



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

**Anti-CCP**

**IVD**



**REF FCCP600**

**Kun til profesjonell bruk**



**Axis-Shield Diagnostics Limited**

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, Storbritannia.

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

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

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

Axis-Shield Anti-CCP-test er en semi-kvantitativ/kvalitativ enzymkoblet immunosorbent assay (ELISA) for oppdagelse av IgG-klassen av autoantistoffer som er spesifikk for syklisk citrullinert peptid (CCP) i menneskelig serum (herunder serumseparator-prøverør) eller plasma (EDTA, litiumheparin, eller natriumsitrat). Oppdagelsen av anti-CCP-antistoffer brukes som hjelp til diagnosen av reumatoid artritt (RA) og skal brukes i kombinasjon med annen klinisk informasjon. Autoantistoffnivåene representerer en parameter i en multikriterie-diagnoseprosess som inkluderer både kliniske og laboratoriebaserte analyser. For in vitro diagnostikk.

## INNFORING

Reumatoid artritt (RA) er en vanlig, systemisk autoimmunsykdom som rammer 0,5-1,0 % av den voksne befolkningsgruppen. RA er karakterisert ved kronisk inflammasjon av leddhinnen, hvilket kan føre til progressiv nedbrytning av leddet og i mange tilfeller føre til invaliditet og redusert livskvalitet.<sup>1</sup> Det er allment anerkjent at tidlig inngripen er vitalt for å forhindre irreversibel leddskade, og derfor er det viktig å diagnostisere RA så tidlig i sykdomsforløpet som mulig.<sup>2,3</sup> Diagnosen av RA er i første rekke basert på kliniske, radiologiske og immunologiske egenskaper. Den mest brukte serologiske testen er måling av reumatoid faktor (RF).<sup>4</sup> Selv om RF-testen har en god sensitivitet, er den ikke spesifikk for RA, fordi den ofte vil være tilstede hos friske individer og hos pasienter med annen reumatisk eller inflammatorisk sykdom, autoimmun sykdom eller kroniske infeksjoner.<sup>5</sup>

I flere år har det vært anerkjent at antistoffer til anti-perinukleær faktor (APF) og keratin (AKA) er svært spesifikke for RA. Senere er det rapportert at begge disse antistoffene har reagert med medfødt filaggrin og nå henvises til som anti-filaggrin-antistoffer (AFA).<sup>6,7,8</sup> Nylige bevis har vist at disse antistoffene er rettet mot citrullin som inneholder epitoper.<sup>9</sup> Citrullin er en ikke-standard aminosyre, ettersom det ikke er innlemmet i proteiner under proteinsyntese. Det kan imidlertid genereres via post-transisjonell modifikasjon av argininrester gjennom enzymet peptidyl-arginin-deiminase (PAD).<sup>10</sup> I 1998 rapporterte Schellekens og kolleger at autoantistoffer som var reaktive med lineære syntetiske peptider som inneholdt citrullin, i høy grad var spesifikke for RA i en ELISA-basert analyse.<sup>11</sup> Senere studier har vist at sykliske varianter av disse lineære peptidene, kalt citrullinerte peptider (CCP) var like spesifikke for RA, men med høyere sensitivitet enn de lineære peptidene.<sup>12</sup> I et forsøk på å forbedre sensitiviteten til CCP-testen ytterligere, ble en dedisert samling av peptider som inneholdt citrullin screenet med RA-sera, og et nytt sett av peptider (CCP2) ble oppdaget, og dette gav en overlegen ytelse sammenlignet med CCP1-testen.<sup>13</sup> I løpet av de senere år har mange publiserte rapporter bekreftet den diagnostiske ytelsen til CCP2-testen.<sup>14</sup> Anti-CCP-antistoffer, som også ofte kalles anti-citrullinerte protein-/peptid-antistoffer (ACPA'er), er funnet å være til stede svært tidlig i sykdommen, ofte mens kliniske symptomer mangler, og mange rapporter indikerer at de høynede nivåene av anti-CCP-antistoffer kan forutsi utviklingen av en eroderende sykdom.<sup>15,16,17,18,19,20</sup> Disse funnene antyder at syklisk citrullinerte peptider spiller en viktig rolle i diagnosen av RA i en tidlig fase av sykdomsforløpet.







I 2010 ble *ACR / EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria* publisert og erstattet de "gamle" ACR-kriteriene fra 1987, som i stor utstrekning ble ansett for ikke å være egnet for tidlig diagnose av RA. De reviderte klassifiseringskriteriene, som ble publisert i fellesskap av American College of Rheumatology (ACR) og European League Against Rheumatism (EULAR), anbefaler et poengsystem mellom 0 og 10. De nye klassifiseringskriteriene skal brukes hos alle personer med definitivt synovitt (udifferensiert inflammatorisk artritt). De fire tilleggskriteriene var antall involverte ledd, serologisk unormalitet, akutt faserespons og symptomenes varighet i de involverte leddene. For første gang inkluderte de serologiske kriteriene måling av ACPA'er, f.eks. anti-CCP, og en viss definisjon av et lav positivt og høyt positivt serologisk resultat.<sup>21</sup>

Axis-Shield Anti-CCP assay er en ELISA basert på oppdagelse av autoantistoffer i humant serum eller plasma mot et syntetisk syklisk peptid som inneholder modifiserte argininrester (CCP2-peptider). Testen gir et nytt verktøy i diagnosen av pasienter med RA.

## ANALYSENS PRINSIPP

Brønnene i mikrotiter-strimlene er belagt med svært rensert syntetisk syklisk citrullinert peptid som inneholder modifiserte argininrester. Under den første inkubasjonen binder spesifikke autoantistoffer i fortynnet serum eller plasma seg til den antigenbelagte overflaten. Deretter vaskes brønnene for å fjerne ubundne komponenter. I den andre inkubasjonen binder konjugatet, et enzymmerket polyklonalt antistoff til humant IgG, eventuelle overflatebundne autoantistoffer. Etter ytterligere vasking, spores spesifikke autoantistoffer gjennom inkubasjon med substratet. Tilsetning av stoppvæske avslutter reaksjonen, og dette gir et farget sluttprodukt. Mengden av bundet konjugat måles så i absorpsjonsheter. I den kvalitative protokollen sammenlignes konjugatmengden som bindes i prøven, med den mengden som bindes i referansekontrollen. I den semi-kvantitative protokollen kan konsentrasjonen av anti-CCP-autoantistoff anslås ved hjelp av interpolasjon fra en dose-responskurve basert på kalibratorer.

## SETTETS KOMPONENTER

<b>CONJ</b>	1 x 15,0 ml	Pepperrot-peroksidase-merket polyklonalt antistoff, geit, til humant IgG, 0,1 % (w/v) p-hydroksyfenyleddisyre, 0,15 % (w/v) proclin. og 1 % protein (bovin) -stabilisator (w/v) i en HEPES-buffer. <b>Bruksferdig. N.B. ADVARSEL</b>	
<b>SUBS</b>	1 x 15,0 ml	3,3',5,5'-tetrametylbenzidin, bufret oppløsning. <b>Bruksferdig. Må ikke utsettes for lys under oppbevaring. N.B. ADVARSEL</b>	 
<b>SOLN STOP</b>	1 x 15,0 ml	Svovelsyre 0,25 mol/l vannholdig oppløsning <b>Bruksferdig. N.B. FARE</b>	
<b>BUF WASH 10 X</b>	3 x 25,0 ml	Fosfatbufret saltløsning, 1,3 % (v/v) Tween 20 <b>Skal fortynnes før bruk.</b>	
<b>MTP 8 x 12</b>	8 x 12 mikrotiterstri mler med brønner (til å brette av)	Belagt med syntetisk syklisk citrullinert peptid, i en gjenlukkbar folieforpakning med tørkemiddel.	
<b>SAMPLE DIL 5 X</b>	1 x 25,0 ml	Fosfatbuffer, protein- (bovin-) stabilisator, 0,5 % (w/v) natriumazid. <b>Skal fortynnes før bruk. N.B. FARE</b>	 
<b>CAL 1</b>	1 x 1,0 ml	Fosfatbuffer, protein- (bovin-) stabilisator, < 0,1% (w/v) natriumazid. 0 e/ml. <b>Bruksferdig.</b>	
<b>CAL 2 - CAL 6</b>	5 x 1,0 ml	Humant plasma, fosfatbuffer, protein- (bovin-) stabilisator, < 0,1 % (w/v) natriumazid. 2, 8, 30, 100, 300 e/ml. <b>Bruksferdig.</b>	
<b>CONTROL REF</b>	1 x 1,5 ml	Humant plasma, buffer, < 0,1 % (w/v) natriumazid. <b>Bruksferdig.</b>	
<b>CONTROL +</b>	1 x 0,3 ml	Humant plasma, < 0,1 % (w/v) natriumazid. <b>Fortynnes 1:100 med fortynnet prøvefortynningsmiddel før bruk, som for prøver.</b>	
<b>CONTROL -</b>	1 x 0,3 ml		

# OPPBEVARING AV REAGENSER

---

## **Stabiliteten til et åpent sett**

Et sett ble åpnet og brukt om igjen ved tre tilfeller over en periode på tre måneder uten negativ effekt på settets ytelse. Etter bruk må komponentene igjen settes til oppbevaring ved 2-8°C.

## **Merknader om håndtering og prosedyrer**

1. Oppbevar settets komponenter ved 2-8 °C og bruk det innen utløpsdatoen på etikettene. Bruk ikke reagenser etter utgått utløpsdato.
2. Bland ikke ulike lot-numre.
3. Settene skal ikke fryses.
4. Vaskebufferkonsentrat, konsentrat av prøvefortynningsmiddel og positive og negative kontroller må fortynnes før bruk. Alle andre reagenser er bruksferdige.
5. Sørg for at mikrobisk kontaminasjon av den fortynnede vaskebufferen og det fortynnede prøvefortynningsmidlet, og oppbevar dem ved 2-8 °C igjen etter testing.
6. Plasser overflødige (ubrukte) mikrotiterstrimler i folieforpakningen med tørkemiddel igjen. Kontroller at forseglingen er intakt og oppbevar ved 2-8 °C igjen til du trenger dem.
7. Substratet må ikke utsettes for lys under oppbevaring.
8. Unngå kontaminasjon av reagensene. Bruk en ny engangs-pipettetupp for hver reagens- eller prøvemanipulasjon.

## **Indikasjoner på nedbrytning**

Substratet skal være fargeløst til svært lyst blått. Turbiditet eller utskilling av noen komponent indikerer nedbrytning, og komponenten skal da kasseres.

Dersom det finnes synlige krystaller i vaske- eller prøvefortynningsmidlet etter at det hentes ut fra kald oppbevaring, vil disse løse seg opp under endret temperatur og akklimatisering til romtemperatur.

## **Prøvetaking og oppbevaring**

Analysen anbefales for prøver fra humant serum (herunder serumseparator-prøverør (SST)) eller plasma (EDTA, litiumheparin eller natriumsitrat). Andre tubustyper er ikke testet for bruk i analysen. Bruk ikke grovt hemolyserte eller turbide prøver. Bland grundig tinte prøver før analysen, og unngå gjentatt frysing/tinging. Prøvene skal ikke varmeinaktiveres, det kan gi feil positive resultater.


Følg prøverørprodusentens instruksjoner for prøverør med henblikk på forberedelse av analysen. Prøvene kan oppbevares ufortynnet ved 2-8 °C i fire uker; skal oppbevares ved -20 °C eller lavere ved lenger oppbevaringstid. Prøver fortynnet i forholdet 1:100 i fortynnet prøvefortynningsmiddel må brukes innen 24 timer etter fortynningen.

# ADVARSLER OG FORSIKTIGHETSREGLER






---

## **Gjelder kun in vitro diagnostisk bruk.**

### **Sikkerhetsregler**

1. Følg strengt instruksjonene i dette heftet, særlig betingelsene for håndtering og oppbevaring.
2.  Kalibratorer og kontroller inneholder humant plasma testet med FDA-godkjente analyser for HBsAg, HIV-1 RNA eller HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 og anti-HCV eller HCV RNA, og som er funnet å være ikke-reaktive/negative. Ettersom ingen kjente tester gir absolutt trygghet for at det ikke finnes infeksjøs substans, skal kalibratorene og kontrollene anses for å være potensielt infeksjøs og håndteres med samme forsiktighet som alt annet potensielt biologisk farlig materiale. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) godkjente retningslinjer "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections" (M29-A3 –tredje utgave),<sup>22</sup> beskriver hvordan disse materialene skal håndteres i samsvar med god laboratoriepraksis.
3. Pipetter ikke med munnen.
4. Du må ikke røyke, spise, drikke eller bruke sminke i områder hvor settene og prøvene håndteres.
5. Eventuelle hudplager, kutt, gnagsår og andre hudlesjoner skal beskyttes på egnet måte.
6. Kalibratorene, kontrollene og prøvefortynningsmiddelkonsentratet inneholder natriumazid som kan reagere med bly- og kobberer og utvikle svært eksplosive metallazider. Skyll med store mengder vann under avhending, for å hindre oppbygging av azider.
7. Materialsikkerhets-datablader for alle farlige komponenter i dette settet er tilgjengelige på forespørsel til Axis-Shield Diagnostics.

OBS: I følge nasjonalt lovverk kan dette apparatet kun selges eller beordres av lege.

 Advarsel <b>Konjugat</b>	<b>Advarsel</b> H317 – <b>Forebygging</b> P272 – P280 – P363 –	Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes arbeidsplassen. Bruk vernehansker/ protectiveclothing/ vernebriller/ ansiktsskjerm. Vask forurensede klær før bruk.
 Advarsel <b>Substrat</b>	<b>Advarsel</b> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 – <b>Forebygging</b> P260 – P280 – <b>Svar</b> P301+310 – P304+340 –  P305+351+338 –	Farlig ved svelging. Farlig ved hudkontakt. Forårsaker hudirritasjon. Gir alvorlig øyeirritasjon. Farlig ved innånding. Kan forårsake irritasjon av luftveiene.  Unngå innånding av støv/ røyk / gass/ tåke/ damp spray. Bruk vernehansker/ protectiveclothing/ vernebriller/ ansiktsskjerm.  <b>VED SVELGING:</b> Kontakt umiddelbart et GIFTSENTER eller en lege/lege <b>VED INNÅNDING:</b> Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet. <b>VED KONTAKT MED ØYNENE:</b> Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.
  Fare <b>Prøvefortynningsmiddel</b>	<b>Advarsel</b> H302 – H318 – H412 – EUH032 – <b>Forebygging</b> P264 – P280 – <b>Svar</b> P301+310 – P305+351+338 –  P330 –	Farlig ved svelging. Forårsaker alvorlig øyeskade. Skadelig for vannlevende organismer med langtidseffekter. Ved kontakt med syre utvikles meget giftig gass.  Kullandiktan sonra iyice ellerinizi yıkayın. Bruk vernehansker/ protectiveclothing/ vernebriller/ ansiktsskjerm.  <b>VED SVELGING:</b> Kontakt umiddelbart et GIFTSENTER eller en lege/lege <b>VED KONTAKT MED ØYNENE:</b> Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Skyll munnen.
 Fare <b>Stoppvæske</b>	<b>Advarsel</b> H314 – <b>Forebygging</b> P260 – P273 – P280 – <b>Svar</b> P301+330+331 – P303+361+353 –  P304+340 –  P305+351+338 –	Forårsaker alvorlige hudforbrenninger og øyeskader.  Unngå innånding av støv/ røyk / gass/ tåke/ damp spray. Unngå utslipp til miljøet. Bruk vernehansker/ protectiveclothing/ vernebriller/ ansiktsskjerm.  <b>VED SVELGING:</b> Skyll munnen. IKKE fremkalles. <b>VED HUDKONTAKT (eller håret):</b> Remove / ta av alt forurenset tøy umiddelbart. Skyll huden med vann / dusj. <b>VED INNÅNDING:</b> Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet. <b>VED KONTAKT MED ØYNENE:</b> Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

## FORBEREDELSE

### Nødvendige, men ikke inkluderte materialer/utstyr

1. 96 brønnplate/strimmelleser med 450 nm filter.
2. Presisjonspipetter for levering av 10 µl, 100 µl, 1 ml. Automatisk pipette for levering av 100 µl. Automatisk pipette for levering av 300 µl til manuell vask; alternativ automatisk platevasker.
3. Målesylindere av glass/plast: 1x100 ml, 1x500 ml.
4. Beholdere med 1 ml volum.
5. Destillert/avionisert vann.
6. Papirtørkler.
7. Timer for intervaller på 30 og 60 minutter.

### Forberedelse til analysen

La alle komponentene i settet, inkl. mikrotiterstrimlene, varmes opp til 18-25 °C i 30-60 minutter før bruk. Bland reagensene ved å snu forsiktig opp ned på dem.

#### Referansekontrollen må ikke fortynnes.

Fortynn følgende reagenser og bland grundig.

Reagens	Volum	Tilsett
Vakebufferkonsentrat	1 hetteglass	225 ml destillert/avionisert vann
Prøvefortynningsmiddelkonsentrat	1 hetteglass	100 ml destillert/avionisert vann
Positive og negative kontroller/prøver	10 µl	1 ml fortynnet prøvefortynningsmiddel

Beregn antallet mikrotiterstrimler som er nødvendige for den aktuelle analysen, og plasser disse i mikrotiterstrimmelholderen. Ha overflødig strimler tilbake i den gjenlukkbare folieforpakningen med tørkemiddel og oppbevar dem ved 2-8 °C til de behøves. Kontroller at alle strimlene holdes sikkert inne i mikrotiterstrimmelholderen. Brukeren kan ønske å nummerere hver strimmel i øvre kan som støtte til identifiseringen. Ta vare på mikrotiterstrimmelholderen til senere bruk.

## ANALYSEPROTOKOLL

**Kvalitativ protokoll:** Analyse-referanseprotokoll, positive og negative kontroller og prøver.

**Semi-kvantitativ protokoll:** Analyse-kalibratorer (1-6), positive og negative kontroller og prøver.

1. Referansebrønner for indentifisering.
2. Pipetter 100 µl duplikat av referansekontroll/kalibratorer, ferdig fortynnete (1:100) positive og negative kontroller i egnede brønner. Pipetter, enten i som enkeltstykke eller duplikat 100 µl av ferdig fortynnete (1:100) pasientprøver i egnede brønner. Det anbefaler å analysere prøvene som duplikat, men dette er valgfritt i samsvar med reglene som gjelder for laboratoriene lokalt. Dette trinnet skal ikke overskride **10 minutter** for noe sett med kalibratorer/kontroller/prøver.
3. Inkuber i 60 ± 10 minutter ved 18-25 °C.
4. Dekanter strimmeinnholdet ved å snu det raskt opp ned over en utslagsvask som er egnet for avhending av biologisk materiale. Husk prøvenes potensielle infeksjonsrisiko. Tørk de omsnudde strimlene godt med papirtørkle.
5. Vask brønnene **fire ganger** med min. 300 µl fortynnet vaskebuffer. **Dekanter og tørk etter hvert vasketrinn.**
6. Tilsett 100 µl konjugat i hver brønn.
7. Inkuber i 30 ± 5 minutter ved 18-25 °C.
8. Gjenta punkt 4 og 5.
9. Tilsett 100 µl substrat i hver brønn.
10. Inkuber i 30 ± 5 minutter ved 18-25 °C. **Dekanter ikke.**
11. Tilsett 100 µl stoppvæske i hver brønn, i samme rekkefølge og rate som substrattilsetningen. Dunk forsiktig på brønnene for å blande, og kontroller at det ikke finnes synlige bobler.
12. Les strimlene ved 450 nm.
13. Les analysen innen 60 minutter etter at testen er fullført.

# BEREGNING OG TOLKING AV RESULTATENE

Vurder hver analyse separat når du beregner og tolker resultatene.

## Kvalitativ protokoll

Beregn det gjennomsnittlige absorpsjonsverdiforholdet (optisk tetthet) for positive og negative kontroller og for hver (gjennomsnittlig) prøve i forhold til referansekontrollverdi for absorpsjon:

$$\text{Absorpsjonsforhold} = \frac{\text{Gjennomsnittlig absorpsjonsverdi for kontroll}}{\text{Gjennomsnittlig absorpsjonsverdi for referansekontroll}}$$

$$\text{Absorpsjonsforhold} = \frac{(\text{Gjennomsnittlig}) \text{ absorpsjonsverdi for prøve}}{\text{Gjennomsnittlig absorpsjonsverdi for referansekontroll}}$$

Brukere bør kalkulere en cut-off mellom positive og negative prøver som er spesifikk for deres pasientgruppe. Resultatene fra pasientgruppene som ble brukt i den kliniske testen av Axis-Shield, anbefaler følgende cut-off:

<u>Absorpsjonsforhold</u>	<u>Tolking av resultat</u>
< 0,95	Negative
≥ 0,95 til ≤ 1,0	Borderline - gjentatt testing anbefales
> 1,0	Positive

## Semi-kvantitativ protokoll

Plott inn gjennomsnittlig absorpsjonsverdi for hver kalibrator opp mot log<sub>10</sub> kalibratorkonsentrasjon (se tabellen nedenfor) på egnet grafpapir. Gjennomsnittlige konsentrasjoner for positive og negative kontroller og (gjennomsnittlige) prøver kan så avleses fra kalibreringskurven. Nedenfor vises en typisk plotting på kalibreringskurve til referanseformål. Den må ikke brukes til å tolke resultater. 4-parameter logistikk (4PL) og tredjegradskurvetilpasninger er tilstrekkelig. Andre kurvetilpasningsmodeller anbefales ikke.

Prøver med absorpsjon over kalibrator 6 (300 e/ml) er utenfor analysens område og skal rapporteres som > 300 e/ml, fortynnes og analyseres på nytt, med justering for denne ytterligere fortynningsfaktoren.

For tolkningen av semi-kvantitative resultater og på basis av Axis-Shield referansedata\* om populasjon, anbefales følgende:

<u>(Gjennomsnittlig) prøveresultat</u>	<u>Resultat tolkning</u>
≤ 5 e/ml	Negativ
> 5 e/ml	Positiv

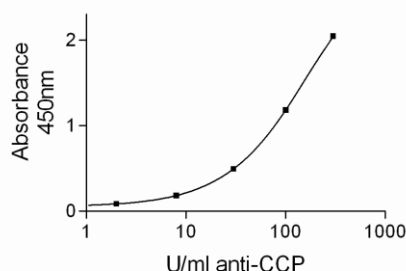
\*Dette anbefales bare som veiledende verdier. Det anbefales at brukeren oppretter et referanseområde, som kan være unikt for populasjonen.

NB: Som i alle analyser som måler antistoffer, fastslår denne analysen antistoffaktiviteten som finnes i prøven, heller enn konsentrasjonen. Aktiviteten kan være påvirket av en rekke parametere, f.eks. antistoffets aviditet.

## Kalibratorkonsentrasjoner

Kalibratorkon- num- mer	Konsentrasjon e/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

## Typisk kalibreringskurve



## KVALITETSKONTROLL

Kontroller at det utføres adekvat vedlikehold og kalibrering av plateleseren i samsvar med produsentens instruksjoner, og kontroller at det brukes korrekt bølgelengde.

Brukerne skal sørge for å være fullt ut fortløig med instruksjonene for analysen, særlig avsnittet med advarsler og forsiktighetsregler, samt med merknadene om håndtering og prosedyrer. Brukerne skal se at de kan oppnå ytelsesspesifikasjoner for presisjon og rapporterbart område av testresultater tilsvarende de som er etablert av produsenten, før de rapporterer resultater av pasienttester. De anbefales at de ferdig fortynnede positive og negative kontrollene kjøres som duplikater i alle analyser for å overvåke kvaliteten på testprosedyren. Kjør den bruksferdige referansekontrollen som duplikat i alle kvalitative analyser.

Under forutsetning av at presisjonsspesifikasjonene som er beskrevet av produsenten oppfylles, vil enhver kontroll som ikke oppfyller spesifikasjonene for kontrollforholdet nedenfor, gjøre analysen ugyldig, og pasientresultatene skal da ikke rapporteres. Operatøren kan gjenta analysen etter å ha gjennomgått prosedyren, eller kontakte distributør/produsent. Dersom analysen gjentas, må det forberedes en frisk fortynning for hver kontroll og prøve. Laboratorier kan ønske å inkludere husinterne kontroller i hver analyseomgang. Oppbevar slikt kontrollmateriale ved eller under -20 °C og unngå gjentatt frysing/tining. Konserveringsmidler som natriumazid på 0,1 % (w/v) vil ikke påvirke prøveresultatene.

Nivåer av analytter som identifiseres i spesielle sykdommer er de som produsenten har etablert for spesifikke populasjoner, og de vil ikke nødvendigvis gjenspeiles i litteraturen. Forekomstnivåer, deres forhold til spesifikke sykdommer, referanseområder og egnede cut-off punkter skal beregnes for de spesifikke populasjonene som betjenes av brukerne.

### Spesifikasjoner for kontrollforhold

Protokoll	Spesifikasjoner
Kvalitative (forhold)	$\frac{\text{Positiv kontrollabsorpsjon}}{\text{Referansek kontrollabsorpsjon}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Negativ kontrollabsorpsjon}}{\text{Referansek kontrollabsorpsjon}} < 0,95$
Semi-kvantitativ	Se etiketten på hetteglasset for positive kontroll vedrørende akseptans av forventet område (e/ml)
	Negativ kontrollkonsentrasjon < 2 e/ml

## FORVENTEDE VERDIER

200 serumprøver fra asymptomatiske, tilsynelatende friske givere innenfor en aldersgruppe fra 18-72 år, som inneholder et tilnærmet likt antall menn [n = 105] og kvinner [n = 95], ble testet med en Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP200).

Det ble ikke observert forskjeller som kan knyttes til kjønn eller alder (beregnete, sammenlignede aldersgrupper på ≤ 40 år [n = 115] og > 40 år [n = 85]).

Samlet gjennomsnittlig anti-CCP-konsentrasjon for denne populasjonen var  $0,63 \pm 0,419$  e/ml (område 0,05-3,8 e/ml).

På grunnlag av disse dataene for referansepopulasjonen og dataene for den kliniske populasjonen, er anbefalt cut-off for analysen:

<p><i>Referanseområde</i> ≤ 5 e/ml = negativ &gt; 5 e/ml = positiv</p>
--

Dette referanseområdet er bare anbefalt som veiledende, og hvert laboratorium bør etablere et eget referanseområde som kan være unikt for populasjonen som betjenes, avhengig av geografiske faktorer, pasientfaktorer, diettfaktorer, miljøfaktorer eller klinisk praksis. Vær oppmerksom på at reumatoid artritt forekommer dobbelt så ofte hos kvinner som hos menn.



## Y T E L S E S D A T A

### *Fortynningens linearitet*

Axis-Shield Anti-CCP assay er utviklet for å være lineær over måleområdet fra LOD til 300 e/ml.

Basert på en studie utført i samsvar med veiledningen i CLSI-dokument EP6-A,<sup>23</sup> viste Axis-Shield Anti-CCP assay linearitet fra 1,04 e/ml til 300 e/ml.\*

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data

Prøver > 300 e/ml har gjennomsnittlig restitusjon på  $\leq 100 \% \pm 15 \%$ \* av forventet resultat når de fortynnes til analyseområdet og korrekt fortynningsfaktor brukes.

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data

### *Klinisk sensitivitet og spesifisitet*

Den kliniske sensitiviteten til Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP600) ble fastslått for 229 individer med bekreftet RA, og klinisk spesifisitet ble fastslått for 285 ikke-RA prøver (135 fra pasienter med annen revmatisk og ikke-revmatisk sykdom, og 150 fra asymptotiske, tilsynelatende friske personer). Ved hjelp av en cut-off på 5,0 e/ml ble sensitiviteten beregnet til å være 78 % med en spesifisitet på 99 %. Resultatene er oppsummert i tabellene nedenfor.\*

Prøvekategori	Totalt n	Positiv n	% sensitivitet
RA	229	179	78

Prøvekategori	Totalt n	Positiv n	% spesifisitet
Ikke-RA prøver av total	285	4	98,6
Ikke-RA, friske, asymptotiske	150	1	99,3
Ikke-RA sykdomsprøver <sup>†</sup>	135	3	97,8

<sup>†</sup>Klinisk spesifisitet for 135 prøver fra pasienter med andre rheumatiske og ikke-rheumatiske sykdommer er kategorisert i tabellen nedenfor.\*

Ikke-RA sykdoms-prøver	Totalt n	Positiv n	Klinisk spesifisitet
Totalt	135	3	97,8 %
Inflammatorisk polyartritt	41	1	97,6 %
EBV IgG-positiv	18	1	94,4 %
Hashimotos thyroiditt	17	0	100 %
Sjögrens syndrom	16	1	93,8 %
Systemisk lupus erythematosus	16	0	100 %
Vaskulitt	5	0	100 %
Skleroderma	5	0	100 %
Osteoartritt	4	0	100 %
Crohns sykdom	3	0	100 %
Raynauds fenomen	3	0	100 %
Ulcerativ kolitt	2	0	100 %
Psoriasisk artritt	2	0	100 %
Reaktiv artritt	1	0	100 %
Ankyloserende spondylitt og polymyositt	2	0	100 %

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data.

### Sammenligning av metode

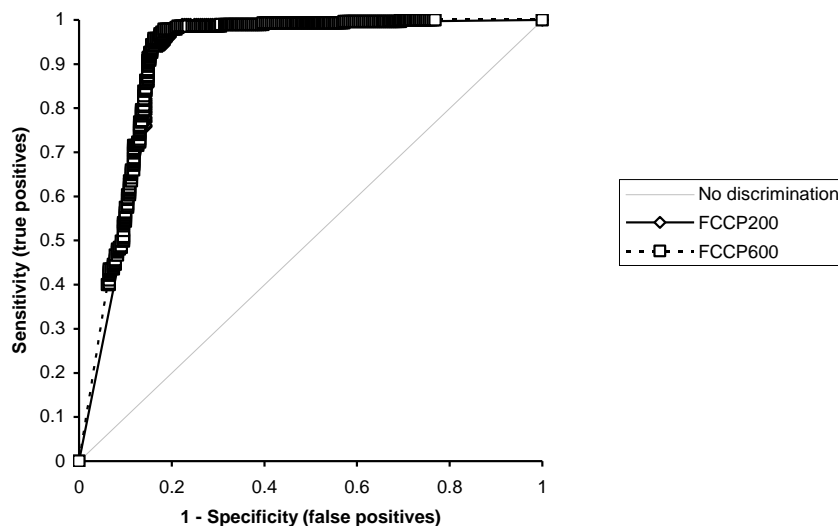
Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP600) er utviklet for å ha en konkordans på  $\geq 99\%$  for RA og ikke-RA prøver, sammenlignet med en komparator Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP200). RA og ikke-RA prøvene som er beskrevet i avsnittet Klinisk sensitivitet og spesifisitet, ble brukt for å sammenligne Axis-Shield Anti-CCP (FCCP600) assay med Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP200). Den cut-off som ble brukt for Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP200) var 5,0 e/ml, som angitt i produsentens pakningsvedlegg. Ved bruk av en cut-off på 5,0 e/ml for Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP600), ble konkordansen beregnet til å være 99 %. Resultatene er oppsummert i tabellene nedenfor.\*

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

Sammenligningsmetode	FCCP600 vs FCCP200
Antall prøver	65
Regresjonslinjens stigning	0,910
Y-skjæringspunkt	1,226
Korrelasjon koeffisient	0,94

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data.

En ROC-analyse (Receiver Operator Characteristic) ble utført ved hjelp av ovenforstående data hentet fra de to assayene. Området under kurven (AUC) for Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP600) var 0,910 (95 % konfidensintervall: 0,881-0,940) og 0,903 (95 % konfidensintervall: 0,871-0,934) for komparatoren Axis-Shield Anti-CCP assay (FCCP200), og indikerte dermed at begge assayer er sammenlignbare med henblikk på klinisk differensiering. ROC-analysekurven er vist nedenfor.\*



\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data.

### Presisjon

Det ble utført en studie med veiledning av CLSI (formelt NCCLS) -dokument EP5-A2.<sup>24</sup> To anti-CCP-kontroller, seks QC-panelmedlemmer og en prøve fra humant serum ble analysert ved hjelp av to partier med reagenser, i replikater på to, på to ulike tidspunkt på dagen i 20 dager (n=80). Data fra denne studien er oppsummert som representative data i tabellen nedenfor (avrundet til 1 desimal bak kommaet):

Prøve	Sett Lot	n	Gjennomsnitt (e/ml)	Innenfor forløp		Mellom forløp		Mellom dag		Totalt	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Positiv kontroll	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 Kontroll	001	80	5,18	0,34	6,6	0,24	4,6	0,21	4,0	0,46	9,0
	003		5,09	0,26	5,1	0,21	4,1	0,21	4,2	0,39	7,7
Prøve 1	001	80	4,83	0,16	3,3	0,38	7,9	0,24	5,0	0,48	9,9
	003		4,77	0,20	4,1	0,37	7,8	0,25	5,2	0,49	10,2

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data

### Minste detekterbare mengde

Minste detekterbare mengde (LOD) for Axis-Shield Anti-CCP assay i henhold til CLSI (formelt NCCLS) -dokument EP17-A<sup>25</sup> ble funnet å være 1,04 e/ml\*.

LOD-målinger ble utført ved hjelp av en negativ anti-CCP-prøve (60 replikater) og seks anti-CCP-prøver med lavt nivå (15 replikater hver).

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data.

### High Dose Hook

High dose hook er et fenomen hvor prøver med svært høyt nivå kan avleses innenfor analysens dynamiske område. For Axis-Shield Anti-CCP assay ble det ikke observert high dose hook-effekt når en prøve som inneholdt ca. 3000 e/ml anti-CCP-antistoff ble analysert.\*

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data.

### Interferens

Axis-Shield Anti-CCP assay er utviklet for å ha maks. avvik i anti-CCP-konsentrasjon fra følgende potensielt forstyrrende sammensetninger innenfor:

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

Det ble utført en studie basert på veiledning fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) -dokument EP7-A2<sup>26</sup> for Axis-Shield Anti-CCP assay. Seks prøver med anti-CCP-nivåer tvers over analyseområdet ble supplert med potensielt forstyrrende sammensetninger angitt i tabellen nedenfor. Maks. avvik av anti-CCP-konsentrasjon som ble observert i prøver under disse studiene, spente fra:

- -9,4 % til 3,3 % for anti-CCP-konsentrasjoner  $\geq 10,0$  e/ml
- -7,3 % til 4,8 % for anti-CCP-konsentrasjoner  $\geq 4,0$  e/ml til  $< 10,0$  e/ml
- -0,6 e/ml til 0,05 e/ml for anti-CCP-konsentrasjoner  $< 4,0$  e/ml\*

Potensielt forstyrrende substans	Ingen interferens funnet opp til følgende konsentrasjon
Hemoglobin	4 mg/ml
Bilirubin	0,2 mg/ml
Triglyserid (intralipidoppløsning)	15 mg/ml
Reumatoid faktor	200 IE/ml
Totalt protein (gammaglobuliner)	120 mg/ml

\* Representative data; resultater i individuelle laboratorier kan avvike fra disse data.

## B E G R E N S N I N G E R F O R B R U K E N

1. Selv om tilstedeværelsen av antistoffer til CCP er assosiert med reumatoid artritt, er et positivt resultat ikke i seg selv diagnostisk. Dataene må vurderes i lyset av andre kliniske funn og laboratoriefunn.
2. Noen personer kan ha høye nivåer med anti-CCP-antistoffer med få eller ingen beviser for klinisk sykdom. Derimot kan noen pasienter med aktiv sykdom ha ikke detekterbare nivåer av disse antistoffene. Man vet ikke på det nåværende tidspunkt hvilken klinisk betydning denne informasjonen har.
3. Ettersom resultatet av en anti-CCP-analysen er ikke diagnostisk bevis for tilstedeværelse eller fravær av klinisk sykdom, bør ikke startes på grunnlag av bare et anti-CCP-positivt resultat.
4. Oppstart eller endringer av en behandling bør ikke baseres på endringer i konsentrasjonen av anti-CCP-autoantistoff, men heller på klinisk(e) observasjon(er).
5. Den kliniske effekten av å overvåke nivåene av CCP-autoantistoff som indikasjon for progresjon/remisjon av reumatoid artritt er ikke definert.
6. Verdien av anti-CCP ved artritt hos ungdom er ikke fastslått.
7. På grunn av de spesifikke karakteristika til interaksjoner mellom antigen/antistoff er det ikke konsentrasjonen av antistoff som er avgjørende, men aktiviteten. Ettersom pasientsera inneholder heterogene antistoffpopulasjoner, kan noen prøver ha ikke-linearitet, særlig ved svært høy fortykning av prøven.

## REFERANSER

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 citullinated 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

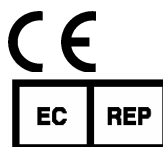
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, UK.

Tel: +44 (0) 1382 422000,

Fax: +44 (0) 1382 422088.

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

Web: [www.axis-shield.com](http://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* diagnostisk medisinsk utstyr

**REF**

Katalognummer

**LOT**

Lot



96 tester



Forsiktig



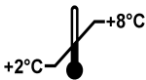
Se bruksanvisningen



Beskyttes mot lys



Brukes senest



Oppbevares ved 2-8 °C

**Rx Only**

Reseptbelagt preparat.



Produsert av

**CONTROL +**

Positiv kontroll

**CONTROL -**

Negativ kontroll

**CONJ**

Konjugat

**SUBS**

Substrat

**SOLN STOP**

Stoppvæske

**BUF WASH 10 X**

Vaskebuffer

**MTP 8 x 12**

Mikrotiterstrimler (til å brette av)

**SAMPLE DIL 5 X**

Prøvefortynningsmiddel

**CAL 1**

Kalibrator 1

**CAL 2 - CAL 6**

Kalibrator 2-6

**CONTROL REF**

Referansekontroll