



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

**Anti-CCP**

**IVD**



**REF FCCP600**

**Endast för yrkesmässig användning**



**Axis-Shield Diagnostics Limited**

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, Storbritannien

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

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

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

Testet Axis-Shield Anti-CCP är en semikvantitativ/kvalitativ enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) för detektion av IgG-klassen av autoantikroppar som är specifika för cyklisk citrullinerad peptid (CCP) i humanserum (inklusive serumseparationsrör (SST)) eller -plasma (EDTA, litiumheparin eller natriumcitrat). Detektion av antikroppar mot CCP används som ett hjälpmedel vid diagnos av reumatoid artrit (RA) (ledgångsreumatism), och ska användas tillsammans med annan klinisk information. Nivåer av autoantikroppar utgör en parameter i en diagnostisk process med flera kriterier som inbegriper både kliniska och laboratoriebaserade bedömningar. Endast för *in vitro*-diagnostisk användning.

## INLEDNING

Reumatoid artrit (RA) är en vanlig och systemisk autoimmunsjukdom som påverkar 0,5-1,0 % av den vuxna populationen. RA karakteriseras av kronisk inflammation av synovialmembranet vilket kan leda till progressiv leddestruktion och i många fall leda till invaliditet och en sämre livskvalitet.<sup>1</sup> Det är allmänt vedertaget att tidig intervention är nödvändig för att förhindra irreversibel leddskada och det är därför viktigt att diagnostisera RA så tidigt i sjukdomsförloppet som möjligt.<sup>2,3</sup> Diagnosen av RA baseras primärt på kliniska, radiologiska och immunologiska undersökningar. Det vanligaste serologiska testet är mätningen av reumafaktor (RF).<sup>4</sup> Även om RF-testet ger bra känslighet så är det inte specifikt för RA, eftersom den ofta förekommer hos friska individer och patienter med andra reumatiska eller inflammatoriska sjukdomar, autoimmuna sjukdomar eller kroniska infektioner.<sup>5</sup>

Under flera år har det varit känt att antikroppar mot antiperinukleär faktor (APF) och keratin (AKA) är mycket specifika för RA. Det rapporterades därefter att båda dessa antikroppar reagerade med nativt filaggrin och nu hänförs till antifilaggrin-antikroppar (AFA).<sup>6,7,8</sup> Senare bevis har påvisat att alla dessa antikroppar är riktade mot citrullinnehållande epitoper.<sup>9</sup> Citrullin är en icke-standardaminosyra, eftersom den inte inkorporeras i proteiner under proteinsyntes. Den kan emellertid genereras via posttranslationell modifiering av arginin av enzymet peptidylarginindeimineras (PAD).<sup>10</sup> År 1998 rapporterade Schellekens och kolleger att autoantikroppar som är reaktiva med linjära syntetiska peptider innehållande citrullin var mycket specifika för RA i en ELISA-baserad analys.<sup>11</sup> Efterföljande studier uppvisade att cykliska varianter av dessa linjära peptider, benämnda cykliska citrullinerade peptider (CCP), var lika specifika för RA men med högre känslighet än linjära peptider.<sup>12</sup> I ett försök att vidare förbättra känsligheten för CCP-testet undersöktes ett därför avsett bibliotek av citrullinnehållande peptider med RA-sera och en ny uppsättning av peptider (CCP2) upptäcktes, vilka gav överlägsen prestanda jämfört med CCP1-testet.<sup>13</sup> Under de senaste åren har många publicerade rapporter bekräftat den diagnostiserade prestandan för CCP2-testet.<sup>14</sup> Anti-CCP-antikroppar, vilka också ofta benämns anticitrullinerade protein-/peptidantikroppar (ACPA), har befunnits förekomma mycket tidigt under sjukdomen, ofta utan kliniska symtom och många rapporter påvisar att förhöjda nivåer av anti-CCP-antikroppar kan förutsäga utvecklingen av erosiv sjukdom.<sup>15,16,17,18,19,20</sup> Dessa resultat antyder en viktig roll för cykliska citrullinerade peptider vid diagnos av RA i ett tidigt stadium av sjukdomsförloppet.







År 2010 publicerades *ACR / EULAR Rheumatoid Arthritis Classification Criteria* och ersatte de "gamla" ACR-kriterierna från 1987 som allmänt ansågs vara olämpliga för tidig diagnos av RA. De reviderade klassificeringskriterierna, som även publicerades av American College of Rheumatology (ACR) och European League Against Rheumatism (EULAR), rekommenderade ett poängräkningssystem på mellan 0 och 10. De nya klassificeringskriterierna ska tillämpas för varje individ som uppvisar definitiv synovit (odifferentierad inflammatorisk artrit). De fyra ytterligare kriterierna var antalet påverkade leder, serologisk abnormitet, svar i akutfas och varaktighet för symtom i de påverkade lederna. I de serologiska kriterierna inkluderades för första gången mätning av ACPA, t.ex. anti-CCP, och viss definition av ett lågt positivt och högt positivt serologiskt resultat.<sup>21</sup>

Axis-Shield Anti-CCP-analysen är ELISA baserad på detektion av autoantikroppar i humanserum eller -plasma mot en syntetisk cyklisk peptid innehållande modifierade arginin-enheter (CCP2-peptider). Testet tillhandahåller ett ytterligare verktyg vid diagnos av patienter med RA.

## ANALYSPRINCIP

Brunnarna på mikrotiterremsan är belagda med en högt renad syntetisk cyklisk citrullinerad peptid innehållande modifierade arginin-enheter. Under den första inkubationen binder specifika autoantikroppar i spätt serum eller spädd plasma till den antigenbelagda ytan. Brunnarna tvättas sedan för att avlägsna obundna komponenter. Under den andra inkubationen binder konjugatet, en enzymmärkt polyklonal antikropp till human-IgG, till eventuella autoantikroppar bundna till ytan. Efter ytterligare tvättning spåras specifika autoantikroppar genom inkubation med substratet. Tillsats av stopplösning avbryter reaktionen, vilket resulterar i en färgad slutprodukt och mängden bundet konjugat mäts i absorptionsenheter. I det kvalitativa protokollet jämförs mängden konjugat som är bundet till provet med den mängd konjugat som är bundet till referenskontrollen. I det semikvantitativa protokollet kan koncentrationen av anti-CCP-autoantikropp uppskattas genom interpolering från en dos-responskurva baserad på kalibratorer.

## KOMPONENTER I SATSEN

<b>CONJ</b>	1 x 15,0 mL	Pepparrotsperoxid-märkt polyklonal getantikropp mot human-IgG, 0,1 % (viktprocent) p-hydroxyfenylättiksyra, 0,15 % (viktprocent) Proclin och 1 % proteinstabiliserande medel (bovint) (viktprocent) i en HEPES-buffert <b>Bruksfärdigt. OBS! VARNING</b>	
<b>SUBS</b>	1 x 15,0 mL	3,3',5,5'-tetrametylbensidin, buffertlösning <b>Bruksfärdigt.</b> Exponera inte för ljus vid förvaring. <b>OBS! VARNING</b>	 
<b>SOLN STOP</b>	1 x 15,0 mL	Svavelsyra 0,25 mol/L, vattenhaltig lösning <b>Bruksfärdigt. OBS! FARA</b>	
<b>BUF WASH 10 X</b>	3 x 25,0 mL	Fosfatbuffrad koksaltlösning, 1,3 % (volymprocent) Tween 20 <b>Späd före användning.</b>	
<b>MTP 8 x 12</b>	Mikrotiterrensa (avbrytbar) med 8 x 12 brunnar	Belagd med syntetisk cyklisk citrullinerad peptid, i en återförslutningsbar folieförpackning med torkmedel	
<b>SAMPLE DIL 5 X</b>	1 x 25,0 mL	Fosfatbuffert, proteinstabiliserande medel (bovint), 0,5 % (viktprocent) natriumazid <b>Späd före användning. OBS! FARA</b>	 
<b>CAL 1</b>	1 x 1,0 mL	Fosfatbuffert, proteinstabiliserande medel (bovint), <0,1 % (viktprocent) natriumazid 0 E/mL <b>Bruksfärdigt.</b>	
<b>CAL 2 - CAL 6</b>	5 x 1,0 mL	Humanplasma, fosfatbuffert, proteinstabiliserande medel (bovint), <0,1 % (viktprocent) natriumazid 2, 8, 30, 100, 300 E/mL <b>Bruksfärdigt.</b>	
<b>CONTROL REF</b>	1 x 1,5 mL	Humanplasma, buffert, <0,1 % (viktprocent) natriumazid <b>Bruksfärdigt.</b>	
<b>CONTROL +</b>	1 x 0,3 mL	Humanplasma, <0,1 % (viktprocent) natriumazid <b>Späd 1:100 med spätt provspädningsmedel före användning precis som för prover.</b>	
<b>CONTROL -</b>	1 x 0,3 mL		

# FÖRVARING AV REAGENSER

## Hållbarhet för öppen reagenssats

En reagenssats öppnades och återanvändes under tre tillfällen under en period på tre månader utan några negativa effekter på prestandan för reagenssatsen. Efter användning ska komponenterna förvaras vid 2–8°C.

## Anmärkningar om hantering och procedur

1. Förvara komponenterna i satsen vid 2–8 °C och använd dem före utgångsdatumet som är angivet på förpackningarna. Använd inte utgångna reagenser.
2. Blanda inte reagenser från olika partier.
3. Frys inte ned satserna.
4. Tvättbuffertkoncentrat, provspädningsmedelskoncentrat, positiv och negativ kontroll måste spädas före användning. Alla andra reagenser är bruksfärdiga.
5. Säkerställ att det inte sker någon mikrobiell kontamination av den spädda tvättbufferten och det spädda provspädningsmedlet och förvara dessa reagenser vid 2–8 °C mellan testerna.
6. Förvara överblivna (oanvända) mikrotiterremisor i folieförpackningen med torkmedel mellan tester. Säkerställ att förseglingen är hel och förvara vid 2–8 °C mellan användningar.
7. Exponera inte substratet för ljus vid förvaring.
8. Undvik kontamination av reagenser. Använd en ny pipettspets för engångsbruk för varje reagens eller prov.

## Tecken på försämring

Färgen på substratet ska vara färglös till mycket svagt blå. Grumlighet eller fällningar i en komponent påvisar försämring och komponenten ska kasseras.

Om kristaller syns i tvättbufferten eller provspädningsmedlet vid framtagning från kall förvaring ska du vända reagenserna upp och ned för att lösa upp kristallerna och låt reagenserna anta rumstemperatur.

## Provtagning och -förvaring


Analysen rekommenderas för prover av humanserum (inklusive serumseparationsrör (SST)) eller -plasma (EDTA, litiumheparin eller natriumcitrat). Andra rörtyper har inte testats för användning i analysen. Använd inte kraftigt hemolyserade eller grumliga prover. Blanda upptinade prover ordentligt före analysen och undvik upprepad nedfrysning/upptining. Värmeinaktivera inte proverna, eftersom det kan leda till falskt positiva resultat.

Följ provrörstillverkarens anvisningar för analysförberedning. Prover kan förvaras ospädda vid 2–8 °C i fyra veckor. För längre förvaring ska de förvaras vid –20 °C eller lägre. Prover spädda 1:100 i spätt provspädningsmedel måste användas inom 24 timmar efter spädning.






# VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

## Endast för *in vitro*-diagnostisk användning.

### Säkerhetsåtgärder

1. Följ noggrant anvisningarna i denna bruksanvisning, särskilt beträffande hanterings- och förvaringsförhållanden.
2.  Kalibratorer och kontroller innehåller humanplasma som testats med FDA-godkända analyser för HBsAg, HIV-1 RNA eller HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 och anti-HCV eller HCV RNA och befunnits vara icke-reaktiva/negativa. Eftersom inga kända tester helt kan garantera att smittämnen inte förekommer ska kalibratorer och kontroller anses vara potentiellt smittsamma och hanteras med samma försiktighetsåtgärder som för vilket annat potentiellt biofarligt material som helst. Godkända riktlinjer från Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections" (M29-A3 – tredje upplagan)<sup>22</sup> beskriver hur dessa material ska hanteras i enlighet med god laboratorised.
3. Pipettera inte med munnen.
4. Rök, ät, drick inte eller använd inte kosmetika i områden där reagenssats och prover hanteras.
5. Hudbesvär, skärsår, skrubbsår eller andra hudskador ska skyddas på ett lämpligt sätt.
6. Kalibratorer, kontroller och provspädningsmedelskoncentrat innehåller natriumazid som kan reagera med bly- eller kopparrörledningar och bilda högexplosiva metallazider. Spola med mycket vatten vid kassering för att förhindra ansamling av metallazider.
7. Materialsäkerhetsdatablad för alla farliga komponenter i denna sats finns tillgängliga på begäran från Axis-Shield Diagnostics

Observera: Enligt federal lag får denna enhet endast säljas av läkare eller på uppdrag av en läkare.

 Varning <b>Konjugat</b>	<u><b>Varning</b></u> H317 - <u><b>Förebyggande</b></u> P272 - P280 - P363 -	Kan orsaka allergisk hudreaktion. Nedstänkta arbetskläder får inte avlägsnas från arbetsplatsen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Nedstänkta kläder ska tvättas innan de används igen.
 Varning <b>Substrat</b>	<u><b>Varning</b></u> H302 - H312 - H315 - H319 - H332 - H335 - <u><b>Förebyggande</b></u> P260 - P280 - <u><b>Respons</b></u> P301+310 - P304+340 - P305+351+338 -	Skadligt vid förtäring. Skadligt vid hudkontakt. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Skadligt vid inandning. Kan orsaka irritation i luftvägarna. Inandas/intedam/ rö Kontakta genast/gaser/dimma /ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID FÖRTÄRING: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja
  Fara <b>Provspädningsmedel</b>	<u><b>Varning</b></u> H302 - H318 - H412 - EUH032 - <u><b>Förebyggande</b></u> P264 - P280 - <u><b>Respons</b></u> P301+310 - P305+351+338 - P330 -	Skadligt vid förtäring. Orsakar allvarliga ögonskador. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Tvätta händer grundligt efter anv ändning. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID FÖRTÄRING: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja Skölj munnen.
 Fara <b>Stopplösning</b>	<u><b>Varning</b></u> H314 - <u><b>Förebyggande</b></u> P260 - P273 - P280 - <u><b>Respons</b></u> P301+330+331 - P303+361+353 - P304+340 - P305+351+338 -	Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Inandas/intedam/ rö Kontakta genast/gaser/dimma /ångor/sprej. Undvik utsläpp till miljön. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning. VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten/duscha. VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

# FÖRBEREDNING

## Material/utrustning som krävs men som inte medföljer

1. Avläsare för platta/remsa med 96 brunnar med 450 nm filter.
2. Precisionspipetter för att dispensera 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatisk pipett för att dispensera 100 µL. Automatisk pipett för att dispensera 300 µL för manuell tvättning, automatisk platttvättare är valfri.
3. Mätglas av glas/plast: 1×100 mL, 1×500 mL.
4. Provrör på 1 mL.
5. Destillerat/avjoniserat vatten.
6. Pappershanddukar.
7. Tidtagare för 30 och 60 minuters intervall.

## Analysförberedning

Låt alla komponenter i satsen, inklusive mikrotiterremsona, värmas upp till 18–25 °C under 30–60 minuter före användning. Blanda reagenserna genom att vända dem försiktigt upp och ned.

### Späd inte referenskontrollen.

Späd följande reagenser och blanda ordentligt.

Reagens	Volym	Tillsätt
Tvättbuffertkoncentrat	1 flaska	225 mL destillerat/avjoniserat vatten
Provspädningsmedelskoncentrat	1 flaska	100 mL destillerat/avjoniserat vatten
Positiv och negativ kontroll/prover	10 µL	1 mL spätt provspädningsmedel

Beräkna antalet mikrotiterremсор som krävs för analysen och placera dem i hållaren för mikrotiterremсор. Lägg tillbaka oanvända remсор i den återförslutningsbara folieförpackningen med torkmedel och förvara vid 2–8 °C tills de ska användas. Säkerställ att alla remсор är säkert placerade inom hållaren för mikrotiterremсор. Användare kan numrera varje remsa längs den övre kanten för att underlätta identifiering. Behåll hållaren för mikrotiterremсор för senare användning.

# ANALYS PROTOKOLL

**Kvalitativt protokoll:** analysreferenskontroll, positiv och negativ kontroll samt prover.

**Semikvantitativt protokoll:** analyskalibratorer (1–6), positiv och negativ kontroll samt prover.

1. Referensbrunnar för identifiering.
2. Pipettera 100 µL referenskontroll/kalibratorer och förspädda (1:100) positiva och negativa kontroller i duplikat i lämpliga brunnar. Pipettera 100 µL förspädda (1:100) patientprover antingen enkelt eller i duplikat i lämpliga brunnar. Det rekommenderas att prover analyseras i duplikat men det är valfritt enligt lokala laboratoriebestämmelser. Detta steg får inte överskrida **10 minuter** för någon uppsättning av kalibratorer/kontroller/prover.
3. Inkubera 60 ± 10 minuter vid 18–25 °C.
4. Dekantera innehållet på remsan genom att snabbt vända den upp och ned över en vask som är lämplig för kassering av biologiska material och tänk på den potentiella smittorisken från proverna. Torka av dekanterade remсор med pappershanddukar.
5. Tvätta brunnarna **fyra gånger** med minst 300 µL spädd tvättbuffert. **Dekantera och torka av efter varje tvättsteg.**
6. Tillsätt 100 µL konjugat till varje brunn.
7. Inkubera 30 ± 5 minuter vid 18–25 °C.
8. Upprepa steg 4 och 5.
9. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
10. Inkubera 30 ± 5 minuter vid 18–25 °C. **Dekantera inte.**
11. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn i samma ordning och hastighet som för tillsatsen av substrat. Knacka försiktigt på brunnarna för att blanda om och säkerställ att det inte finns några synliga bubblor.
12. Avläs remсорna vid 450 nm.
13. Avläs analysen inom 60 minuter efter slutförande av testet.

# BERÄKNING OCH TOLKNING AV RESULTAT

Beakta varje analys separat vid beräkning och tolkning av resultat.

## Kvalitativt protokoll

Beräkna kvoten mellan medelvärdet av absorbansvärden (optisk densitet) för den positiva kontrollen, den negativa kontrollen, för varje (medelvärde) prov och medelvärdet av referenskontrollens absorbansvärde:

$$\text{Absorbanskvot} = \frac{\text{Absorbansvärde för kontroll, medelvärde}}{\text{Absorbansvärde för referenskontroll, medelvärde}}$$

$$\text{Absorbanskvot} = \frac{\text{Absorbansvärde för prov, medelvärde}}{\text{Absorbansvärde för referenskontroll, medelvärde}}$$

Användare ska beräkna ett gränsvärde ("cutoff") mellan positiva och negativa prover som är specifikt för tillämpliga patientpopulationer. Resultat från patientpopulationerna som användes i Axis-Shields kliniska prövning antyder följande gränsvärde:

<u>Absorbanskvot</u>	<u>Tolkning av resultat</u>
< 0,95	Negativ
≥ 0,95 till ≤ 1,0	Gräns – rekommendation för upprepad testning
> 1,0	Positiv

## Semikvantitativt protokoll

Rita en kurva med medelabsorbansvärdet för varje kalibrator mot  $\log_{10}$  för kalibratorkoncentration (se följande tabell) på lämpligt grafpapper. Medelvärdskoncentrationer av positiva och negativa kontroller och prover (medelvärde) kan sedan avläsas från kalibreringskurvan. En typisk kalibreringskurva visas nedan som referens men den får inte användas vid tolkning av resultat. Kurvanpassningar som 4-parameters logistisk (4PL) anpassning och kubisk "spline" är tillfredsställande. Andra kurvanpassningsmodeller rekommenderas inte.

Prov med absorbansvärden över kalibrator 6 (300 E/mL) ligger utanför analysens intervall och bör rapporteras som > 300 E/mL, spätt och omanalyserat, korrigerat för den ytterligare spädningsfaktorn.

För tolkning av semikvantitativa resultat och baserat på populationsdata från Axis-Shield referenspopulation\* föreslås följande:

<u>Provresultat, (medelvärde)</u>	<u>Tolkning av resultat</u>
≤ 5 E/mL	Negativ
> 5 E/mL	Positivt

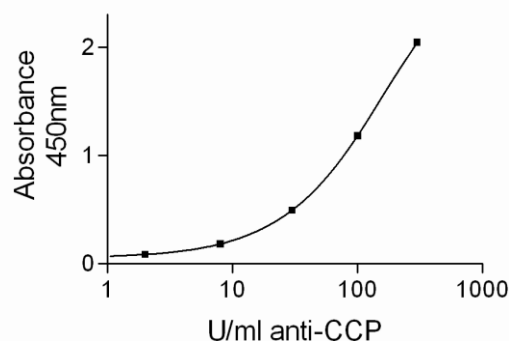
\*Detta är bara en riktlinje. Användare bör fastställa ett referensintervall, som kan vara unikt för populationen.

OBS! Precis som i vilken analys som helst som mäter antikroppar bestämmer denna analys aktiviteten, snarare än koncentrationen, av antikroppen som förekommer i provet. Aktivitet kan påverkas av ett antal parametrar, t.ex. antikropsaviditet.

## Kalibratorkoncentrationer

Kalibratorkoncentrationer	Koncentration E/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

## Typisk kalibreringskurva



## KVALITETSKONTROLL

Säkerställ att tillräckligt underhåll och kalibrering utförs för plattavläsaren enligt tillverkarens anvisningar och att korrekt våglängd används.

Användare bör säkerställa att de är fullständigt bekanta med anvisningarna för analysen, särskilt avsnittet om varningar och försiktighetsåtgärder samt anmärkningar om hantering och användning. Användare ska visa att de kan erhålla prestandaspecifikationer för precision och rapporterbart intervall för testresultat jämfört med de som fastställts av tillverkaren innan de rapporterar patienttestresultat. Det rekommenderas att den förspädda positiva och negativa kontrollen körs dubbelt i alla analyser för att övervaka kvaliteten av testproceduren. Kör den bruksfärdiga referenskontrollen dubbelt i alla kvalitativa analyser.

Om någon kontroll inte överensstämmer med kontrollkvotspecifikationerna nedan, förutsatt att precisionsspecifikationerna som beskrivs av tillverkaren följs, ska analysen anses vara ogiltig och patientresultat ska inte rapporteras. Användaren kan upprepa analysen efter att ha granskat proceduren eller kontakta leverantören/tillverkaren. Bered en färsk spädning av varje kontroll och prov vid upprepning av analysen. Laboratorier kan vilja inkludera interna kontroller i varje analyskörning. Förvara kontrollmaterial vid högst -20 °C och undvik upprepad nedfrysning och upptining. Konserveringsmedel som natriumazid vid 0,1 % (vikt/volym) påverkar inte provresultat.

Nivåer av analyter som identifierats vid särskilda sjukdomar är de som fastställts av tillverkaren för specifika populationer och avspeglar kanske inte information i referenslitteraturen. Incidensnivåer och deras relation till specifika sjukdomar, referensintervall och lämpliga gränsvärden ska alla beräknas för de specifika populationerna som är tillämpliga för användare.

### Kontrollkvotspecifikationer

Protokoll	Specifikationer
Kvalitativt (kvoter)	$\frac{\text{Absorbansvärde för positiv kontroll}}{\text{Absorbansvärde för referenskontroll}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Absorbansvärde för negativ kontroll}}{\text{Absorbansvärde för referenskontroll}} < 0,95$
Semikvantitativt	Se flasketikett för positiv kontroll för godkänt förväntat intervall (E/mL)
	Koncentration av negativ kontroll < 2 E/mL

## FÖRVÄNTADE VÄRDEN

200 serumprover från asymtomatiska synbart friska givare i åldersintervallet 18–72 år, bestående av ett ungefärligt lika antal män [n = 105] och kvinnor [n = 95], testades med en Axis-Shield Anti-CCP-analys (FCCP200).

Inga skillnader som anses bero på kön och ålder påvisades (beräknat med jämförelse av åldersintervall på ≤40 år [n = 115] och >40 år [n = 85]).

Den totala anti-CCP-medelkoncentrationen för denna population var  $0,63 \pm 0,419$  E/mL (intervall 0,05–3,8 E/mL).

Utgående från data för denna referenspopulation och data för en klinisk population är analysens föreslagna gränsvärde:

<i>Referensintervall</i> ≤ 5 E/mL = negativt > 5 E/mL = positivt
--

Detta referensintervall föreslås endast som en riktlinje och varje laboratorium bör fastställa ett referensintervall som kan vara unikt för populationen i fråga beroende på geografiskt läge, patient, diet, miljöfaktorer eller klinisk praxis. Observera att reumatoid artrit är dubbelt så vanligt hos kvinnor som hos män.

## PRESTANDA DATA

### Spädningslinjäritet

Axis-Shield Anti-CCP-analysen är utformad för att vara linjär över mätintervallet från detektionsgränsen (LOD) till 300 E/mL.

Baserat på en studie utförd enligt CLSI-dokument EP6-A<sup>23</sup> uppvisade Axis-Shield Anti-CCP-analysen linjäritet från 1,04 E/mL till 300 E/mL.\*

\* Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

Prover > 300 E/mL uppvisar medelutbyte på ≤ 100 % ± 15 %\* av förväntat resultat vid spädning till analysintervallet och användning av korrekt spädningsfaktor.

\* Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.



### Klinisk känslighet och specificitet

Den kliniska känsligheten för Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) fastställdes för 229 bekräftade RA-individer och klinisk specificitet fastställdes för 285 icke-RA-prover (135 från patienter med andra reumatiska och icke-reumatiska sjukdomar och 150 från asymtomatiska synbart friska individer). Med ett gränsvärde på 5,0 E/mL beräknades känsligheten vara 78 % med en specificitet på 99 %. Resultaten sammanfattas i följande tabeller.\*

Provkategori	Totalt n	Positivt n	% känslighet
RA	229	179	78

Provkategori	Totalt n	Positivt n	% specificitet
Icke-RA-prover, totalt	285	4	98,6
Icke-RA, friska asymtomatiska	150	1	99,3
Icke-RA-sjukdomsprover <sup>+</sup>	135	3	97,8

\*Klinisk specificitet för 135 prov från patienter med andra reumatiska och icke-reumatiska sjukdomar kategoriseras i nedanstående tabell.\*

Prover, icke-reumatiska sjukdomar	Totalt n	Positivt n	Klinisk specificitet
Totalt	135	3	97,8%
Inflammatorisk polyartrit	41	1	97,6 %
EBV IgG-positiv	18	1	94,4 %
Hashimotos thyreoidit	17	0	100 %
Sjögrens syndrom	16	1	93,8 %
Systemisk lupus erythmatosus	16	0	100 %
Vaskulit	5	0	100 %
Sklerodermi	5	0	100 %
Osteoartrit	4	0	100 %
Crohns sjukdom	3	0	100 %
Raynauds fenomen	3	0	100 %
Ulcerös kolit	2	0	100 %
Psoriasisartrit	2	0	100 %
Reaktiv artrit	1	0	100 %
Ankyloserande spondylit och polymyositis	2	0	100 %

\*Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

### Metodjämförelse

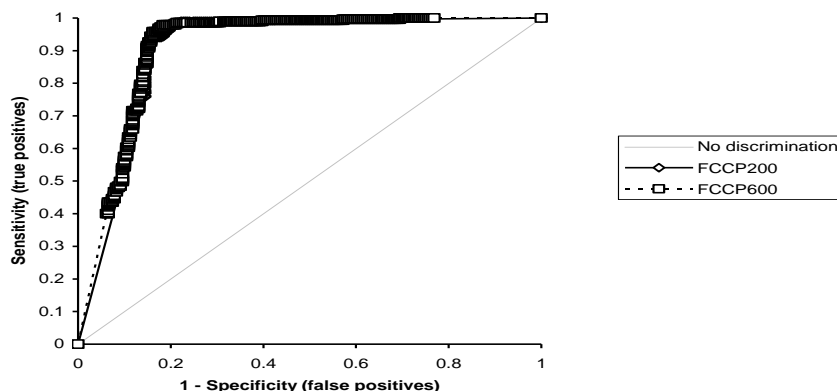
Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) är utformad för att ha en samstämmighet på  $\geq 99$  % för RA- och icke-RA-prover vid jämförelse med en jämförande Axis-Shield Anti-CCP-analys (FCCP200). RA- och icke-RA-prover som beskrivs i avsnittet om klinisk känslighet och specificitet användes för att jämföra Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) med Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200). Gränsvärdet för Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200) var 5,0 E/mL, enligt tillverkarens bipacksedel. Med ett gränsvärde på 5,0 E/mL för Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) beräknades samstämmigheten vara 99 %. Resultaten sammanfattas i följande tabeller.\*

Alla prover (514)		FCCP200	
		Positivt	Negativt
FCCP600	Positivt	179	4
	Negativt	1	330

Jämförelsemetod	FCCP600 kontra FCCP200
Antal prover	65
Regressionslinjens lutning	0,910
Y-skärningspunkt	1,226
Korrelationskoefficient	0,94

\*Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

En ROC-analys (Receiver Operator Characteristic) utfördes med användning av ovanstående data för de två analyserna. Arealen under kurvan för Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP600) var 0,910 (95 % konfidensintervall: 0,881–0,940) och 0,903 (95 % konfidensintervall: 0,871–0,934) för den jämförande Axis-Shield Anti-CCP-analysen (FCCP200), vilket anger att de båda analyserna är jämförbara med avseende på klinisk differentiering. ROC-analyskurvan visas nedan.\*



\*Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

### Precision

En studie utfördes enligt CLSI (tidigare NCCLS)-dokument EP5-A2.<sup>24</sup> Två anti-CCP-kontroller, sex QC-panelmedlemmar och ett humanserumprov analyserades med användning av två reagenspartier, i replikat på två, vid två olika tidpunkter per dag i 20 dagar (n = 80). Data från denna studie sammanfattas i följande tabell som representativa data (avrundade till 1 decimal):

Prov	Sats-Parti	n	Medelvärde (E/mL)	Inom körningar		Mellan körningar		Mellan dagar		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
Referens-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
Prov 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

\* Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

### **Detektionsgräns**

Detektionsgräns (LOD) för Axis-Shield Anti-CCP-analysen enligt CLSI (tidigare NCCLS)-dokument EP17-A<sup>25</sup> befanns vara 1,04 E/mL\*.

Bestämningar av detektionsgräns utfördes med användning av ett negativt anti-CCP-prov (60 replikat) och sex anti-CCP-prover på låg nivå (15 replikat vardera).

\*Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

### **Hook-effekt**

Hook-effekt är ett fenomen då prover på mycket hög nivå kan avläsas inom analysens dynamiska intervall. För Axis-Shield Anti-CCP-analysen upptäcktes ingen Hook-effekt när ett prov innehållande cirka 3 000 E/mL av anti-CCP-antikropp analyserades.\*

\*Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

### **Interferens**

Axis-Shield Anti-CCP-analysen är utformad för att ha en maximal avvikelse i anti-CCP-koncentration från följande potentiellt interfererande ämnen inom:

- $\pm 15\%$  för anti-CCP-koncentrationer  $\geq 10,0$  E/mL
- $\pm 10\%$  för anti-CCP-koncentrationer  $\geq 4,0$  E/mL till  $< 10,0$  E/mL
- $< 0,75$  E/mL för anti-CCP-koncentrationer  $< 4,0$  E/mL

En studie utfördes baserad på riktlinjer i CLSI-dokument EP7-A2<sup>26</sup> för Axis-Shield Anti-CCP-analysen. Sex prover med anti-CCP-nivåer över analysintervallet tillsattes de potentiellt interfererande ämnena som anges i tabellen nedan. Den maximala avvikelsen av anti-CCP-koncentration som observerades i prover under dessa studier var:

- $-9,4\%$  till  $3,3\%$  för anti-CCP-koncentrationer  $\geq 10,0$  E/mL
- $-7,3\%$  till  $4,8\%$  för anti-CCP-koncentrationer  $\geq 4,0$  E/mL till  $< 10,0$  E/mL
- $-0,6$  E/mL till  $0,05$  E/mL för anti-CCP-koncentrationer  $< 4,0$  E/mL\*

<b>Potentiellt interfererande ämne</b>	<b>Ingen interferens upp till följande koncentration</b>
Hemoglobin	4 mg/mL
Bilirubin	0,2 mg/mL
Triglycerid (Intralipid-lösning)	15 mg/mL
Reumafaktor	200 IE/mL
Totalprotein (gammaglobuliner)	120 mg/mL

\*Representativa data, resultat för enskilda laboratorier kan variera.

## **ANVÄNDNINGSBEGRÄNSNINGAR**

1. Även om förekomsten av antikroppar mot CCP förknippas med reumatoid artrit är ett positivt resultat inte diagnostiskt i sig själv, utan data måste beaktas utifrån andra kliniska resultat och laboratorieresultat.
2. Vissa individer kan ha höga nivåer av anti-CCP-antikroppar med få eller inga tecken på klinisk sjukdom. Omvänt kan vissa patienter med aktiv sjukdom ha odetekterbara nivåer av dessa antikroppar. Den kliniska betydelsen av denna information är okänd för närvarande.
3. Som ett resultat av att en anti-CCP-analys inte är diagnostiskt bevis på förekomst eller frånvaro av klinisk sjukdom ska en behandling inte påbörjas baserat på endast ett positivt anti-CCP-resultat.
4. Påbörjan eller ändring av en behandling ska inte baseras på ändringar av koncentrationen av anti-CCP-autoantikropp utan snarare på klinisk observation.
5. Den kliniska effekten av övervakning av CCP-autoantikropps-nivåer som en indikation på progression/remission av reumatoid artrit har inte definierats.
6. Värdet av anti-CCP vid juvenil artrit har inte fastställts.
7. På grund av specifika egenskaper av antigen-/antikroppsinteraktioner är det inte antikroppens koncentration som bestäms, utan snarare aktiviteten. Eftersom patientsera innehåller heterogena antikroppspopulationer kan vissa prover uppvisa icke-linjäritet, särskilt vid mycket höga provspädningar.

## REFERENSER

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

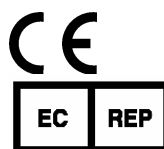
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, UK.

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**

Medicinsk utrustning för *in vitro*-diagnostik

**REF**

Katalognummer

**LOT**

Parti



96 tester



Varning



Läs bruksanvisningen



Skydda mot ljus



Utgångsdatum



Förvara vid 2–8 °C

**Rx Only**

Används endast vid förskrivning



Tillverkad av

**CONTROL +**

Positiv kontroll

**CONTROL -**

Negativ kontroll

**CONJ**

Konjugat

**SUBS**

Substrat

**SOLN STOP**

Stopplösning

**BUF WASH 10 X**

Tvättbuffert

**MTP 8 x 12**

Mikrotiterrensa (avbrytbar)

**SAMPLE DIL 5 X**

Provspädningsmedel

**CAL 1**

Kalibrator 1

**CAL 2 - CAL 6**

Kalibrator 2–6

**CONTROL REF**

Referenskontroll