezza dei materiali per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit possono essere richieste ad Axis-Shield Diagnostics.

Attenzione: La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico.

 <p>Attenzione</p> <p>Coniugato</p>	<p>Attenzione H317 –</p> <p>Prevenzione P272 – P280 – P363 –</p>	<p>Può provocare una reazione allergica cutanea.</p> <p>Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.</p> <p>Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p> <p>Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.</p>
 <p>Attenzione</p> <p>Substrato</p>	<p>Attenzione H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 –</p> <p>Prevenzione P260 – P280 –</p> <p>Risposta P301+310 – P304+340 – P305+351+338 –</p>	<p>Nocivo se ingerito.</p> <p>Nocivo per contatto con la pelle.</p> <p>Provoca irritazione cutanea.</p> <p>Provoca grave irritazione oculare.</p> <p>Nocivo se inalato.</p> <p>Può irritare le vie respiratorie.</p> <p>Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.</p> <p>Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p> <p>IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.</p> <p>IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.</p> <p>IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.</p>
  <p>Pericolo</p> <p>Diluyente per campioni</p>	<p>Attenzione H302 – H318 – H412 – EUH032 –</p> <p>Prevenzione P264 – P280 –</p> <p>Risposta P301+310 – P305+351+338 – P330 –</p>	<p>Nocivo se ingerito.</p> <p>Provoca gravi lesioni oculari.</p> <p>Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.</p> <p>A contatto con acidi libera gas molto tossici.</p> <p>Lavare accuratamente braccia dopo l'uso.</p> <p>Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p> <p>IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.</p> <p>IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Sciacquare la bocca.</p>
 <p>Pericolo</p> <p>Soluzione di arresto</p>	<p>Attenzione H314 –</p> <p>Prevenzione P260 – P273 – P280 –</p> <p>Risposta P301+330+331 – P303+361+353 – P304+340 – P305+351+338 –</p>	<p>Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.</p> <p>Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.</p> <p>Non disperdere nell'ambiente.</p> <p>Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p> <p>IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.</p> <p>IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.</p> <p>IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.</p> <p>IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.</p>

PREPARAZIONE

Materiali/Attrezzature richieste ma non fornite

1. Lettore di micropiastre/strip da 96 pozzetti con filtro 450 nm.
2. Pipette di precisione per dispensare 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipetta automatica per dispensare 100 µL. Pipetta automatica per dispensare 300 µL per il lavaggio manuale; lavatore automatico per micropiastre opzionale.
3. Cilindri graduati in vetro/plastica: 1x100 mL, 1x500 mL.

4. Contenitori da 1 mL.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette di carta.
7. Timer per intervalli da 30 e 60 minuti.

Preparazione per il dosaggio

Prima dell'uso portare tutti i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, a 18-25°C nel giro 30-60 minuti. Miscelare i reagenti capovolgendoli delicatamente.

Non diluire il controllo di riferimento.

Diluire i reagenti seguenti e miscelare accuratamente.

Reagente	Quantità	Aggiungere
Tampone lavaggio concentrato	1 flaconcino	225 mL di acqua distillata/deionizzata
Diluente per campioni concentrato	1 flaconcino	100 mL di acqua distillata/deionizzata
Controlli positivo e negativo/campioni	10 µL	1 mL di diluente per campioni diluito

Calcolare il numero di strip di microtitolazione necessarie per il dosaggio da effettuare e assicurarle nel supporto strip di microtitolazione. Riporre le strip restanti nella busta di alluminio risigillabile con l'essiccante e conservare a 2-8°C fino al nuovo utilizzo. Assicurarsi che tutte le strip siano saldamente trattenute nell'apposito supporto. Se lo desiderano, gli operatori possono numerare ciascuna strip sul bordo superiore per facilitarne l'identificazione. Conservare il supporto delle strip di microtitolazione per gli usi successivi.

PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Protocollo qualitativo: dosaggio controllo di riferimento, controlli positivo e negativo e campioni.

Protocollo semi-quantitativo: dosaggio calibratori (1-6), controlli positivo e negativo, e campioni.

1. Stabilire il riferimento dei pozzetti per l'identificazione.
2. Pipettare 100 µL di controllo di riferimento/calibratori in duplicato e i controlli positivo e negativo prediluiti (1:100) nei relativi pozzetti. Pipettare 100 µL di campioni paziente prediluiti (1:100) in singolo o in duplicato nei relativi pozzetti. Si raccomanda di analizzare i campioni in duplicato, ma la procedura è opzionale in base al rispettivo protocollo di laboratorio. Questa fase non deve superare i **10 minuti** per ciascun set di calibratori/controlli/campioni.
3. Incubare per 60 ± 10 minuti a 18-25°C.
4. Decantare il contenuto delle strip capovolgendole rapidamente su un lavabo idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il rischio potenziale di infezione dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta.
5. Lavare i pozzetti **quattro volte** con almeno 300 µL di tampone di lavaggio diluito. **Decantare e asciugare dopo ciascuna fase di lavaggio.**
6. Aggiungere 100 µL di coniugato a ciascun pozzetto.
7. Incubare per 30 ± 5 minuti a 18-25°C.
8. Ripetere le fasi 4 e 5.
9. Aggiungere 100 µL di substrato a ciascun pozzetto.
10. Incubare per 30 ± 5 minuti a 18-25°C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100 µL di soluzione di arresto a ciascun pozzetto, nello stesso ordine e con gli stessi tempi di aggiunta del substrato. Picchiare leggermente sui pozzetti per miscelare ed assicurarsi che non vi siano bolle visibili.
12. Leggere le strip a 450 nm.
13. Leggere il dosaggio entro 60 minuti dalla fine del test.

CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per il calcolo e l'interpretazione dei risultati considerare ciascun dosaggio separatamente.

Protocollo Qualitativo

Calcolare il rapporto tra valore medio di assorbanza (densità ottica) dei controlli positivo e negativo e di ciascun campione (medio) e il valore medio di assorbanza dei controlli di riferimento:

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{Valore medio di assorbanza controlli}}{\text{Valore medio di assorbanza controlli di riferimento}}$$

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{Valore (medio) di assorbanza campioni}}{\text{Valore (medio) di assorbanza controlli di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare un cut-off tra campioni positivi e negativi, che sia specifico per la loro popolazione di pazienti. I risultati della popolazione di pazienti impiegata per la sperimentazione clinica Axis-Shield suggeriscono il cut-off seguente:

Rapporto di assorbanza

< 0,95

≥ 0,95 - ≤ 1,0

> 1,0

Interpretazione dei risultati

Negativo

Borderline - si consiglia di ripetere il test

Positivo

Protocollo Semi-quantitativo

Riportare l'assorbanza (media) di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione calibratore log₁₀ (v. tabella seguente) su carta millimetrata. Leggere quindi le concentrazioni medie dei controlli positivi e negativi e dei campioni (medi) sulla curva di calibrazione. Una curva di calibrazione tipica è riportata di seguito come esempio e non deve essere quindi utilizzata per interpretare i risultati. È possibile anche adottare un sistema di fitting a 4 parametri (4PL) e il cubic spline. Si consiglia di non utilizzare altri sistemi.

I campioni con assorbanza superiore al calibratore 6 (300 U/mL) non rientrano nel range di dosaggio, e devono essere riportati come > 300 U/mL, diluiti e ridosati, correggendo per questo ulteriore fattore di diluizione.

Per l'interpretazione dei risultati Semi-quantitativi e sulla base dei dati della popolazione di riferimento* Axis-Shield, si suggerisce quanto segue:

Risultato Campioni (Medi)

≤ 5 U/mL

> 5 U/mL

Interpretazione del Risultato

Negativo

Positivo

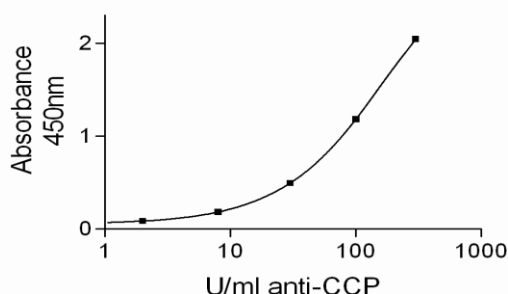
* Quanto sopra rappresenta una semplice linea guida. Si raccomanda che gli utilizzatori stabiliscano un range di riferimento specifico della popolazione.

NB: Come in tutte le misurazioni di anticorpi, questo dosaggio determina l'attività dell'anticorpo presente nel campione piuttosto che la concentrazione. L'attività può essere influenzata da vari parametri, come ad esempio l'avidità degli anticorpi.

Concentrazioni dei calibratori

Numero calibratore	Concentrazion e U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Curva di calibrazione tipica



CONTROLLO DELLA QUALITA'

Assicurarsi che la manutenzione e la taratura del lettore di micropiastre siano state eseguite conformemente alle istruzioni del produttore e che venga utilizzata la lunghezza d'onda corretta.

Gli operatori devono avere una conoscenza completa e approfondita delle istruzioni del dosaggio, in particolare della sezione Avvertenze e Precauzioni e delle Note sulla Manipolazione e sulla Procedura. Gli operatori devono inoltre dimostrare, prima di riferire i risultati dei test del paziente, di essere in grado di ottenere prestazioni di precisione e di range riportabile dei risultati paragonabili a quelle stabilite dal produttore. Si consiglia di testare i controlli negativo e positivo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi per controllare la qualità della procedura del test. Testare il controllo di riferimento pronto per l'uso in duplicato in tutti i dosaggi qualitativi.

Presumendo che le specifiche di precisione descritte dal produttore vengano rispettate, se un controllo non soddisfa le specifiche del rapporto di controllo sotto riportate il dosaggio non è valido e i risultati del paziente non devono essere riportati. Una volta rivista la procedura, l'operatore può ripetere il dosaggio o contattare il distributore/produttore. Se si ripete il dosaggio, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. I laboratori possono decidere di includere dei controlli interni in ciascuna sessione di dosaggio. Conservare il materiale di controllo ad una temperatura pari o inferiore a 20°C ed evitare ripetuti congelamenti/scongelamenti. I conservanti, come il sodio azide allo 0,1% (p/v), non influenzano i risultati dei campioni.

I livelli degli analiti identificati in particolari patologie sono quelli stabiliti dal produttore per popolazioni specifiche, e possono non riflettere necessariamente la letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, i range di riferimento e i corretti punti di cut-off devono essere calcolati per le popolazioni specifiche di cui si occupano gli operatori.

Specifiche del rapporto di controllo

Protocollo	Specifiche
Qualitativo (rapporti)	$\frac{\text{Assorbanza controllo positivo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Assorbanza controllo negativo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}} < 0,95$
Semi-quantitativo	Vedere controllo positivo tramite etichetta per range di accettazione previsto (U/mL)
	Concentrazione controllo negativo < 2 U/mL

VALORI ATTESI

200 campioni sierici da donatori asintomatici apparentemente sani, di età compresa tra 18 e 72 anni, comprendenti un numero di maschi [n = 105] e femmine [n = 95] pressoché uguale, sono stati sottoposti a test con un dosaggio Anti-CCP di Axis-Shield (FCCP200).

Non sono state osservate differenze attribuibili al sesso o all'età (calcolate confrontando i range di età di ≤ 40 anni [n = 115] e > 40 anni [n = 85]).

La concentrazione media totale di anti-CCP per questa popolazione è risultata di $0,63 \pm 0,419$ U/mL (range 0,05-3,8 U/mL).

Sulla base di questi dati della popolazione di riferimento e di quelli di una popolazione clinica, il cut-off di dosaggio consigliato è:

<p><i>Range di riferimento</i> ≤ 5 U/mL = Negativo > 5 U/mL = Positivo</p>
--

Si consiglia questo range di riferimento solo come indicazione di massima e ciascun laboratorio dovrà stabilire un range di riferimento specifico per la popolazione che prende in esame, a seconda del fattore geografico, dietologico, ambientale o della pratica clinica. Si ricorda che la prevalenza dell'Artrite Reumatoide nelle femmine è doppia rispetto ai maschi.

DATI DI PRESTAZIONE

Linearità di diluizione

Il dosaggio Anti-CCP di Axis-Shield è stato sviluppato per essere lineare nell'intervallo di misurazione da LOD a 300 U/mL.

Basato su uno studio condotto secondo le linee guida del documento CLSI EP6-A,²³ il dosaggio Anti-CCP di Axis-Shield ha dimostrato linearità da 1,04 U/mL a 300 U/mL.*

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

I campioni > 300 U/mL presentano un recupero medio del $\leq 100\% \pm 15\%$ * del risultato atteso in caso di diluizione nel range di dosaggio e di utilizzo del fattore di diluizione corretto.

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Sensibilità e specificità clinica

È stata determinata la sensibilità clinica del dosaggio Anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) in 229 soggetti con diagnosi confermata di AR e la specificità clinica in 285 campioni di soggetti non affetti da AR (135 di pazienti con altre malattie reumatiche e non reumatiche e 150 di soggetti asintomatici apparentemente sani). Adottando un cut-off di 5,0 U/mL, la sensibilità è risultata del 78% con una specificità del 99%. I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.*

Categoria di campioni	Totale n	Positivo n	% sensibilità
AR	229	179	78

Categoria di campioni	Totale n	Positivo n	% specificità
Campioni di non AR in totale	285	4	98,6
Campioni di non AR sani asintomatici	150	1	99,3
Campioni di patologie non AR *	135	3	97,8

* La specificità clinica di 135 campioni di pazienti con altre patologie reumatiche o non reumatiche è classificata nella tabella seguente.*

Campioni di Patologie non AR	Totale n	Positivi n	Specificità clinica
Totale	135	3	97,8%
Poliartrite infiammatoria	41	1	97,6%
Positività EBV IgG	18	1	94,4%
Tiroidite di Hashimoto	17	0	100%
Sindrome di Sjörgen	16	1	93,8%
Lupus Eritematoso Sistemico	16	0	100%
Vasculite	5	0	100%
Sclerodermia	5	0	100%
Osteoartrite	4	0	100%
Morbo di Crohn	3	0	100%
Fenomeno di Raynaud	3	0	100%
Colite ulcerosa	2	0	100%
Artrite psoriasica	2	0	100%
Artrite reattiva	1	0	100%
Spondilite anchilosante e polimiosite	2	0	100%

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Metodo di comparazione

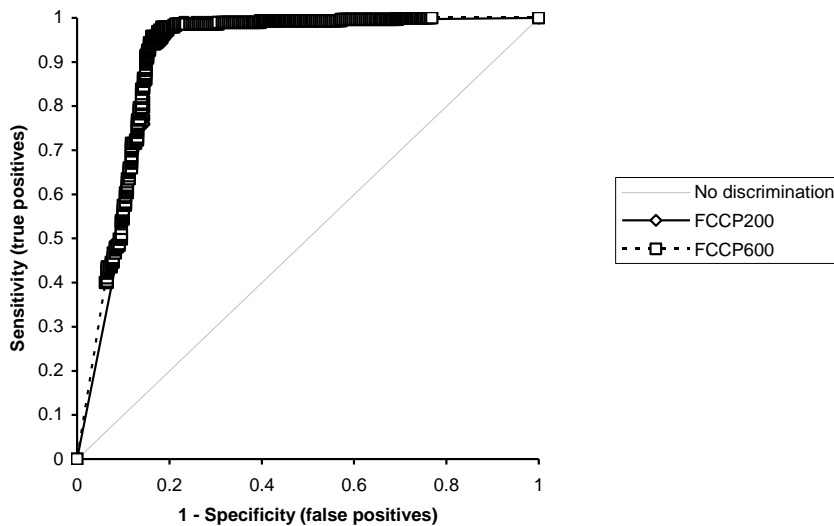
Il dosaggio Anti-CCP di Axis-Shield (FCCP600) è concepito per avere una concordanza del $\geq 99\%$ dei campioni AR e non AR quando questi sono comparati con il dosaggio comparatore anti-CCP di Axis-Shield (FCCP200). I campioni AR e non AR descritti nella sezione Sensibilità e Specificità Clinica sono stati utilizzati per confrontare il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield (FCCP600) e il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield (FCCP200). Il cut-off adottato per il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield (FCCP200) era 5,0 U/mL, come indicato nel foglietto illustrativo del produttore. Impiegando un cut-off di 5,0 U/mL per il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield (FCCP600), è stata calcolata una concordanza del 99%. I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.*

Tutti i campioni (514)		FCCP200	
		Positivo	Negativo
FCCP600	Positivo	179	4
	Negativo	1	330

Metodo di comparazione	FCCP600 vs FCCP200
Numero di campioni	65
Pendenza della linea di regressione	0,910
Intercetta Y	1,226
Coefficiente di correlazione	0,94

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

È stata effettuata un'analisi ROC utilizzando i dati sopra indicati ottenuti dai due dosaggi. L'area sottesa dalla curva (AUC) per il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield (FCCP600) era 0,910 (95% intervallo di confidenza: 0,881-0,940) e 0,903 (95% intervallo di confidenza: 0,871-0,934) per il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield del comparatore (FCCP200), indicando così che entrambi i dosaggi sono paragonabili tenendo conto della loro differenziazione clinica. La curva d'analisi ROC è riportata di seguito.*



* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Precisione

È stato effettuato uno studio secondo le linee guida del documento CLSI (formalmente NCCLS) EP5-A2.²⁴ Due controlli anti-CCP, sei pannelli QC e un campione di siero umano sono stati analizzati usando due lotti di reagenti, in due replicati e in due diverse determinazioni al giorno per 20 giorni (n=80). I dati di questo studio sono sintetizzati nella tabella seguente come dati rappresentativi (*arrotondati a 1 decimale*):

Campione	Kit Lotto	n	Media (U/mL)	Nella sessione		Tra sessioni		Tra giorni		Totale	
				DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
Controllo positivo	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
Rif Controllo	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
Campione 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

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (LOD) del dosaggio anti-CCP di Axis-Shield secondo il documento CLSI (formalmente NCCLS) EP17-A²⁵ è risultato pari a 1,04 U/mL*.

Le determinazioni del LOD sono state effettuate utilizzando un campione anti-CCP negativo (60 replicati) e sei campioni con bassi livelli di anti-CCP (15 replicati ciascuno).

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Effetto gancio ad alte dosi

L'effetto gancio ad alte dosi è un fenomeno per effetto del quale campioni con livelli molto elevati possono rientrare nel range dinamico del dosaggio. Per il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield, non è stato osservato alcun effetto gancio analizzando un campione contenente circa 3000 U/mL di anticorpi anti-CCP.*

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

Interferenza

Il dosaggio anti-CCP di Axis-Shield è concepito in modo da subire uno scostamento massimo della concentrazione di anti-CCP da parte dei seguenti composti potenzialmente interferenti entro:

- $\pm 15\%$ per concentrazioni di anti-CCP $\geq 10,0$ U/mL
- $\pm 10\%$ per concentrazioni di anti-CCP $\geq 4,0$ U/mL - $< 10,0$ U/mL
- $< 0,75$ U/mL per concentrazioni di anti-CCP $< 4,0$ U/mL

È stato condotto uno studio basato sulle linee guida del documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2²⁶ per il dosaggio anti-CCP Axis-Shield. A sei campioni con livelli di anti-CCP su tutto l'intervallo di dosaggio sono stati aggiunti i composti potenzialmente interferenti elencati nella tabella sotto riportata. La deviazione massima di concentrazione di anti-CCP osservata nei campioni nel corso di questi studi è stata la seguente:

- $-9,4\%$ - $3,3\%$ per concentrazioni di anti-CCP $\geq 10,0$ U/mL
- $-7,3\%$ - $4,8\%$ per concentrazioni di anti-CCP $\geq 4,0$ U/mL - $< 10,0$ U/mL
- $-0,6$ U/mL - $0,05$ U/mL per concentrazioni di anti-CCP $< 4,0$ U/mL*

Sostanza potenzialmente interferente	Nessuna interferenza riscontrata fino alla concentrazione seguente
Emoglobina	4 mg/mL
Bilirubina	0,2 mg/mL
Trigliceridi (soluzione intralipidi)	15 mg/mL
Fattore Reumatoide	200 IU/mL
Proteina totale (gammaglobuline)	120 mg/mL

* Dati rappresentativi; i risultati dei singoli laboratori possono differire.

LIMITAZIONI D'USO

1. Sebbene la presenza di anticorpi anti CCP sia associata all'Artrite Reumatoide, un risultato positivo non è diagnostico in sé; i dati devono essere considerati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. Alcuni soggetti possono presentare livelli elevati di anticorpi anti-CCP con scarsa o nessuna evidenza di patologia clinica. Al contrario, alcuni pazienti con patologia attiva possono presentare livelli non rilevabili di questi anticorpi. Il significato clinico di queste informazioni non è attualmente chiaro.
3. Dato che l'esito di un dosaggio di anti-CCP non costituisce una prova diagnostica della presenza o assenza di una patologia clinica, la terapia non dovrà iniziare sulla sola base di un risultato anti-CCP positivo.
4. L'introduzione o le eventuali variazioni della terapia non dovranno dipendere dalle variazioni della concentrazione di autoanticorpi anti-CCP, bensì dall'osservazione clinica.
5. Non è stata definita l'efficacia clinica del monitoraggio dei livelli di autoanticorpi CCP quale indicazione della progressione/remissione dell'Artrite Reumatoide.
6. Il valore degli anti-CCP nell'Artrite Giovanile non è stato determinato.
7. Date le caratteristiche specifiche delle interazioni di antigeni/anticorpi, non è la concentrazione di anticorpo ad essere determinata, ma l'attività. Poiché i sieri dei pazienti contengono popolazioni di anticorpi eterogenee, alcuni campioni possono presentare una non-linearità, soprattutto a diluizioni del campione molto elevate.

BIBLIOGRAFIA

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

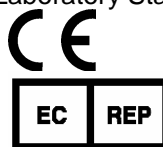
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, UK.

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

IVDDispositivo medico diagnostico *in vitro***REF**

Rif. catalogo

LOT

Lotto



96 test



Attenzione



Leggere le istruzioni per l'uso



Tenere al riparo dalla luce



Da utilizzare entro



Conservare a 2-8°C

Rx Only

Uso solo dietro prescrizione medica



Prodotto da

CONTROL +

Controllo positivo

CONTROL -

Controllo negativo

CONJ

Coniugato

SUBS

Substrato

SOLN STOP

Soluzione di arresto

BUF WASH 10 X

Tampone di lavaggio

MTP 8 x 12

Strip di microtitolazione (separate)

SAMPLE DIL 5 X

Diluyente per campioni

CAL 1

Calibratore 1

CAL 2 - CAL 6

Calibratore 2-6

CONTROL REF

Controllo di riferimento