



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

**anti-CCP**

**IVD**



**REF FCCP600**

**Apenas para utilização por profissionais**



**Axis-Shield Diagnostics Limited**

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, Reino Unido.

*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)

O teste anti-CCP Axis-Shield é um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) semi-quantitativo/qualitativo para a detecção de auto-anticorpos da classe IgG específicos para o péptido citrulinado cíclico (CCP) no soro (incluindo tubos separadores de soro (SST)) ou plasma (EDTA, heparina de lítio ou citrato de sódio) humanos. A detecção de auto-anticorpos para o CCP é utilizada como auxiliar no diagnóstico de artrite reumatóide (AR) e deve ser usada em conjunção com outros dados clínicos. Os níveis de auto-anticorpos representam apenas um parâmetro num processo diagnóstico com múltiplos critérios, os quais incluem avaliações clínicas e laboratoriais. Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

## **INTRODUÇÃO**

A artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune sistémica comum que afecta 0,5-1,0% da população adulta. A AR caracteriza-se por inflamação crónica da membrana sinovial que pode conduzir a destruição articular progressiva e, em muitos casos, a incapacidade e redução da qualidade de vida.<sup>1</sup> É geralmente aceite que a intervenção precoce é vital para prevenir lesão articular irreversível e, por isso, é importante diagnosticar a AR na fase mais precoce possível da curso da doença.<sup>2,3</sup> O diagnóstico da AR baseia-se primariamente em parâmetros clínicos, radiológicos e imunológicos. A medição do factor reumatóide (FR) é o teste serológico mais frequente.<sup>4</sup> Embora o teste do FR tenha boa sensibilidade, não é específico para a AR, uma vez que está frequentemente presente em indivíduos saudáveis e pacientes com outras doenças reumáticas ou inflamatórias, doenças auto-imunes ou infecções crónicas.<sup>5</sup>

É reconhecido, há já vários anos, que os anticorpos para o factor antiperinuclear (APF) e antiqueratina (AKA) são altamente específicos para a AR. Subsequentemente, foi descrito que estes dois anticorpos reagem com filagrina nativa e são, por isso, hoje designados como anticorpos antifilagrina (AFA).<sup>6,7,8</sup> Evidência recente demonstrou que todos estes anticorpos são dirigidos contra os epítomos que exibem citrulina.<sup>9</sup> A citrulina é um aminoácido não proteínogénico, uma vez que não é incorporado em proteínas durante a síntese proteica. No entanto, pode ser gerada por modificação pós-translacional de resíduos de arginina pela enzima peptidilarginina deiminase (PAD).<sup>10</sup> Em 1998, Schellekens et al descreveram que auto-anticorpos que reagem com péptidos sintéticos lineares contendo citrulina eram altamente específicos para a AR, num ensaio por ELISA.<sup>11</sup> Estudos subsequentes demonstraram que as variantes cíclicas destes péptidos lineares, designadas como péptidos citrulinados cíclicos (CCP), tinham especificidade para AR comparável mas uma sensibilidade mais elevada que os péptidos lineares.<sup>12</sup> Numa tentativa de melhorar ainda mais a sensibilidade do teste CCP, foi testada uma biblioteca dedicada de péptidos citrulinados com soros de AR, levando à descoberta de um novo conjunto de péptidos (CCP2) que conferiram um desempenho superior ao teste CCP1.<sup>13</sup> Ao longo dos últimos anos, o desempenho diagnóstico do teste CCP2 foi confirmado por vários estudos publicados.<sup>14</sup> Foi ainda estabelecido que anticorpos anti-CCP, habitualmente também designados por anticorpos contra o(a) péptido/proteína citrulinado (ACPA's), estão presentes nas fases precoces da doença, muitas vezes na ausência de um quadro clínico. Vários estudos indicam também que níveis elevados de anticorpos anti-CCP podem ser úteis para prever o desenvolvimento de doença erosiva.<sup>15,16,17,18,19,20</sup> Estes achados, sugerem um papel importante dos péptidos citrulinados cíclicos no diagnóstico da AR, numa fase precoce da história natural da doença.







Em 2010, foram publicados os *Crítérios de Classificação para a Artrite Reumatóide do ACR / EULAR*, substituindo os critérios "antigos" de 1987 do ACR que eram amplamente considerados como inadequados para o diagnóstico precoce de AR. Os critérios de classificação revistos, publicados em conjunto pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) recomendam um sistema de pontuação de 0 a 10. Os novos critérios de classificação devem ser aplicados a todos os indivíduos que se apresentem com sinovite definitiva (artrite inflamatória indiferenciada). Os quatro critérios adicionais foram o número de articulações envolvidas, anormalidade serológica, resposta de fase aguda e duração dos sintomas nas articulações envolvidas. Pela primeira vez, os critérios serológicos passaram a incluir a medição de ACPAs tais como anti-CCP, bem como alguma definição sobre resultados serológicos positivos baixos e positivos altos.<sup>21</sup>

O ensaio anti-CCP Axis-Shield é um ELISA baseado na detecção, no soro ou plasma humano, de auto-anticorpos dirigidos contra o péptido cíclico sintético contendo resíduos de arginina modificados (péptidos CCP2). Este teste oferece um instrumento adicional no diagnóstico de pacientes com AR.

## **PRINCÍPIO DO ENSAIO**

Os poços das tiras de microtitulação estão revestidos com um péptido citrulinado cíclico sintético altamente purificado, contendo resíduos de arginina modificados. Durante a primeira incubação, auto-anticorpos específicos em soro ou plasma diluído ligam-se à superfície revestida com antigénio. Os poços são depois lavados para remover componentes não ligados. Na segunda incubação o conjugado, um anticorpo policlonal marcado com enzima para a IgG humana, liga-se a quaisquer auto-anticorpos ligados à superfície. Após nova lavagem, os auto-anticorpos específicos são marcados por incubação com o substrato. A reacção termina por adição da solução de paragem, resultando num produto final colorido. A quantidade de conjugado ligado é medida em unidades de absorvância. No protocolo qualitativo, a quantidade de conjugado ligado pela amostra é comparada com aquela ligada pelo controlo de referência. No protocolo semi-quantitativo, a concentração de auto-anticorpo anti-CCP pode ser estimada por interpolação a partir de uma curva de dose-resposta baseada nos calibradores.

## COMPONENTES DO KIT

<b>CONJ</b>	1 x 15,0 ml	Anticorpo policlonal caprino marcado com peroxidase de rábano contra a IgG humana, ácido p-hidroxifenilacético a 0,1% (w/v), proclina a 0,15% (w/v) e estabilizador de proteínas (bovino) a 1% (w/v) num tampão HEPES. <b>Pronto a usar. OBS.: ATENÇÃO</b>	
<b>SUBS</b>	1 x 15,0 ml	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, solução tampão. <b>Pronto a usar. Não expor à luz durante armazenamento. OBS.: ATENÇÃO</b>	 
<b>SOLN STOP</b>	1 x 15,0 ml	Solução aquosa de ácido sulfúrico a 0,25 mol/l <b>Pronta a usar. OBS.: PERIGO</b>	
<b>BUF WASH 10 X</b>	3 x 25,0 ml	Solução fisiológica de fosfato tamponada a 1,3% (v/v) Tween 20 <b>Diluir antes de usar.</b>	
<b>MTP 8 x 12</b>	Tiras de microtitulação (separáveis) com 8 x 12 poços	Revestidos com péptido citrulinado cíclico sintético, num invólucro de alumínio com dessecante e selo reutilizável.	
<b>SAMPLE DIL 5 X</b>	1 x 25,0 ml	Tampão de fosfato, estabilizador (bovino) de proteínas, azida de sódio a 0,5% (w/v). <b>Diluir antes de usar. OBS.: PERIGO</b>	 
<b>CAL 1</b>	1 x 1,0 ml	Tampão de fosfato, estabilizador (bovino) de proteínas, azida de sódio a < 0,1% (w/v). 0 U/ml. <b>Pronto a usar.</b>	
<b>CAL 2 - CAL 6</b>	5 x 1,0 ml	Plasma humano, tampão de fosfato, estabilizador (bovino) de proteínas, azida de sódio a < 0,1% (w/v). 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. <b>Pronto a usar.</b>	
<b>CONTROL REF</b>	1 x 1,5 ml	Plasma humano, tampão, azida de sódio a < 0,1% (w/v). <b>Pronto a usar.</b>	
<b>CONTROL +</b>	1 x 0,3 ml	Plasma humano, azida de sódio a < 0,1% (w/v). <b>Diluir em 1:100 com diluente de amostras diluído antes de usar, tal como para as amostras.</b>	
<b>CONTROL -</b>	1 x 0,3 ml		

# ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

## **Estabilidade do kit aberto**

Um kit foi aberto e reutilizado em três ocasiões, durante um período de 3 meses, sem quaisquer efeitos adversos no desempenho do kit. Após a utilização, os componentes têm de ser novamente armazenados a 2-8°C.

## **Notas sobre manuseamento e procedimentos**

1. Armazene os componentes do kit a 2-8°C e utilize antes do prazo de validade indicado nas etiquetas. Não utilize reagentes cujo prazo de validade tenha expirado.
2. Não misture números de lotes diferentes.
3. Não congele os kits.
4. O concentrado de tampão de lavagem, o concentrado do diluente de amostras e os controlos positivos e negativos têm de ser diluídos antes de utilizar. Todos os outros reagentes estão prontos a usar.
5. A contaminação microbiana do tampão de lavagem diluído e diluente de amostras diluído deve ser evitada e estas soluções devem ser novamente colocadas a 2-8°C após o teste.
6. Volte a colocar as tiras de microtitulação excedentes (não utilizadas) no invólucro de alumínio com o dessecante. Assegure-se de que o selo está intacto e volte a colocar a 2-8°C, até que sejam novamente necessárias.
7. Não exponha o substrato à luz durante o armazenamento.
8. Evite a contaminação dos reagentes. Utilize uma nova pipeta descartável para cada reagente ou cada manipulação da amostra.

## **Indicadores de deterioração**

O substrato deve ser incolor ou apresentar uma coloração azul muito clara. Turvação ou precipitação de qualquer componente são indicadores de deterioração e, nestas situações, o componente deve ser eliminado.

Se, após remoção do armazenamento a frio, forem visíveis cristais no diluente de lavagem ou da amostra estes serão dissolvidos após inversão ou equilíbrio à temperatura ambiente.

## **Colheita e armazenamento da amostra**


Este ensaio é recomendado para amostras de soro (incluindo tubo separador de soro (SST)) ou plasma (EDTA, heparina de lítio ou citrato de sódio) humanos. Não foram testados outros tipos de tubos para utilização neste ensaio. Não utilize amostras claramente hemolizadas ou turvas. Misture devidamente amostras descongeladas antes do ensaio e evite repetir o processo de congelamento/descongelamento. Não inactive amostras por calor, uma vez que isto pode produzir resultados falso-positivos.

Em preparação para análise, siga as instruções do fabricante dos tubos de colheita. As amostras podem ser armazenadas não diluídas a 2-8°C durante quatro semanas; para armazenamento mais prolongado, conserve a temperaturas iguais ou inferiores a -20°C. As amostras diluídas a 1:100 em diluente de amostras diluído devem ser usadas num prazo de 24 horas após a diluição.






# ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

## **Apenas para utilização em diagnóstico in vitro.**

### **Precauções de segurança**

1. Siga rigorosamente as instruções nesta brochura, em particular as relativas a condições de manuseamento e armazenamento.
2.  Os calibradores e os controlos contêm plasma humano testado por ensaios autorizados pela FDA, para a detecção de HBsAg, HIV-1 RNA ou HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, e anti-HCV ou HCV RNA, e determinado como sendo não reactivo/negativo. Uma vez que não se conhecem testes que ofereçam completa garantia de ausência de agentes infecciosos, os calibradores e controlos devem ser considerados potencialmente infecciosos e, por isso, manuseados com as mesmas precauções adoptadas para quaisquer outros materiais com potencial risco biológico. As directrizes para "Protecção de trabalhadores de laboratórios de infecções por exposição ocupacional" (M29-A3 - Terceira Edição), aprovadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),<sup>22</sup> descrevem a forma como estes materiais devem ser manuseados, de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais.
3. Não faça pipetagem com a boca.
4. Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos em áreas onde os kits e as amostras são manuseados.
5. Quaisquer problemas de pele, cortes, abrasões e outras lesões na pele devem ser devidamente protegidos.
6. Os calibradores, controlos e concentrado de diluente de amostras contêm azida de sódio que pode reagir com canalização de chumbo e cobre, formando azidas de metal altamente explosivas. Ao eliminar os resíduos, escoe com grandes quantidades de água para prevenir a acumulação de azidas.
7. Estão disponíveis, mediante solicitação à Axis-Shield Diagnostics, as fichas de segurança dos materiais para todos os componentes perigosos incluídos neste kit.

Atenção: A Lei Federal restringe a venda deste dispositivo a apenas mediante solicitação de um médico.

 <p>Atenção <b>Conjugado</b></p>	<p><b><u>Atenção</u></b> H317 –</p> <p><b><u>Prevenção</u></b> P272 – P280 –  P363 –</p>	<p>Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.</p> <p>A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.</p> <p>Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.</p>
 <p>Atenção <b>Substrato</b></p>	<p><b><u>Atenção</u></b> H302 – H312 – H315 – H319 – H332 – H335 –</p> <p><b><u>Prevenção</u></b> P260 – P280 –</p> <p><b><u>Resposta</u></b> P301+310 –  P304+340 –  P305+351+338 –</p>	<p>Nocivo por ingestão.</p> <p>Nocivo em contacto com a pele.</p> <p>Provoca irritação cutânea.</p> <p>Provoca irritação ocular grave.</p> <p>Nocivo por inalação.</p> <p>Pode provocar irritação das vias respiratórias.</p> <p>Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.</p> <p>EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.</p> <p>SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.</p>
  <p>Perigo <b>Diluyente de amostras</b></p>	<p><b><u>Atenção</u></b> H302 – H318 – H412 – EUH032 –</p> <p><b><u>Prevenção</u></b> P264 – P280 –</p> <p><b><u>Resposta</u></b> P301+310 –  P305+351+338 –  P330 –</p>	<p>Nocivo por ingestão.</p> <p>Provoca lesões oculares graves.</p> <p>Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros</p> <p>Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.</p> <p>Lavar mãos cuidadosamente após manuseamento.</p> <p>Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.</p> <p>SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.</p> <p>Enxaguar a boca.</p>
 <p>Perigo <b>Solução de paragem</b></p>	<p><b><u>Atenção</u></b> H314 –</p> <p><b><u>Prevenção</u></b> P260 – P273 – P280 –</p> <p><b><u>Resposta</u></b> P301+330+331 – P303+361+353 –  P304+340 –  P305+351+338 –</p>	<p>Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.</p> <p>Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>Evitar a libertação para o ambiente.</p> <p>Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.</p> <p>SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.</p> <p>EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.</p> <p>SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.</p>

# PREPARAÇÃO

## **Materiais/Equipamento necessários mas não fornecidos**

1. Leitor de tira/placa de 96 poços com filtro de 450 nm.
2. Pipetas de precisão para dispensar 10 µl, 100 µl, 1 ml. Pipeta automática para dispensar 100 µl. Pipeta automática para dispensar 300 µl para lavagem manual; o lavador de placas automático é opcional.
3. Cilindros de medição de vidro/plástico: 1x100 ml, 1x500 ml.
4. Recipientes para volumes de 1 ml.
5. Água destilada/desionizada.
6. Toalhas de papel.
7. Temporizador para intervalos de 30 e 60 minutos.

## **Preparação para o ensaio**

Permita que todos os componentes do kit, incluindo as tiras de microtitulação, aqueçam até temperaturas de 18-25°C, durante 30-60 minutos antes de utilizar. Misture os reagentes por inversão cuidadosa.

### **Não dilua o controlo de referência.**

Dilua os seguintes reagentes e misture devidamente.

Reagente	Volume	Adicionar
Concentrato de tampão de lavagem	1 frasco	225 ml de água destilada/desionizada
Concentrado de diluente de amostras	1 frasco	100 ml de água destilada/desionizada
Amostras/Controlos positivos e negativos	10 µl	1 ml de diluente de amostras diluído

Calcule o número de tiras de microtitulação necessárias para o presente ensaio e fixe-as no suporte de tiras de microtitulação. Volte a colocar as tiras excedentes no invólucro de alumínio com selo reutilizável, com o dessecante e armazene a 2-8°C até serem novamente necessárias. Assegure-se de que todas as tiras estão firmemente fixas ao suporte de tiras de microtitulação. Os utilizadores poderão optar por numerar cada tira ao longo da margem superior para facilitar a sua identificação. Guarde o suporte de tiras de microtitulação para utilização futura.

# PROTOCOLO DE ENSAIO

**Protocolo qualitativo:** controlo de referência do ensaio, controlos positivo e negativo e amostras.

**Protocolo semi-quantitativo:** calibradores de ensaio (1-6), controlos positivo e negativo e amostras.

1. Marque os poços para fins de identificação.
2. Pipete em duplicado 100 µL de controlo de referência/calibradores e os controlos positivos e negativos pré-diluídos (1:100) nos poços apropriados. Pipete isoladamente ou em duplicado 100 µL de amostras de doente pré-diluídas (1:100) nos poços apropriados. Recomenda-se que as amostras sejam avaliadas em duplicado, sendo, no entanto, opcional de acordo com as regras laboratoriais locais. Esta etapa não deve exceder **10 minutos**, para qualquer conjunto de calibradores/controlos/amostras.
3. Proceda a incubação por 60 ± 10 minutos a 18-25°C.
4. Decante os conteúdos das tiras por inversão rápida para um lavatório adequado à eliminação de materiais biológicos, tendo em conta o risco infeccioso potencial das amostras. Seque bem as tiras invertidas com toalhas de papel.
5. Lave os poços **quatro vezes** com um mínimo de 300 µl de tampão de lavagem diluído. **Decante e seque após cada etapa de lavagem.**
6. Adicione a cada poço 100 µl de conjugado.
7. Proceda a incubação por 30 ± 5 minutos a 18-25°C.
8. Repita as etapas 4 e 5.
9. Adicione a cada poço 100 µl de substrato.
10. Proceda a incubação por 30 ± 5 minutos a 18-25°C. **Não decante.**
11. Adicione 100 µl de solução de paragem a cada poço, na mesma ordem e velocidade que para a adição de substrato. Bata os poços suavemente para misturar e garantir que não há bolhas visíveis.
12. Efectue leitura das tiras a 450 nm.
13. Proceda à leitura do ensaio até 60 minutos após terminar o teste.

# CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Considere cada ensaio separadamente ao calcular e interpretar os resultados.

## Protocolo qualitativo

Calcule o rácio do valor médio de absorvância (densidade óptica) para os controlos positivos e negativos e para cada amostra (média) para o valor médio de absorvância do controlo de referência:

$$\text{Rácio de absorvância} = \frac{\text{Valor médio de absorvância do controlo}}{\text{Valor médio de absorvância do controlo de referência}}$$

$$\text{Rácio de absorvância} = \frac{\text{Valor de absorvância de amostra (média)}}{\text{Valor médio de absorvância do controlo de referência}}$$

Os utilizadores devem calcular um valor de corte entre as amostras positivas e negativas que seja específico para as suas populações de pacientes. Os resultados das populações de pacientes usadas no ensaio clínico Axis-Shield, sugerem o seguinte valor de corte:

<u>Rácio de absorvância</u>	<u>Interpretação do resultado</u>
< 0,95	Negativo
≥ 0,95 a ≤ 1,0	Resultado limite (borderline) - recomenda-se repetição do teste
> 1,0	Positivo

## Protocolo semi-quantitativo

Lance o valor (médio) de absorvância para cada calibrador em função do  $\log_{10}$  da concentração do calibrador (ver tabela seguinte) num gráfico de papel adequado. As concentrações (médias) de controlos positivos e negativos e amostras podem ser lidas a partir da curva de calibração; um gráfico típico da curva de calibração é mostrado abaixo a título de referência mas não deve ser utilizado para interpretar resultados. Os ajustes de curva de logística de 4 parâmetros (4PL) e spline cúbica são modelos satisfatórios. Não se recomendam outros modelos de ajuste de curva.

As amostras com absorvâncias acima do calibrador 6 (300 U/ml) estão fora do intervalo do ensaio e devem ser descritas como > 300 U/ml, diluídas e novamente testadas, introduzindo correcção para este factor de diluição adicional.

Para a interpretação de resultados semi-quantitativos e com base nos dados da população de referência\* da Axis-Shield, sugere-se o seguinte:

<u>Resultado (médio) da amostra</u>	<u>Interpretação do resultado</u>
≤ 5 U/ml	Negativo
> 5 U/ml	Positivo

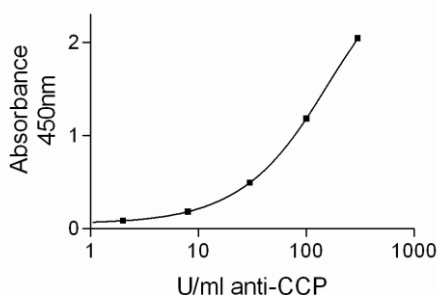
\* Esta sugestão é apresentada apenas a título de orientação. Recomenda-se que os utilizadores estabeleçam um intervalo de referência que pode ser exclusivo da população.

OBS.: Tal como num ensaio de medição de anticorpos, este ensaio determina a actividade do anticorpo presente na amostra e não a sua concentração. A actividade pode ser afectada por um conjunto de parâmetros tais como a avidéz dos anticorpos.

Concentrações do calibrador

Número do calibrador	Concentração U/ml
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Curva de calibração típica



## CONTROLO DE QUALIDADE

Assegure-se de que é efectuada manutenção e calibração adequadas do leitor de placas, de acordo com as instruções do fabricante, e que é empregue o comprimento de onda correcto.

Os utilizadores devem certificar-se que estão completamente familiarizados com as instruções do ensaio, em particular a secção de Advertências e Precauções e as Notas sobre manuseamento e procedimentos. Os utilizadores devem demonstrar que conseguem obter especificações de desempenho para precisão e intervalos de resultados de testes reportados, comparáveis aos estabelecidos pelo fabricante, antes de documentar resultados de testes em pacientes. Recomenda-se que os controlos positivos e negativos pré-diluídos sejam testados em duplicado em todos os ensaios, por forma a monitorizar a qualidade do procedimento de teste. Teste em duplicado o controlo de referência pronto a usar, em todos os ensaios qualitativos.

Assumindo que as especificações de precisão descritas pelo fabricante são atingidas, caso qualquer controlo não atinja as especificações do rácio de controlo abaixo indicadas, o ensaio terá de ser considerado inválido e os resultados do paciente não poderão ser documentados. O operador pode repetir o ensaio, após revisão do procedimento, ou contactar o distribuidor/fabricante. Caso repita o ensaio, prepare uma nova diluição para cada controlo e amostra. Os laboratórios podem optar por incluir controlos internos para cada teste de ensaio. Conservar este tipo de material de controlo a temperatura igual ou inferior a -20°C e evitar ciclos repetidos de congelação/descongelação. Os conservantes, como azida de sódio a 0,1% (p/v), não afectam os resultados da amostra.

Os níveis de analitos identificados em determinadas doenças são os estabelecidos pelo fabricante para populações específicas e podem não reflectir necessariamente a literatura. Os níveis de incidência, a sua relação com doenças específicas, os intervalos de referência e os valores de corte adequados devem ser calculados para as populações específicas avaliadas pelos utilizadores.

### Especificações do rácio de controlos

Protocolo	Especificações
Qualitativo (rácios)	$\frac{\text{Absorvância do controlo positivo}}{\text{Absorvância do controlo de referência}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Absorvância do controlo negativo}}{\text{Absorvância do controlo de referência}} < 0,95$
Semi-quantitativo	Consultar rótulo do frasco do controlo positivo para informação sobre o intervalo de aceitação esperado (U/ml)
	Concentração do controlo negativo < 2 U/ml

## VALORES ESPERADOS

Foram testadas, com um ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP200), 200 amostras de soro de doadores assintomáticos e aparentemente saudáveis, com um intervalo de idades de 18-72 anos, em números aproximadamente iguais de indivíduos do sexo masculino [n = 105] e feminino [n = 95].

Não se observaram diferenças atribuíveis ao sexo ou à idade (calculadas comparando intervalos de idades de  $\leq 40$  anos [n = 115] e  $> 40$  anos [n = 85]).

A média geral da concentração de anti-CCP para esta população foi de  $0,63 \pm 0,419$  U/ml (intervalo 0,05-3,8 U/ml).

Com base nos dados desta população de referência e da população clínica, o valor de corte sugerido para o ensaio é:

<i>Intervalo de referência</i> $\leq 5$ U/ml = Negativo $> 5$ U/ml = Positivo
---

Este intervalo de referência é sugerido apenas como uma orientação e cada laboratório deve estabelecer um intervalo de referência que pode ser único para a população abrangida, de acordo com factores geográficos, dietéticos, ambientais, relacionados com o paciente ou de acordo com a prática clínica. Tenha em atenção que a artrite reumatóide é duas vezes mais prevalente nas mulheres que nos homens.



## DADOS DE DESEMPENHO

### Linearidade da diluição

O ensaio anti-CCP Axis-Shield foi concebido para ser linear ao longo do intervalo de medição, do LOD (limite de detecção) até 300 U/ml.

Tendo por base o estudo realizado de acordo com o documento CLSI EP6-A,<sup>23</sup> o ensaio anti-CCP Axis-Shield demonstrou linearidade para valores entre 1,04 U/ml e 300 U/ml.\*

\* Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais

Amostras com valores > 300 U/ml exibem uma recuperação média de  $\leq 100\% \pm 15\%$ \* relativamente ao resultado esperado, quando diluídas até ao intervalo de ensaio e utilizando o factor de diluição correcto.

\* Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais

### Sensibilidade e especificidade clínicas

A sensibilidade clínica do ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) foi determinada para 229 indivíduos com AR confirmada e a especificidade clínica foi determinada para 285 amostras sem AR (135 de pacientes com outros distúrbios reumáticos e não-reumáticos e 150 de indivíduos assintomáticos e aparentemente saudáveis). Utilizando um valor de corte de 5,0 U/ml, foi calculada uma sensibilidade de 78% com especificidade de 99%. Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.\*

Categoria da amostra	Total n	Positivo n	Sensibilidade %
AR	229	179	78

Categoria da amostra	Total n	Positivo n	Especificidade %
Total de amostras sem AR	285	4	98,6
Sem AR saudáveis e assintomáticos	150	1	99,3
Amostras de doentes mas sem AR <sup>+</sup>	135	3	97,8

<sup>+</sup> A especificidade clínica das 135 amostras de doentes com outros distúrbios reumáticos e não reumáticos encontra-se categorizada na seguinte tabela. \*

Amostras de doenças que não artrite reumatóide	Total n	Positivos n	Especificidade clínica
Total	135	3	97,8%
Poliartrite inflamatória	41	1	97,6%
Positivo para IgG de EBV	18	1	94,4%
Tireoidite de Hashimoto	17	0	100%
Síndrome de Sjögren	16	1	93,8%
Lupus eritematoso sistémico	16	0	100%
Vasculite	5	0	100%
Escleroderma	5	0	100%
Osteoartrite	4	0	100%
Doença de Crohn	3	0	100%
Fenómeno de Raynaud	3	0	100%
Colite ulcerosa	2	0	100%
Artrite psoriática	2	0	100%
Artrite reactiva	1	0	100%
Espondilite anquilosante e polimiosite	2	0	100%

\*Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais.

### Comparação de métodos

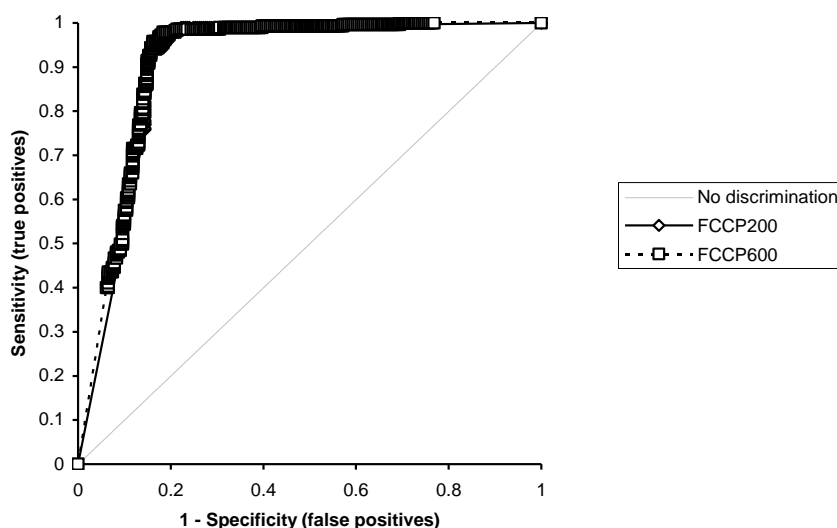
O ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) foi concebido para demonstrar uma concordância  $\geq 99\%$  para amostras com AR e sem AR, quando analisado relativamente a um ensaio comparável ao ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP200). As amostras com AR e sem AR descritas na secção de Sensibilidade e Especificidade Clínicas foram utilizadas para comparar o ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) com o ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP200). O valor de corte empregue para o ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP200) foi de 5,0 U/ml, conforme indicado no folheto informativo do fabricante. Utilizando um valor de corte de 5,0 U/ml para o ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP600), foi calculada uma concordância de 99%. Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.\*

Todas as amostras (514)		FCCP200	
		Positivo	Negativo
FCCP600	Positivo	179	4
	Negativo	1	330

Método de comparação	FCCP600 vs FCCP200
Número de amostras	65
Declive da linha de regressão	0,910
Intercepção sobre Y	1,226
Coefficiente de correlação	0,94

\*Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais.

Foi conduzida uma análise da característica operativa do receptor (Receiver Operator Characteristic ou ROC) utilizando os dados acima obtidos para os dois ensaios. A área sob a curva (AUC) para o ensaio anti-CCP Axis-Shield (FCCP600) foi de 0,910 (intervalo de confiança de 95%: 0,881-0,940) e 0,903 (intervalo de confiança de 95%: 0,871-0,934) para o ensaio anti-CCP Axis-Shield de comparação (FCCP200), indicando assim que ambos os ensaios são comparáveis relativamente à sua diferenciação clínica. A curva de análise da ROC é mostrada a seguir.\*



\*Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais.

### Precisão

Foi efectuado um estudo de acordo com as orientações do Documento EP5-A2 do CLSI (antigo NCCLS).<sup>24</sup> Foram testados dois controlos anti-CCP, seis membros do painel de CQ e uma amostra de soro humano, utilizando dois lotes de reagentes, em duplicado, em dois momentos diferentes por dia, durante 20 dias (n=80). Os dados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte como dados representativos (*arredondados à primeira casa decimal*):

Amostra	Kit Lote	n	Média (U/ml)	Dentro do teste		Entre testes		Entre dias		Total	
				DP	% de CV	DP	% de CV	DP	% de CV	DP	% de CV
Controlo 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
CQ 1	001	80	3,72	0,33	8,8	0,17	4,5	0,13	3,6	0,39	10,5
	003		3,92	0,23	5,8	0,35	8,9	0,04	1,1	0,42	10,7
CQ 2	001	80	8,17	0,34	4,2	0,72	8,8	0,00	0,0	0,80	9,8
	003		8,47	0,30	3,6	0,70	8,3	0,25	2,9	0,80	9,5
CQ 3	001	80	15,30	0,37	2,4	0,93	6,0	0,30	1,9	1,04	6,8
	003		15,98	0,36	2,2	0,92	5,8	0,00	0,0	0,99	6,2
CQ 4	001	80	53,55	2,30	4,3	3,19	6,0	1,71	3,2	4,29	8,0
	003		55,49	2,36	4,2	3,35	6,0	0,00	0,0	4,09	7,4
CQ 5	001	80	94,26	3,17	3,4	7,31	7,8	2,01	2,1	8,22	8,7
	003		97,15	2,61	2,7	5,56	5,7	4,79	4,9	7,79	8,0
CQ 6	001	80	134,77	4,58	3,4	5,84	4,3	5,74	4,3	9,38	7,0
	003		142,41	5,69	4,0	9,02	6,3	0,00	0,0	10,67	7,5
Controlo de referência	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
Amostra 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

\* Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais

### Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) determinado para o ensaio anti-CCP Axis-Shield, de acordo com o documento EP17-A<sup>25</sup> do CLSI (antigo NCCLS) foi de 1,04 U/ml\*.

As determinações do LOD foram efectuadas utilizando uma amostra anti-CCP negativa (60 replicados) e seis amostras com níveis baixos de anti-CCP (15 replicados cada).

\*Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais.

### Efeito de gancho de dose alta ("High Dose Hook")

O efeito de gancho de dose alta é um fenómeno em que amostras com níveis muito elevados podem ter leituras dentro do intervalo dinâmico do ensaio. Para o ensaio anti-CCP Axis-Shield não foi observado efeito de gancho de dose alta, quando uma amostra de aproximadamente de 3000 U/ml de anticorpo anti-CCP foi testada.\*

\*Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais.

## Interferência

O ensaio anti-CCP Axis-Shield foi concebido para, na presença dos seguintes compostos potencialmente interferentes, assumir um desvio máximo na concentração de anti-CCP de:

- $\pm 15\%$  para concentrações de anti-CCP  $\geq 10,0$  U/ml
- $\pm 10\%$  para concentrações de anti-CCP  $\geq 4,0$  U/ml a  $< 10,0$  U/ml
- $< 0,75$  U/ml para concentrações de anti-CCP  $< 4,0$  U/ml

Foi efectuado um estudo tendo por base as orientações do documento EP7-A2 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) <sup>26</sup> para o ensaio anti-CCP Axis-Shield. Seis amostras com níveis de anti-CCP, ao longo do intervalo de ensaio, foram suplementadas com os compostos potencialmente interferentes enunciados na tabela abaixo. O desvio máximo de concentração de anti-CCP observado nas amostras, durante estes estudos, oscilou entre:

- $-9,4\%$  e  $3,3\%$  para concentrações de anti-CCP  $\geq 10,0$  U/ml
- $-7,3\%$  e  $4,8\%$  para concentrações de anti-CCP  $\geq 4,0$  U/ml a  $< 10,0$  U/ml
- $-0,6$  U/ml e  $0,05$  U/ml para concentrações de anti-CCP  $< 4,0$  U/ml\*

Substância potencialmente interferente	Interferência não encontrada até à concentração seguinte
Hemoglobina	4 mg/ml
Bilirrubina	0,2 mg/ml
Triglicérido (solução intra-lipídica)	15 mg/ml
Factor reumatóide	200 IU/ml
Proteína total (gamaglobulinas)	120 mg/ml

\*Dados meramente representativos; os resultados podem ser diferentes destes dados em laboratórios individuais.

## LIMITAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

1. Embora a presença de anticorpos contra o CCP esteja associada a artrite reumatóide, um resultado positivo não constitui, por si só, um diagnóstico, pelo que os dados têm de ser considerados à luz de outros achados clínicos e laboratoriais.
2. Alguns indivíduos podem ter níveis elevados de anticorpos anti-CCP com evidência limitada ou ausente de doença clínica. Por outro lado, alguns pacientes com doença activa podem ter níveis indetectáveis destes anticorpos. A importância clínica desta informação é actualmente incerta.
3. Uma vez que o ensaio de anti-CCP não é prova diagnóstica da presença ou ausência de doença clínica, não deve ser iniciado tratamento com base apenas num resultado positivo para anti-CCP.
4. O início ou a modificação do tratamento não devem ser baseados em alterações na concentração de auto-anticorpos anti-CCP mas sim em observações clínicas.
5. A eficácia clínica da monitorização dos níveis de auto-anticorpos CCP como indicador de progressão/remissão de artrite reumatóide não foi estabelecida.
6. O valor do anti-CCP na artrite juvenil não foi determinado.
7. Em virtude das características específicas das interações antigénio/anticorpo, não é a concentração mas a actividade do anticorpo que é determinada. Uma vez que os soros de pacientes contêm populações de anticorpos heterogéneas, algumas amostras podem exibir não-linearidade, especialmente em diluições de amostras bastante elevadas.

## 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

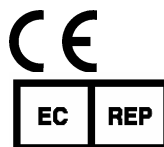
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, UK.

Tel: +44 (0) 1382 422000,

Fax: +44 (0) 1382 422088.

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

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*

**REF**

Número de catálogo

**LOT**

Lote



96 testes



Cuidado



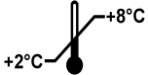
Consultar as instruções de utilização



Proteger da luz



Prazo de validade



Armazenar a 2-8°C

**Rx Only**

Apenas para utilização mediante receita médica



Fabricado por

**CONTROL +**

Controlo positivo

**CONTROL -**

Controlo negativo

**CONJ**

Conjugado

**SUBS**

Substrato

**SOLN STOP**

Solução de paragem

**BUF WASH 10 X**

Tampão de lavagem

**MTP 8 x 12**

Tiras (separáveis) de microtitulação

**SAMPLE DIL 5 X**

Diluyente de amostras

**CAL 1**

Calibrador 1

**CAL 2 - CAL 6**

Calibrador 2-6

**CONTROL REF**

Controlo de referência