

EDIA™ Anti-CCP

**For professional use only
Usage réservé aux professionnels
Sólo para uso profesional
Nur für den Fachgebrauch
Solo per uso professionale**



Document No. E-23-0181-05
December, 2013

EDIA™ Anti-CCP

English: page.....2
Français: page.....16
Español: página.....30
Deutsch: Seite44
Italiano: pagina.....58

ENGLISH: INTENDED USE

The EDIA™ Anti-CCP test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and semi-quantitation of IgG antibodies to Cyclic Citrullinated Peptides (CCP) in human serum or plasma. The assay is used to detect antibodies in a single specimen. The results of the assay are to be used as an aid to the diagnosis of Rheumatoid Arthritis (RA), in conjunction with other laboratory and clinical findings. The analysis should be performed by trained laboratory professionals. For in vitro diagnostic use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Rheumatoid Arthritis (RA) is one of the most common systemic autoimmune diseases. The aetiology of the disease, which affects up to 1-2% of the world population, is unknown. The diagnosis of RA depends primarily on clinical manifestation of the disease. The only serological test routinely used is the determination of the presence of rheumatoid factors (RF) in the serum. RF are antibodies directed to the constant region of immunoglobulins of the IgG class. However, these antibodies are also present in relatively high percentages in other autoimmune diseases, infections and in up to 15% of healthy individuals.





Antibodies of a more specific nature have also been found in sera of RA patients (see (1) for an overview). Anti-perinuclear factor (APF) antibodies are reported to be present in around 50% of RA patients with a specificity of over 70% (2). A number of cyclic synthetic peptides not related to filaggrin or other known proteins have been described which are specifically recognized by autoantibodies in sera from RA patients (3). These peptides were subsequently used in an ELISA for the detection of RA-specific autoantibodies (3). Clinical evaluation studies showed that the ELISA was positive in a significant number of well-defined RA patient sera with a high specificity against disease controls (3-8). A diagnostic and prognostic value for the measurement of the anti Cyclic Citrullinated Peptides (anti-CCP) antibodies was found in relation to joint involvement and radiological damage in early RA (7, 9-14). The EDIA™ anti-CCP assay offered by Euro Diagnostica is based on highly purified synthetic peptides containing citrulline residues and is an additional tool in the diagnosis of RA. This anti-CCP kit contains improved synthetic peptides selected on the basis of performance in the detection of RA autoantibodies (8-14).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The EDIA™ anti-CCP antibody kit is based on an ELISA method. The test utilizes microtitre wells coated with citrullinated synthetic peptides (antigen). Diluted patient serum or plasma is applied to the wells and incubated. If specific antibodies are present, they will bind to the antigen in the wells. Unbound material is washed away and any bound antibody is detected by adding alkaline phosphatase labelled antibodies to human IgG, followed by a second washing step and incubation with a chromogenic substrate.

The presence of reacting antibodies will result in the development of colour, which is proportional to the quantity of bound antibody, and this is determined photometrically.

KIT COMPONENTS

A	IgG Conjugate	1 x 15 mL	Alkaline phosphatase-labelled goat polyclonal antibody to human IgG, Tris buffer, protein stabiliser, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
B	Substrate	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage.	
C	Stop solution	1 x 15 mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH>10). Ready-to-use.	
D	Wash Buffer Concentrate (16x)	2 x 25 mL	Borate buffer, 0.4% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
E	CCP-Coated Wells in a Frame	96 wells	Coated with CCP-antigen, in a resealable foil pack with desiccant.	
F	Sample diluent concentrate (5x)	1 x 25 mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
1-6	Anti-CCP Calibrators	6 x 1.0 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. 0, 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Ready-to-use.	
7	Anti-CCP Reference Control	1 x 1.5 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
+/-	Positive Control Negative Control	1 x 1.5 mL 1 x 1.5 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
	Instruction for use (IFU)			

STORAGE OF REAGENTS

Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2-8° C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. Do not freeze kits.
4. Wash Buffer Concentrate and Sample Diluent Concentrate must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
5. Diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent are stable at 2-8° C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
6. Replace surplus microtitre wells in the foil pack and store within the resealable aluminium foil bag with the desiccant at 2-8° C, until required.
7. Do not expose Substrate to light during storage.
8. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.
9. Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting and washing throughout the procedure are necessary to maintain precision and accuracy.

Indications of Deterioration

The Substrate should be pale yellow in colour. Pink colouring indicates contamination and the reagent must be discarded. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded.

Sample Collection and Storage

The assay is recommended for serum/plasma (EDTA and Heparin) samples; do not use grossly haemolysed lipaemic or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Store samples for a maximum of 48 hours at 4-8° C. For prolonged storage freeze samples at -20° C.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

**For in vitro diagnostic use only.
Safety Precautions**

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. Controls and calibrators contain serum of human origin. Although tested against and confirmed negative for HIV 1+2, HCV, HbsAg and HIV-1 Ag, this material must be treated as potentially infectious. - The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommended that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Calibrators, Controls, Conjugate, Sample Diluent Concentrate and Wash Buffer Concentrate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.
7. The Stop Solution contains sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped up with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.
8. The substrate contains PMP, Bronidox L and Diethanolamine. Avoid contact with skin, eyes and respiratory system. If contact with skin, eyes or respiratory system occurs, rinse with water and seek medical advice.
9. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.



Warning

B.

SUBS

Contains: Diethanolamine

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Causes serious eye irritation. |
| P264: | Wash hands thoroughly after handling. |
| P280: | Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. |
| P305+P351+P338: | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |
| P337+P313: | If eye irritation persists: Get medical advice/attention. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Warning

Contains: Sodium hydroxide

- H315: Causes skin irritation.
 H319: Causes serious eye irritation.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
 P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
 P332+P313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
 P337+P313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Warning

Contains: Sodium azide

- H302: Harmful if swallowed.
 EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.
 H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
 P273: Avoid release to the environment.

PREPARATION

Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 550nm filter (540-565nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10 μ L, 100 μ L, 1 mL. Automatic pipette to dispense 100 μ L. Automatic pipette to dispense 200 μ L for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1 \times 100 mL, 1 \times 400 mL.
4. 1 mL volume containers.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. Timer for 30 and 60 minute intervals.

Preparation for the Assay

Before use, bring all kit components, including the microtitre wells, to room temperature (18-25° C)
Mix reagents by gentle inversion.

Do not dilute Reference, Positive and Negative Controls.

Dilute the following reagents and samples and mix thoroughly.

Reagent	Volume	Add
Wash Buffer Concentrate	1 vial	375 mL distilled/deionised water
Sample Diluent Concentrate	1 vial	100 mL distilled/deionised water

Sample	Volume	Add
Sample	10 µL	1 mL diluted Sample Diluent

Calculate the number of microtitre wells required for the current assay, and retain these in the microtitre frame. Return surplus wells to the foil pack with desiccant, and store at 2-8° C until required. Ensure that all wells are securely held within the microtitre frame, with the assay identification tab along the bottom edge below row H.

ASSAY PROTOCOL

Qualitative protocol: run Reference Control, Positive and Negative Controls, and samples.

Semi-quantitative protocol: run Calibrators (1-6), Positive and Negative Controls, and samples.

- Reference wells for identification.
- Pipette 100 µL Reference, Positive and Negative Controls/Calibrators in duplicate, and pre-diluted (1:101) patient samples into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed 15 minutes for any one set of Calibrators/Controls/samples.
- Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
- Decant well contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted wells with paper towels.
- Wash wells **three times** with a minimum of 200 µL diluted Wash buffer. **Decant and blot after each wash step.**
- Add 100 µL Conjugate to each well.
- Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
- Repeat steps 4 and 5.
- Add 100 µL Substrate to each well.
- Incubate 30±5 minutes at 18-25° C. **Do not decant.**
- Add 100 µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
- Read wells within 24 hours at 550nm (540-565nm)

CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

Consider each assay separately when calculating and interpreting results.

Qualitative protocol

Calculate the absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample.

$$\text{Absorbance Ratio} = \frac{\text{Sample or Control Absorbance Value}}{\text{mean Reference Control Absorbance Value}}$$

Users should calculate a cut-off between positive and negative samples that is specific to their patient populations. Results from the patient populations used in the Euro Diagnostica clinical trial suggest the following cut-off:

<u>Absorbance Ratio</u>	<u>Results Interpretation</u>
<0.95	Negative
≥0.95 to ≤1.0	Borderline - recommend repeat testing
>1.0	Positive

Semi-quantitative protocol

Plot the mean absorbance value of each Calibrator against log₁₀ concentration (see following table) on suitable graph paper. Concentrations of Controls and samples can then be read from the calibration curve; a typical plot employing 4-parameter logistic (4PL) is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results. Samples with absorbances above Calibrator 6 (300 U/mL) are outside the range of the assay, and should be reported as >300U/mL or diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

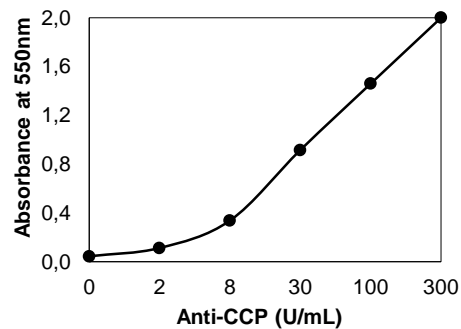
Note: As in any assay measuring antibodies, this assay determines the activity of the antibody present in the sample, rather than the concentration. Activity can be affected by a number of parameters, such as antibody avidity.

Samples with results ≤5 U/mL are defined as negative. Samples >5 U/mL are defined as positive.

Calibrator Concentrations

Calibrator Number	Concentration U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Typical Standard Curve



QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes.

Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. It is recommended that the pre-diluted Positive and Negative Controls are run in duplicate in all assays to monitor the quality of the test procedure. Run the ready-to-use Reference Control in duplicate in all qualitative assays.

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of any Control to meet the Control ratio specifications below renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed the procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of the sample. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below - 20° C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Preservatives such as sodium azide at 0.1% (w/v) will not affect sample results.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature. Incidence levels, their relationship for specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

Control Ratio Specifications

Protocol	Specifications
Qualitative (ratios)	$\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$ See Positive Control label
	$\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$ <0.95
Semi- quantitative	See Positive Control label for acceptable expected range (U/mL)
	Negative Control concentration < 3 U/mL

EXPECTED VALUES

The EDIA™ anti-CCP ELISA measures antibodies against synthetic peptides with citrulline residues (anti-CCP). The EDIA™ anti-CCP ELISA is calibrated in the semi-quantitative assay in arbitrary units using a positive patient serum pool as calibrator. The calibration curve ranges from 0-300 U/mL. These values have been chosen arbitrarily by Euro Diagnostica since no generally recognised (inter)national standard exists for expressing the titre of anti-CCP antibodies. The specificity and sensitivity were evaluated with 416 RA patients, 531 diseased non-RA patients (including other autoimmune, a range of inflammatory and infectious diseases) and 262 healthy controls, samples from adult subjects. The sensitivity was 76%. The specificity was 98% with diseased non-RA patients and 99% with apparently healthy individuals.

To determine the cut-off level, a Receiver Operator Characteristic (ROC) analysis was performed. The analysis revealed a point with the lowest possible sum of false-positives and false-negative samples and the cut-off was accordingly set at 5 U/mL.

Reference Range
 $\leq 5 \text{ U/mL} = \text{Negative}$
 $> 5 \text{ U/mL} = \text{Positive}$

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Table 1. Percent agreement of the EDIA™ anti-CCP compared to an alternative anti-CCP ELISA. A total of 678 frozen retrospective sera were assayed. 416 samples from RA patients and 262 samples were from apparently healthy blood donors.

EDIA™ anti-CCP		Alternative ELISA		
		Positive	Negative	Total
	Positive	317	2	319
	Negative	5	354	359
	Total	322	356	678

Positive Percent Agreement: $317/322 = 98.4\%$ 95% CI = 96.4 - 99.5%
 Negative Percent Agreement: $354/356 = 99.4\%$ 95% CI = 98.0 - 99.9%
 Overall Percent Agreement: $671/678 = 99.0\%$ 95% CI = 97.9 - 99.6%

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

Table 2. Clinical sensitivity and specificity. A total of 1209 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results.

	n	negative	positive
Blood donors	262	260	2
RA	416	99	317
Infectious diseases	86	85	1
Inflammatory diseases (nonRA)	445	437	8
TOTAL	1209	881	328

(Data on file)

Clinical sensitivity

RA $317/416 = 76.2\%$ 95% CI = 72.1 - 80.3%

Clinical specificity

Blood donors $260/262 = 99.2\%$ 95% CI = 97.3 - 99.9%
 Infectious diseases $85/86 = 98.8\%$ 95% CI = 93.7 - 100%
 Inflammatory diseases (nonRA) $437/445 = 98.2\%$ 95% CI = 96.5 - 99.2%
 Combined non-RA groups $782/793 = 98.6\%$ 95% CI = 97.5 - 99.3%

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

Table 3. Intra-assay precision was determined by testing six different samples eight times each.

	High (U/mL)	Medium (U/mL)	Low (U/mL)
Mean	173.9	34.0	9.9
S.D.	13.8	0.6	0.2
% C.V.	7.9	1.9	2.1
	Low (U/mL)	Low (U/mL)	Low (U/mL)
Mean	11.8	7.8	9.7
S.D.	0.5	0.1	0.4
%C.V.	4.0	1.9	4.4

Table 4. Inter-assay precision was determined by testing six different samples eight times each. Results were obtained for three different runs.

	High (U/mL)	Medium (U/mL)	Low (U/mL)
Mean.	183.8	36.6	9.3
S.D.	19.5	3.0	0.9
% C.V.	10.6	8.2	9.8
	Low (U/mL)	Low (U/mL)	Low (U/mL)
Mean	11.9	7.8	10.6
S.D.	0.8	0.7	0.9
%C.V.	6.3	9.5	8.9

Table 5. Batch to batch variation was determined by testing six different samples eight times each. Results were obtained for three different batches.

	High (U/mL)	Medium (U/mL)	Low (U/mL)
Mean	232.5	41.6	11.5
S.D.	30.9	4.5	1.3
% C.V.	13.3	10.8	11.2
	Low (U/mL)	Low (U/mL)	Low (U/mL)
Mean	14.1	9.8	13.0
S.D.	1.2	1.0	1.2
%C.V.	8.3	10.4	9.3

Table 6. Dilution recovery was determined by testing five serial dilutions of three different patient samples.

Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution Corrected % Recovery
1	1/100	205.0	205.0	100
	1/200	110.5	102.5	108
	1/400	47.3	51.3	92
	1/800	24.8	25.6	97
	1/1600	10.8	12.8	84
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution corrected % recovery
2	1/100	138.9	138.9	100
	1/200	70.3	69.5	101
	1/400	40.4	34.7	116
	1/800	18.3	17.4	105
	1/1600	8.7	8.7	100
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (U/mL)	Calculated Concentration (U/mL)	Dilution corrected % recovery
3	1/100	47.3	47.3	100
	1/200	26.7	23.6	113
	1/400	13.0	11.8	110
	1/800	6.3	5.9	107
	1/1600	3.0	3.0	103

Detection Limit

The detection limit of the assay was determined by running the zero calibrator 12 times on three different lots. The detection limit of 0.5 U/mL was calculated by finding the mean plus two standard deviations.

Interference study

Three low positive samples were spiked to the following concentrations in diluted serum samples; Bilirubin F at 0.188 mg/dL, Bilirubin C at 0.2 mg/dL, Haemoglobin at 453 mg/dL, Chyle at 0.24 U/dL and Rheumatoid Factor at 200 IU/mL. The data indicates that the assayed concentrations do not interfere with the anti-CCP results.

To assess potential cross-reactivity of CCP IgG antigen with other autoantibodies, a total of 405 samples of different aetiology were assayed. Samples from patients diagnosed with Crohn's disease, Colitis ulcerosa, SLE, Sjögren's syndrome, Osteoarthritis, Scleroderma, Multiple sclerosis, MCTD, Inflammatory bowel disease, Polymyositis/Dermatomyositis, nonRA autoimmune patients and samples reacting with MPO-ANCA, PR3-ANCA and ds-DNA. Data indicates that the assayed autoantibodies show no significant cross-reactivity.

LIMITATIONS OF USE

1. A positive result must be used in conjunction with clinical evaluation and other diagnostic procedures. The values obtained from this assay are intended to be an aid to diagnosis only. Each physician must interpret the results in conjunction with the patient's history, physical findings and other diagnostic procedures.
2. Elevated anti-CCP antibodies may be seen in individuals with no evidence of clinical disease. Also, some individuals with RA may have undetectable antibodies. Anti-CCP antibody levels do not necessarily correlate to disease state.
3. Because anti-CCP antibody levels do not necessarily correlate to disease state treatment should not be initiated or changed based on a positive result. Clinical findings should be taken into account for all treatment decisions.
4. Monitoring anti-CCP antibody levels for progression and or remission of RA has not been established.
5. The performance characteristics for this assay have not been established for paediatric specimens. The diagnostic value of anti-CCP antibodies has not been determined for juvenile arthritis.

REFERENCES












1. Van Boekel M, et al. Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4, 87-93, 2002.
2. Nienhuis R, et al. A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305, 1964.
3. Schellekens G, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273-281, 1998.
4. Van Jaarsveld C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697, 1999.
5. Schellekens, G, et al. The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163, 2000.
6. Bizzaro N, et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry* 47, 1089-1093, 2001.
7. Visser H, et al. How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A predication model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357-365, 2002.
8. Van Venrooij W, et al. Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. *Neth. J. Med.* 60, 383-388, 2002.
9. Vossenaar, E, et al. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262, 2004.
10. Meyer O, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assay in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126, 2003.
11. Rantapää-Dahlqvist S, et al. Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749, 2003.
12. Forslind K, et al. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (Anti-CCP) *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095, 2004.
13. Kastbom A, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089, 2004.
14. van Gaalen F, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 709-715, 2004.

SUMMARY OF PROTOCOL

1. Dilute samples 1:101. Do not dilute Calibrators, Reference, Positive and Negative Controls.
2. Add 100 μ L of Reference, Positive and Negative Controls/Calibrators in duplicate and pre-diluted samples into referenced wells.
3. Incubate 60 ± 10 minutes at 18-25° C.
4. Wash wells 3 times.
5. Add 100 μ L of Conjugate to each well.
6. Incubate 30 ± 5 minutes at 18-25° C.
7. Wash wells 3 times.
8. Add 100 μ L of Substrate to each well.
9. Incubate 30 ± 5 minutes at 18-25° C.
10. Add 100 μ L of Stop Solution to each well.
11. Read the absorbance at 550nm.

APPENDIX, ANNEXE, APÉNDICE, ANHANG, APPENDICE

Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette

	Batch code / Code du lot / Codice de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Referencia de catálogo
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro
	Temperature limitation/ Limites de temperature/ Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Biological risk/ Risque biologiques / Riesgo biológico / Biogefährdung / Rischio biologico
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbricante
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Ausreichend für "n" Ansätze / Contenuto sufficiente per <n> test
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

Ag	Antigen (coated strips)/ Antigène (barrette revêtue) / Antigeno (tiras recubiertas) / Antigen (beschichtete Streifen) / Antigene (strip sensibilizzate)
CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Coniugato
SUBS	Substrate/ Substrat / Sustrato / Substrat / Substrato
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopp-Lösung / Soluzione di stop
BUF WASH 16X	Wash buffer 16 x concentrate/ Tampon de lavage concentré (16x) / Tampón de lavado concentrado 16x / Waschpufferkonzentrat 16fach / Tampone di lavaggio 16 x concentrato
DIL SPE 5X	Sample diluent 5 x concentrate/ Diluant échantillon (5x) / Diluyente de muestra, concentrado 5x / Probenverdünnungspuffer 5fach / Diluente per campioni 5 x concentrato
CAL	Calibrators/ Étalons / Calibradores / Kalibratoren / Calibratori
CONTROL REF	Reference control/ Contrôle de référence / Control de referencia / Referenzkontrolle / Controllo di riferimento
CONTROL +	Positive control/ Contrôle positif / Control positivo / Positivkontrolle / Controllo positivo
CONTROL -	Negative control/ Contrôle négatif / Control negativo / Negativkontrolle / Controllo negativo

FRANÇAIS : UTILISATION

La trousse d'analyse anti-CCP EDIA™ est un dosage immunoenzymatique (ELISA) destiné à la détection et à la détermination semi-quantitative, dans le sérum ou le plasma humain, des anticorps IgG dirigés contre les peptides cycliques citrullinés (CCP). Le dosage est utilisé pour détecter les anticorps dans un échantillon unique. Les résultats du test, utilisés conjointement avec d'autres données biologiques et cliniques, représentent une aide au diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR). L'analyse ne doit être réalisée que par du personnel de laboratoire qualifié. Pour le diagnostic in vitro uniquement.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est l'une des maladies auto-immunes systémiques les plus répandues dans le monde.

Néanmoins, l'étiologie de cette maladie, qui touche 1 à 2% de la population mondiale, demeure inconnue. Le diagnostic de la PR repose essentiellement sur les manifestations cliniques de la maladie. Le seul dosage sérologique de routine est actuellement la recherche de facteurs rhumatoïdes (FR) dans le sérum. Les facteurs rhumatoïdes sont des anticorps dirigés contre la région constante des immunoglobulines de la sous-classe des IgG. Toutefois, ces anticorps sont présents, dans un pourcentage élevé, chez les individus souffrant de maladies auto-immunes, de maladies infectieuses et même chez environ 15% de la population saine.





Des anticorps plus spécifiques ont été observés dans le sérum de patients atteints de PR (1) (synthèse générale) ; ainsi, des anticorps anti-facteur périnucléaire sont présents chez environ 50% de patients atteints de PR, avec une spécificité de plus de 70% (2). Récemment, un certain nombre de peptides cycliques synthétiques non relatifs à la filagrine ou à d'autres protéines connues ont été spécifiquement reconnus par les auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints de PR (3). Ces peptides ont alors été utilisés dans une méthode ELISA pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la PR (3). Des évaluations cliniques ont montré que cette technique ELISA donnait des résultats positifs chez un nombre significatif de patients atteints de PR bien définie, avec une spécificité élevée par rapport à des contrôles pour d'autres pathologies (3-8). Une valeur diagnostique et pronostique a été établie entre, d'une part, la mesure des anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) et, d'autre part, l'état des articulations et l'altération radiologique des patients en stade précoce de PR (7, 9-14). Le dosage des anti-CCP EDIA™ proposé par Euro Diagnostica se base sur l'utilisation de peptides synthétiques hautement purifiés contenant des résidus de citrulline. Il constitue un outil supplémentaire de diagnostic de la PR. La trousse anti-CCP est composée d'une sélection de peptides synthétiques améliorés, choisis pour leurs performances dans la détection des auto-anticorps de la PR (8-14).

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse de dosage des anticorps anti-CCP EDIA™ utilise une méthode ELISA. Elle comprend des micropuits recouverts de peptides synthétiques citrullinés (antigène). Le sérum ou le plasma dilué du patient est distribué dans les puits et mis à incuber. Si des anticorps spécifiques sont présents, ils vont se lier à l'antigène des puits. Tout ce qui n'est pas lié aux parois des puits est éliminé par lavage. Tout anticorps lié est détecté par addition d'un anticorps anti-IgG humaine marqué à la phosphatase alcaline, suivie d'une seconde étape de lavage et d'une incubation avec un substrat chromogène.

La présence d'anticorps ayant réagi va provoquer le développement d'une réaction colorée d'intensité proportionnelle à la quantité d'anticorps liée. Cette intensité est lue sur un spectrophotomètre.

COMPOSITION DE LA TROUSSE

A	Conjugué IgG	1 x 15 mL	Anticorps polyclonaux, d'origine caprine, anti IgG humaine, marqués à la phosphatase alcaline, tampon Tris, stabilisateur de protéines, azide de sodium à <0,1% (p/v). Prêt à l'emploi.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , monophosphate de phénolphtaléine, solution tampon. Prêt à l'emploi. Conserver à l'abri de la lumière.	
C	Solution d'arrêt	1 x 15 mL	Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH>10). Prêt à l'emploi.	
D	Tampon de lavage concentré (16x)	2 x 25 mL	Tampon borate, azide de sodium à 0,4% (p/v). Diluer avant utilisation.	
E	Puits recouverts de CCP, dans un support	96 micropuits sécables	Revêtus de CCP (antigène) et conditionnés dans un emballage réutilisable en aluminium avec un dessicant.	
F	Diluant échantillon concentré (5x)	1 x 25 mL	Tampon phosphate, stabilisateur de protéines, azide de sodium à 0,5% (p/v). Diluer avant utilisation.	
1-6	Étalons anti-CCP	6 x 1,0 mL	Plasma humain, tampon, azide de sodium à <0,1% (p/v). 0, 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Prêt à l'emploi.	
7	Contrôle de référence anti-CCP.	1 x 1,5 mL	Plasma humain, tampon, azide de sodium à <0,1% (p/v). Prêt à l'emploi.	
+/-	Contrôle positif Contrôle négatif	1 x 1,5 mL 1 x 1,5 mL	Plasma humain, tampon, azide de sodium à <0,1% (p/v). Prêt à l'emploi.	
	Fiche technique			

CONSERVATION DES RÉACTIFS

Remarques sur la manipulation et la procédure

1. Conserver les composants de la trousse entre 2 et 8 °C et les utiliser avant la date de péremption indiquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs s'ils sont périmés.
2. Ne pas mélanger des produits ayant des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les trousse.
4. Le tampon de lavage concentré et le diluant échantillon concentré doivent être dilués avant utilisation. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le tampon de lavage et le diluant échantillon reconstitués sont stables 6 mois entre 2 et 8° C, à condition qu'aucune contamination microbienne ne se produise.
6. Remettre les micropuits non utilisés dans l'emballage métallique et les conserver dans la pochette en aluminium réutilisable avec le déshydratant, entre 2 et 8° C, jusqu'à nouvelle utilisation.
7. Conserver le substrat à l'abri de la lumière.
8. Éviter de contaminer les réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette jetable pour chaque réactif ou manipulation de l'échantillon.
9. Respecter le protocole pour obtenir des résultats optimaux. Les étapes de pipetage et de lavage sont primordiales pour la précision et la justesse des résultats.

Signes de détérioration

Le substrat doit être de couleur jaune pâle. Une couleur rose est le signe d'une contamination et le réactif doit alors être éliminé. Si l'un des composants est trouble ou présente un précipité, cela indique une détérioration du produit qui doit alors être éliminé.

Prélèvement et conservation des échantillons

La méthode est recommandée pour les échantillons de sérum et de plasma (EDTA et héparine) ; ne pas utiliser des échantillons très hémolysés, lipémiques, ou troubles. Laisser décongeler complètement les échantillons avant de les analyser et éviter de répéter le cycle congélation/décongélation. Vous pouvez conserver les échantillons entre 4 et 8° C pendant 48 heures maximum. Si vous désirez les conserver plus longtemps, les congeler à -20° C.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour le diagnostic in vitro uniquement.

Précautions de sécurité

1. Observer les instructions de cette fiche technique, en particulier celles relatives à la manipulation et aux conditions de conservation.
2. Les contrôles et étalons contiennent du sérum humain. Ils ont été testés et confirmés négatifs pour les anticorps anti-VIH 1+2, anti-VHC, pour l'AgHbs et pour l'AgVIH-1, mais ils doivent être traités comme potentiellement infectieux. Le Centre de prévention et de contrôle de maladies (CDC) et l'Institut national de santé (NIH) recommandent de traiter les agents potentiellement infectieux avec précaution, conformément au niveau de biosécurité 2.
3. Ne pas pipeter avec la bouche.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones où les trousse et les échantillons sont manipulés.
5. En cas de maladie de peau, de coupure, d'écorchure ou de toute autre lésion cutanée, la zone affectée doit être protégée de façon appropriée.
6. Les étalons, les contrôles, le conjugué, le diluant échantillon concentré et le tampon de lavage concentré contiennent de l'azide de sodium qui peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides métalliques extrêmement explosifs. Quand vous éliminez ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter l'accumulation d'azide.
7. La solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas d'éclaboussure, il faut l'éponger avec une grande quantité d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. Le substrat contient du PMP, du Bronidox L et de la diéthanolamine. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires. En cas de contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires, laver avec de l'eau et consulter un médecin.
9. Les fiches de données de sécurité de tous les composants dangereux contenus dans la trousse sont disponibles sur simple demande auprès d'Euro Diagnostica.



B.

SUBS

Attention

Contient: Diéthanolamine

- H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.



C.

SOLN	STOP
------	------

Attention

Contient: Hydroxyde de sodium

- H315: Provoque une irritation cutanée.
 H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
 P332+P313: En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attention

Contient: Azoture de sodium

- H302: Nocif en cas d'ingestion.
 EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
 H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P301+P312: EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
 P273: Éviter le rejet dans l'environnement.

P R É P A R A T I O N

Matériel/équipement nécessaire mais non fourni

1. Lecteur de plaque de microtitration ayant un filtre à 550 nm (l'intervalle 540-565 nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10 µL, 100 µL et 1 mL. Pipette automatique pour distribuer 100 µL. Pipette automatique pour distribuer 200 µL pour le lavage manuel, laveur automatique de plaque en option.
3. Éprouvettes graduées en verre/plastique : 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Récipients de 1 mL de volume.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Papier absorbant.
7. Minuterie pour des intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation pour le dosage

Laisser la température de tous les composants de la trousse, y compris les micropuits, s'équilibrer à température ambiante (18-25° C) avant utilisation. Mélanger doucement les réactifs par inversion.

Ne diluer ni le contrôle de référence, ni les contrôles positif et négatif.

Diluer les réactifs suivants et les échantillons, puis bien les mélanger.

Réactif	Volume	Ajouter
Tampon de lavage concentré	1 flacon	375 mL d'eau distillée ou désionisée
Diluant échantillon concentré	1 flacon	100 mL d'eau distillée ou désionisée

Échantillon	Volume	Ajouter
Échantillons	10 µL	1 mL de diluant échantillon reconstitué

Calculer le nombre de micropuits nécessaire pour l'analyse à réaliser et les placer dans le support. Remettre les micropuits non utilisés dans l'emballage métallique avec le déshydratant et les conserver dans la pochette en plastique réutilisable, entre 2 et 8 °C, jusqu'à nouvelle utilisation. S'assurer que tous les micropuits sont bien fixés dans le support et que l'étiquette d'identification du dosage est sur le bord inférieur, au-dessous de la file H.

P R O T O C O L E D E D O S A G E

Protocole qualitatif : Analyser le contrôle de référence, les contrôles positif et négatif ainsi que les échantillons.

Protocole semi-quantitatif : Analyser les étalons (1-6), les contrôles positif et négatif ainsi que les échantillons.

1. Référencer les puits afin de les identifier.
2. Pipeter 100 µL de contrôle de référence, de contrôles positif et négatif ou d'étalons, en double, et d'échantillons patient prédilués (au 1/101) dans les puits appropriés. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette entre les distributions. Cette étape ne doit pas durer plus de 15 minutes pour chaque série étalons/contrôles/échantillons.
3. Incuber 60 ±10 minutes entre 18 et 25° C.
4. Rejeter le contenu des micropuits par inversion rapide au-dessus d'un évier approprié pour l'élimination des déchets biologiques, en n'oubliant pas le risque infectieux potentiel des échantillons. Sécher les micropuits inversés avec du papier absorbant.
5. Laver les puits **trois fois** avec au moins 200 µL de tampon de lavage reconstitué. **Retirer le liquide et sécher après chaque étape de lavage.**
6. Pipeter 100 µL de conjugué dans chaque puits.
7. Incuber 30 ±5 minutes entre 18 et 25° C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Pipeter 100 µL de substrat dans chaque puits.

10. Incuber 30 ±5 minutes entre 18 et 25° C. **Ne pas retirer le liquide.**
11. Pipeter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits, dans le même ordre et à la même vitesse que pour le substrat. Tapoter doucement sur les puits pour mélanger.
12. Lire les micropuits à 550 nm (540-565 nm) endéans les 24 heures.

CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Prendre en considération chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.

Protocole qualitatif

Calculer le ratio de l'absorbance (densité optique) des contrôles positif et négatif ainsi que de chaque échantillon par rapport au contrôle de référence.

$$\text{Ratio d'absorbance} = \frac{\text{Absorbance du contrôle ou de l'échantillon}}{\text{Absorbance moyenne du contrôle de référence}}$$

Il appartient à chaque laboratoire de déterminer la valeur seuil entre les échantillons négatifs et positifs, spécifique de la population concernée. Les résultats obtenus par Euro Diagnostica sur une population de patients lors de l'évaluation clinique suggèrent de prendre la valeur seuil suivante :

<u>Ratio d'absorbance</u>	<u>Interprétation</u>
< 0,95	Négatif
≥ 0,95 et ≤ 1,0	Limite – à retester
> 1,0	Positif

Protocole semi-quantitatif

Tracer une courbe représentant l'absorbance moyenne de chaque étalon en fonction de sa concentration, en log₁₀, (cf. tableau suivant), sur du papier millimétré approprié. Il est possible de lire les concentrations des contrôles et des échantillons au moyen de la courbe d'étalonnage ; une courbe type utilisant un lissage par la méthode des 4 paramètres logistiques (4PL) est présentée ci-dessous en guise d'illustration, mais elle ne doit pas être utilisée pour l'interprétation des résultats. Les échantillons dont l'absorbance dépasse celle de l'étalon 6 (300 U/mL) se situent hors de l'intervalle du dosage et la mesure doit indiquer >300 U/mL, ou bien les diluer et les analyser à nouveau en prenant en compte le facteur de dilution lors du calcul.

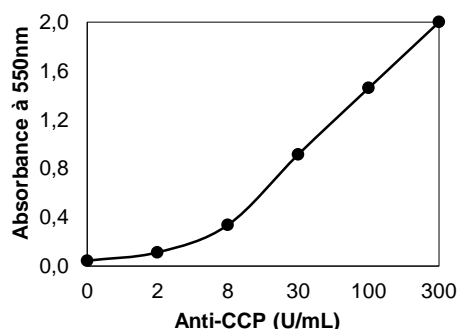
NB : Comme pour toutes les méthodes mesurant des anticorps, le dosage détermine l'activité de l'anticorps présent dans l'échantillon plutôt que sa concentration. Divers paramètres, comme l'avidité de l'anticorps, peuvent altérer son activité.

Les échantillons donnant un résultat ≤5 U/mL sont définis comme négatifs. Les échantillons >5 U/mL sont définis comme positifs.

Concentration des étalons

Étalon numéro	Concentration U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Courbe d'étalonnage type



C O N T R Ô L E Q U A L I T É

S'assurer que l'étalonnage et la maintenance appropriée du spectrophotomètre sont réalisés conformément aux instructions du fabricant et que c'est la bonne longueur d'onde qui est utilisée. Le personnel doit avoir une bonne connaissance des instructions du dosage, en particulier des sections Avertissements et précautions et Remarques sur la manipulation et la procédure.

Avant de transmettre des résultats de patients, l'utilisateur doit démontrer qu'il est en mesure d'obtenir des performances de précision, de distribution et d'écart des valeurs, équivalentes à celles établies par le fabricant. Il est recommandé d'analyser en double les contrôles positif et négatif pour chaque dosage afin d'évaluer la qualité de la procédure. Analyser en double le contrôle de référence prêt à l'emploi pour tous les dosages qualitatifs.

Une fois que les caractéristiques de précision indiquées par le fabricant sont satisfaites, si l'un des contrôles ne satisfait pas aux spécifications du ratio de contrôle ci-dessous, le dosage est non valable et les résultats des patients ne doivent pas être relevés. L'utilisateur peut répéter le dosage, après avoir révisé la procédure, ou contacter le distributeur ou le fabricant. En cas de répétition du dosage, préparer une nouvelle dilution de l'échantillon. Il est possible que le laboratoire veuille inclure des contrôles qui lui sont propres pour chaque analyse. Conserver ce matériel de contrôle à une température inférieure ou égale à -20 °C et éviter de répéter le cycle congélation/décongélation. Les conservateurs comme l'azide de sodium à 0,1% (p/v) n'affectent pas les résultats de l'échantillon.

Les concentrations en analytes identifiés pour une maladie particulière sont celles établies par le fabricant pour des populations spécifiques et elles ne correspondent pas nécessairement aux valeurs de la littérature scientifique. Les niveaux d'incidence, leur relation avec des maladies spécifiques, les intervalles de référence et les valeurs seuils doivent être calculés par le laboratoire pour la population qu'il dessert.

Spécifications du ratio de contrôle

Protocole	Spécifications
Qualitatif (ratios)	<u>Absorbance du contrôle positif</u> Absorbance du contrôle de référence Voir étiquette du contrôle positif
	<u>Absorbance du contrôle négatif</u> Absorbance du contrôle de référence < 0,95
Semi-quantitatif	Voir étiquette du contrôle positif pour connaître l'intervalle attendu acceptable (U/mL)
	Concentration du contrôle négatif < 3 U/mL

V A L E U R S U S U E L L E S

La méthode ELISA anti-CCP EDIA™ mesure la quantité d'anticorps dirigés contre des peptides synthétiques contenant des résidus de citrulline (anti-CCP). Elle est étalonnée à l'aide d'un pool de sérums positifs de patients comme étalon. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. La courbe d'étalonnage va de 0 à 300 U/mL. Ces valeurs ont été choisies arbitrairement par Euro Diagnostica dans la mesure où il n'existe pas d'étalon international pour exprimer les titres en anticorps anti-CCP. La spécificité et la sensibilité ont été évaluées sur 416 patients atteints de PR, 531 patients atteints de maladies autres que la PR (y compris d'autres maladies auto-immunes et diverses maladies inflammatoires ou virales) et 262 sujets de contrôle sains, les échantillons provenant d'adultes. La sensibilité obtenue est de 76%. La spécificité est de 98% vis-à-vis de maladies autres que la PR et de 99% vis-à-vis des sujets apparemment sains.

Pour déterminer la valeur seuil, la méthode d'analyse par les courbes ROC a été mise en œuvre. L'analyse a révélé un point avec la somme la plus basse possible de faux positifs et de faux-négatifs et le seuil a été en conséquence établi à 5 U/mL.

Intervalle de référence
 ≤5U/mL = Négatif
 >5U/mL = Positif

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Tableau 1. Pourcentage de corrélation entre la trousse anti-CCP EDIA™ et une méthode alternative ELISA anti-CCP. Au total, 678 échantillons de sérum congelé ont été dosés. 416 échantillons proviennent de patients atteints de PR ; les 262 autres échantillons proviennent de donneurs de sang apparemment sains.

EDIA™ anti-CCP		Méthode alternative ELISA		
		Positif	Négatif	Total
	Positif	317	2	319
	Négatif	5	354	359
	Total	322	356	678

Pourcentage de corrélation (échantillons positifs) : $317/322 = 98,4\%$

IC à 95% = 96,4 – 99,5%

Pourcentage de corrélation (échantillons négatifs) : $354/356 = 99,4\%$

IC à 95% = 98,0 – 99,9%

Pourcentage de corrélation globale : $671/678 = 99,0\%$

IC à 95% = 97,9 – 99,6%

L'intervalle de confiance (IC) à 95% a été calculé en utilisant la méthode exacte.

Tableau 2. Spécificité et sensibilité cliniques. Au total, 1209 échantillons de sérum congelé (ayant une caractérisation clinique) ont été dosés. Le tableau suivant résume les résultats.

	n	négatif	positif
Donneurs sains	262	260	2
PR	416	99	317
Maladies infectieuses	86	85	1
Maladies inflammatoires (autres que PR)	445	437	8
TOTAL	1209	881	328

(Données disponibles)

Sensibilité clinique

PR $317/416 = 76,2\%$ IC à 95% = 72,1 – 80,3%

Spécificité clinique

Donneurs sains $260/262 = 99,2\%$ IC à 95% = 97,3 – 99,9%

Maladies infectieuses $85/86 = 98,8\%$ IC à 95% = 93,7 - 100%

Maladies inflammatoires $437/445 = 98,2\%$ IC à 95% = 96,5 – 99,2%

(autres que PR)

Groupes autres que PR $782/793 = 98,6\%$ IC à 95% = 97,5 – 99,3%

combinés

L'intervalle de confiance (IC) à 95% a été calculé en utilisant la méthode exacte.

Tableau 3. La **précision intra-série** a été déterminée en analysant huit fois six échantillons différents.

	Conc. élevée (U/mL)	Conc. moyenne (U/mL)	Conc. faible (U/mL)
Moyenne	173,9	34,0	9,9
Écart-type	13,8	0,6	0,2
C.V. (%)	7,9	1,9	2,1
	Conc. faible (U/mL)	Conc. faible (U/mL)	Conc. faible (U/mL)
Moyenne	11,8	7,8	9,7
Écart-type	0,5	0,1	0,4
C.V. (%)	4,0	1,9	4,4

Tableau 4. La **précision inter-série** a été déterminée en analysant huit fois six échantillons différents. Les résultats ont été obtenus sur trois séries différentes.

	Conc. élevée (U/mL)	Conc. moyenne (U/mL)	Conc. faible (U/mL)
Moyenne.	183,8	36,6	9,3
Écart-type	19,5	3,0	0,9
C.V. (%)	10,6	8,2	9,8
	Conc. faible (U/mL)	Conc. faible (U/mL)	Conc. faible (U/mL)
Moyenne	11,9	7,8	10,6
Écart-type	0,8	0,7	0,9
C.V. (%)	6,3	9,5	8,9

Table 5. La **variation inter-lots** a été déterminée en analysant huit fois six échantillons différents. Les résultats ont été obtenus sur trois lots différents.

	Conc. Élevée (U/mL)	Conc. moyenne (U/mL)	Conc. faible (U/mL)
Moyenne	232,5	41,6	11,5
Écart-type	30,9	4,5	1,3
C.V. (%)	13,3	10,8	11,2
	Conc. faible (U/mL)	Conc. faible (U/mL)	Conc. faible (U/mL)
Moyenne	14,1	9,8	13,0
Écart-type	1,2	1,0	1,2
C.V. (%)	8,3	10,4	9,3

Tableau 6. Le taux de **récupération de la dilution** a été déterminé en analysant cinq dilutions sérielles de trois échantillons différents.

Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/mL)	Concentration calculée (U/mL)	Taux de récupération (%) de la dilution corrigée
1	1/100	205,0	205,0	100
	1/200	110,5	102,5	108
	1/400	47,3	51,3	92
	1/800	24,8	25,6	97
	1/1600	10,8	12,8	84
Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/mL)	Concentration calculée (U/mL)	Taux de récupération (%) de la dilution corrigée
2	1/100	138,9	138,9	100
	1/200	70,3	69,5	101
	1/400	40,4	34,7	116
	1/800	18,3	17,4	105
	1/1600	8,7	8,7	100
Échantillon	Dilution	Concentration moyenne mesurée (U/mL)	Concentration calculée (U/mL)	Taux de récupération (%) de la dilution corrigée
3	1/100	47,3	47,3	100
	1/200	26,7	23,6	113
	1/400	13,0	11,8	110
	1/800	6,3	5,9	107
	1/1600	3,0	3,0	103

Limite de détection

La limite de détection du dosage a été déterminée en analysant 12 fois l'étalon zéro sur trois lots différents. Calculée comme étant la moyenne plus deux écart-types, elle est de 0,5 U/mL.

Étude d'interférences

Trois échantillons faiblement positifs ont reçu l'ajout de bilirubine F à 0,188 mg/dL, de bilirubine C à 0,2 mg/dL, d'hémoglobine à 453 mg/dL, de chyle à 0,24 U/dL et de facteur rhumatoïde à 200 UI/mL. Les données indiquent les concentrations analysées n'interfèrent pas avec les résultats des anti-CCP.

Pour évaluer la potentielle réactivité croisée de l'antigène IgG de CCP avec d'autres auto-anticorps, un total de 405 échantillons d'étiologie différente ont été analysés. Les échantillons proviennent de patients atteints de la maladie de Crohn, de colite ulcéreuse, de lupus érythémateux disséminé, de syndrome de Sjögren, d'arthrose, de sclérodermie, de sclérose en plaques, de connectivité mixte, de maladies inflammatoires intestinales, de polymyosite / dermatomyosite, de patients atteints d'une maladie auto-immune (autre que la PR) et d'échantillons réagissant avec : MPO-ANCA, PR3-ANCA et ADN double brin. Les données indiquent que les auto-anticorps testés ne présentent aucune réactivité croisée significative.

LIMITES DU DOSAGE

1. Tout résultat positif doit être utilisé conjointement avec une évaluation clinique et d'autres procédures de diagnostic. Les valeurs obtenues avec ce dosage ne sont destinées à n'être qu'une aide au diagnostic. Il appartient à chaque médecin d'interpréter les résultats en fonction des antécédents du patient, de son examen physique et d'autres procédures de diagnostic.
2. Une concentration élevée en anticorps anti-CCP a été trouvée chez des individus ne présentant aucun signe de maladie clinique. En outre, certains patients atteints de PR peuvent avoir une concentration en anticorps non décelable. Il n'existe pas nécessairement une corrélation directe entre la concentration en anticorps anti-CCP et le stade de la maladie.
3. Étant donné qu'il n'existe pas nécessairement une corrélation directe entre la concentration en anticorps anti-CCP et le stade de la maladie, le traitement ne doit être ni initié ni modifié sur la seule base d'un résultat positif. Les examens cliniques doivent être pris en compte pour toute décision de traitement.
4. Il n'a pas été établi que la surveillance de la variation de la concentration en anticorps anti-CCP serve à contrôler la progression ou la rémission de la PR.
5. Les performances du dosage n'ont pas été établies pour des échantillons d'enfants. Il n'a pas été démontré que les anticorps anti-CCP aient une valeur diagnostique pour l'arthrite juvénile.

BIBLIOGRAPHIE












1. Van Boekel M, et al. Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4, 87-93, 2002.
2. Nienhuis R, et al. A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305, 1964.
3. Schellekens G, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273-281, 1998.
4. Van Jaarsveld C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697, 1999.
5. Schellekens, G, et al. The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163, 2000.
6. Bizzaro N, et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry* 47, 1089-1093, 2001.
7. Visser H, et al. How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A predication model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357-365, 2002.
8. Van Venrooij W, et al. Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. *Neth. J. Med.* 60, 383-388, 2002.
9. Vossenaar, E, et al. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262, 2004.
10. Meyer O, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assay in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126, 2003.
11. Rantapää-Dahlqvist S, et al. Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749, 2003.
12. Forslind K, et al. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (Anti-CCP). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095, 2004.
13. Kastbom A, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089, 2004.
14. van Gaalen F, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 709-715, 2004.

RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

1. Diluer les échantillons au 1/101. Ne diluer ni les étalons, ni le contrôle de référence, ni les contrôles positif et négatif.
2. Pipeter 100 µL de contrôle de référence, de contrôles positif et négatif, ou d'étalons (en double), et d'échantillons pré-dilués dans des micropuits identifiés.
3. Incuber 60 ±10 minutes entre 18 et 25° C.
4. Laver les micropuits 3 fois.
5. Pipeter 100 µL de conjugué dans chaque puits.
6. Incuber 30 ±5 minutes entre 18 et 25° C.
7. Laver les micropuits 3 fois.
8. Pipeter 100 µL de substrat dans chaque puits.
9. Incuber 30 ±5 minutes entre 18 et 25° C.
10. Pipeter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
11. Mesurer l'absorbance à 550 nm.

APPENDIX, ANNEXE, APÉNDICE, ANHANG, APPENDICE

Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette

	Batch code / Code du lot / Codice de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Referencia de catálogo
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro
	Temperature limitation/ Limites de temperature/ Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Biological risk/ Risque biologiques / Riesgo biológico / Biogefährdung / Rischio biologico
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbricante
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Ausreichend für "n" Ansätze / Contenuto sufficiente per <n> test
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

Ag	Antigen (coated strips)/ Antigène (barrette revêtue) / Antigeno (tiras recubiertas) / Antigen (beschichtete Streifen) / Antigene (strip sensibilizzate)
CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Coniugato
SUBS	Substrate/ Substrat / Sustrato / Substrat / Substrato
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopp-Lösung / Soluzione di stop
BUF WASH 16X	Wash buffer 16 x concentrate/ Tampon de lavage concentré (16x) / Tampón de lavado concentrado 16x / Waschpufferkonzentrat 16fach / Tampone di lavaggio 16 x concentrato
DIL SPE 5X	Sample diluent 5 x concentrate/ Diluant échantillon (5x) / Diluyente de muestra, concentrado 5x / Probenverdünnungspuffer 5fach / Diluente per campioni 5 x concentrato
CAL	Calibrators/ Étalons / Calibradores / Kalibratoren / Calibratori
CONTROL REF	Reference control/ Contrôle de référence / Control de referencia / Referenzkontrolle / Controllo di riferimento
CONTROL +	Positive control/ Contrôle positif / Control positivo / Positivkontrolle / Controllo positivo
CONTROL -	Negative control/ Contrôle négatif / Control negativo / Negativkontrolle / Controllo negativo

ESPAÑOL: USO PREVISTO

El kit de prueba anti-PCC EDIA™ es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos IgG frente a los péptidos citrulinados cíclicos (PCC) en suero o plasma humanos. El ensayo se utiliza para detectar anticuerpos en una única muestra. Los resultados del ensayo se usan como ayuda en el diagnóstico de la artritis reumatoide (AR), conjuntamente con otros hallazgos de laboratorio y clínicos. El análisis deben realizarlo profesionales de laboratorio debidamente formados. Para uso diagnóstico in vitro.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La artritis reumatoide (AR), es una de las enfermedades autoinmunes sistémicas más frecuentes. La causa de la enfermedad, que afecta a hasta un 1-2% de la población mundial, es desconocida. El diagnóstico de la AR depende fundamentalmente de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La única prueba serológica usada habitualmente es la determinación de la presencia de los factores reumatoides (FR) en el suero. Los FR son anticuerpos dirigidos contra la región constante de las inmunoglobulinas de tipo IgG. Sin embargo, estos anticuerpos están también presentes en un porcentaje relativamente alto en otras enfermedades autoinmunes, en infecciones y en hasta el 15% de la población sana.





Se han encontrado anticuerpos de naturaleza más específica en el suero de pacientes con AR (véase (1) para una revisión). Se ha comunicado que hay anticuerpos anti-factor perinuclear (APF) en alrededor del 50% de los pacientes con AR con una especificidad de más del 70% (2). Se han descrito varios péptidos sintéticos cíclicos no relacionados con la filagrina u otras proteínas conocidas y que son reconocidos específicamente por autoanticuerpos del suero de pacientes con AR (3). Estos péptidos se usaron posteriormente en un ELISA para la detección de autoanticuerpos específicos de la AR (3). Los estudios de evaluación clínica demostraron que el ELISA era positivo en un número significativo de sueros de pacientes con AR bien definidos, con una alta especificidad respecto a los controles con otras enfermedades (3-8). Se encontró valor diagnóstico y pronóstico para la medición de los anticuerpos frente a los péptidos citrulinados cíclicos (anti-PCC) en relación con la afectación articular y el daño radiológico en la AR precoz (7, 9-14). El ensayo anti-PCC EDIA™ presentado por Euro-Diagnóstica se basa en péptidos sintéticos muy purificados que contienen residuos de citrulina y es un aporte adicional en el diagnóstico de la AR. Este kit anti-PCC contiene péptidos sintéticos mejorados, seleccionados en base a la eficacia del ensayo para la detección de autoanticuerpos en la AR (8-14).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit de anticuerpos anti-PCC EDIA™ se basa en el método ELISA. El ensayo utiliza pocillos de microtitulación recubiertos por péptidos sintéticos citrulinados (antígeno). Se dispensa en los pocillos el suero o plasma diluido de los pacientes y se incuba. Si hay anticuerpos específicos, se unirán al antígeno en los pocillos. El material no unido se desecha realizando un posterior lavado de los pocillos. El anticuerpo unido se detecta añadiendo anticuerpos frente a IgG humana marcados con fosfatasa alcalina, seguidos por un segundo paso de lavado y por incubación con un sustrato cromogénico.

La presencia de los anticuerpos reactivos dará lugar al desarrollo de color, que es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido y se determina fotométricamente.

COMPONENTES DEL KIT

A	Conjugado IgG	1 × 15 ml	Anticuerpo policlonal de cabra frente a la IgG humana, marcado con fosfatasa alcalina, tampón Tris, estabilizador de proteínas, azida sódica al 0,1% (p/v). Listo para usar.	
B	Sustrato	1 × 15 ml	Mg ²⁺ , monofosfato de fenoltaleína (MFF), solución tampón. Listo para usar. No debe exponerse a la luz durante su almacenamiento.	
C	Solución de parada	1 × 15 ml	Hidróxido sódico, EDTA, tampón carbonato (pH>10). Listo para usar.	
D	Tampón de lavado concentrado (16×)	2 × 25 ml	Tampón borato, azida sódica al 0,4% (p/v). Diluir antes de usar.	
E	Pocillos revestidos con PCC en un marco	96 pocillos	Revestidos con el antígeno PCC, en un envase de aluminio resellable con desecante.	
F	Diluyente de muestra concentrado(5×)	1 × 25 ml	Tampón fosfato, estabilizador de proteínas, azida sódica al 0,5% (p/v). Diluir antes de su uso.	
1-6	Calibradores anti-PCC	6 × 1,0 ml	Plasma humano, tampón, azida sódica al 0,1% (p/v). 0, 2, 8, 30, 100, 300 U/ml. Listo para usar.	
6	Control de referencia anti-PCC	1 × 1,5 ml	Plasma humano, tampón, azida sódica al 0,1% (p/v). Listo para usar.	
+/-	Control positivo	1 × 1,5 ml	Plasma humano, tampón, azida sódica al 0,1% (p/v). Listo para usar.	
	Control negativo	1 × 1,5 ml		
	Instrucciones de uso (IDU)			

CONSERVACIÓN DE REACTIVOS

Notas de manipulación y del procedimiento

1. Conserve los componentes del kit a 2-8° C y pueden ser usados hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. No use los reactivos caducados.
2. No mezcle números de lote diferentes.
3. No congele los kits.
4. El tampón de lavado concentrado y el diluyente de la muestra concentrado deben diluirse antes de su uso. Todos los demás reactivos están listos para usar.
5. El tampón de lavado diluido y el diluyente de la muestra diluido son estables a 2-8° C durante 6 meses si se evita la contaminación microbiana.
6. Vuelva a colocar los pocillos de microtitulación sobrantes en el envase de aluminio y guárdelo dentro de la bolsa de hoja de aluminio resellable, a 2-8° C, hasta que los necesite.
7. No exponga el sustrato a la luz durante la conservación.
8. Evite la contaminación de los reactivos. Use una nueva punta de pipeta desechable para cada manipulación de reactivos o muestras.
9. Se obtendrán resultados óptimos mediante el seguimiento estricto de este protocolo. Es necesario un pipeteado y un lavado cuidadosos durante el procedimiento para mantener la precisión y la exactitud.

Indicaciones de deterioro

El sustrato debe tener un color amarillo pálido. La coloración rosa indica contaminación y el reactivo debe desecharse. La turbidez o la precipitación de cualquier componente indica deterioro y el componente debe desecharse.

Recogida y conservación de las muestras

El ensayo se recomienda para muestras de suero/plasma (EDTA y heparina); no utilice muestras muy hemolizadas, lipémicas. Mezcle cuidadosamente las muestras descongeladas antes del ensayo y evite la congelación/descongelación repetidas. Conserve las muestras durante un máximo de 48 horas a 4-8° C. Para un almacenamiento prolongado, congele las muestras a -20° C.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Exclusivamente para uso diagnóstico in vitro.

Precauciones de seguridad

1. Siga estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente para las condiciones de manipulación y conservación.
2. Los controles y los calibradores contienen suero de origen humano. Aunque se han estudiado y se ha confirmado que es negativo para VIH 1+2, VHC, HbsAg y Ag del VIH-1, este material debe tratarse como potencialmente infeccioso. Los Centros de Prevención y Control de Enfermedades y los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se traten en un nivel 2 de bioseguridad.
3. No pipetee con la boca
4. No fume, coma, beba ni se aplique cosméticos en áreas donde se manipulan kits y muestras.
5. Cualquier problema, corte, abrasión u otro tipo de lesión cutánea debe protegerse adecuadamente.
6. Los calibradores, los controles, el conjugado, el diluyente de muestra concentrado y el tampón de lavado concentrado contienen azida sódica que puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre formando azidas metálicas muy explosivas. Al eliminarlos, drene con grandes cantidades de agua para impedir la acumulación de azidas.
7. La solución de parada contiene hidróxido sódico. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Los vertidos deben limpiarse con cantidades copiosas de agua. Si se produce contacto con la piel o los ojos, lave con abundante agua la parte afectada y busque asistencia médica inmediatamente.
8. El sustrato contiene PMP, Bronidox L, y Dietanolamina. Evite el contacto con la piel, los ojos y mucosas. Si se produce contacto con la piel, los ojos o mucosas, aclárelos con agua y consulte con su médico.
9. Euro Diagnostica dispone de fichas técnicas de seguridad de materiales de todos los componentes peligrosos contenidos en este kit, para entregárselas a quien las solicite.

B.



Atención

SUBS

Contiene: Dietanolamina

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Provoca irritación ocular grave. |
| P264: | Lávese bien las manos después de manipular. |
| P280: | Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. |
| P305+P351+P338: | EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. |
| P337+P313: | Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Atención

Contiene: Hidróxido de sodio

- H315: Provoca irritación cutánea.
 H319: Provoca irritación ocular grave.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
 P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
 P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Atención

Contiene: Azida sódica

- H302: Nocivo en caso de ingestión.
 EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
 H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a. un médico si se encuentra mal.
 P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

PREPARACIÓN

Materiales/equipo necesarios, pero no suministrados

1. Lector de placas/tiras de microtitulación de 96 pocillos con filtro de 550 nm (rango aceptable: 540-565 nm).
2. Pipetas de precisión para dispensar 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipeta automática para dispensar 100 µL. Pipeta automática para dispensar 200 µL para lavado manual, lavadora automática de placas opcional.
3. Probeta graduada de medición vidrio/plástico: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Recipientes de 1 mL de volumen.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallitas de papel.
7. Temporizador para intervalos de 30 y 60 minutos.

Preparación para el ensayo

Antes del uso, lleve todos los componentes del kit, o incluidos los pocillos de microtitulación, a temperatura ambiente (18-25° C). Mezcle los reactivos mediante inversión suave.

No diluya los controles de referencia, positivos y negativos.

Diluya los siguientes reactivos y muestras y mézclelos cuidadosamente.

Reactivo	Volumen	Añadir
Tampón de lavado concentrado	1 vial	375 mL de agua destilada/desionizada
Diluyente de muestra concentrado	1 vial	100 mL de agua destilada/desionizada

Muestra	Volumen	Añadir
Muestras	10 µL	1 mL de diluyente de la muestra diluido

Calcule el número de pocillos de microtitulación o necesarios para el ensayo actual y consérvelas en el marco de microtitulación. Vuelva a poner los pocillos sobrantes en el envase de aluminio con desecante y o guárdelos a 2-8° C hasta que o los necesite. Compruebe que todos los pocillos están o sujetos de forma segura dentro del marco de microtitulación, con la pestaña de identificación del ensayo en el borde inferior debajo de la fila H.

P R O T O C O L O D E E N S A Y O

Protocolo cualitativo: ejecute el control de referencia, los controles positivos y negativos y las muestras.

Protocolo Cuantitativo/semicuantitativo: ejecute los calibradores (1-6), los controles positivos y negativos y las muestras.

1. Referencie los pocillos para su identificación.
2. Pipetee 100 µL de controles de referencia, positivos y negativos/calibradores por duplicado, y muestras de pacientes prediluidas (1:101) en los pocillos correspondientes. Recuerde cambiar las puntas de pipeta entre las adiciones. Este paso no debe superar los 15 minutos para un conjunto determinado de calibradores/controles/muestras.
3. Incube durante 60±10 minutos a 18-25° C.
4. Decante el contenido de los pocillos mediante inversión rápida sobre un sumidero adecuado para la eliminación de materiales biológicos, teniendo en cuenta el posible riesgo infeccioso de las muestras. Secar los pocillos invertidos bien con toallitas de papel.
5. Lave los pocillos **tres veces** con un mínimo de 200 µL de tampón de lavado diluido. **Decante y elimine todo el líquido sobrante después de cada paso de lavado.**
6. Añada 100 µL de conjugado a cada pocillo.
7. Incube durante 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
8. Repita los pasos 4 y 5.
9. Añada 100 µL de sustrato a cada pocillo.
10. Incube durante 30±5 minutos a 18-25° C. **No decante.**
11. Añada 100 µL de solución de parada a cada pocillo, en el mismo orden y ritmo que el sustrato. Golpee suavemente los pocillos para mezclar.
12. Lea los pocillos en un plazo máximo de 24 horas a 550 nm (540-565 nm).

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Considere cada ensayo por separado al calcular e interpretar los resultados.

Protocolo cualitativo

Calcular el ratio de absorbancias (densidad óptica) para los controles positivos y negativos y cada muestra.

$$\text{Ratio de absorbancia} = \frac{\text{Valor de absorbancia de la muestra} \ominus \text{el control}}{\text{media del valor de absorbancia del control de referencia}}$$

Los usuarios deben calcular un valor de corte entre las muestras positivas y negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes usadas en el ensayo clínico de Euro Diagnostica sugieren el siguiente valor de corte:

<u>Ratio de absorbancia</u>	<u>Interpretación de los resultados</u>
<0,95	Negativos
≥ 0,95 a ≤ 1,0	Dudoso-recomendable repetir el ensayo
>1,0	Positivo

Protocolo Semicuantitativo/ Cuantitativo

Se representa el valor medio de absorbancia de cada calibrador frente a su concentración \log_{10} (véase la tabla siguiente) en un papel milimetrado adecuado. Pueden leerse las concentraciones de los controles y las muestras en la curva de calibración; se muestra a continuación una gráfica típica empleando una curva logística de 4 parámetros (4PL) con fines de referencia que no debe usarse para interpretar resultados. Las muestras con absorbancias por encima del calibrador 6 (300 U/mL) están fuera del rango del ensayo y deben comunicarse como >300 U/mL o diluirse y reensayarse, corrigiendo por el nuevo factor de dilución.

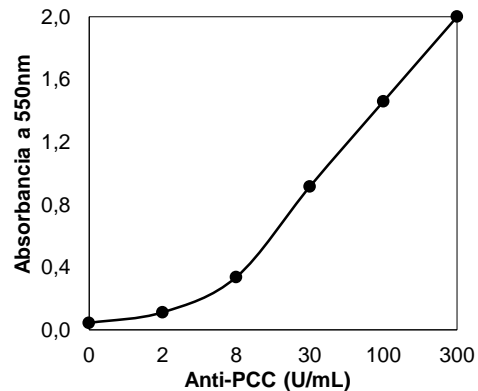
Nota: Como ocurre en cualquier ensayo que mide anticuerpos, este ensayo determina la actividad del anticuerpo presente en la muestra, más que su concentración. La actividad puede verse afectada por diversos parámetros, como la avidéz del anticuerpo.

Las muestras con resultados ≤ 5 ml se definen como negativas. Las muestras > 5 U/ml se definen como positivas.

Concentraciones del calibrador

Número del calibrador	Concentración U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Curva estándar típica



CONTROL DE CALIDAD

Compruebe que se realiza un mantenimiento y una calibración adecuados del lector de placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que se emplea la longitud de onda correcta. Los usuarios deben asegurarse de conocer bien las instrucciones para el ensayo, especialmente la sección de Advertencias y Precauciones y las Notas de Manipulación y del Procedimiento. Los usuarios deben demostrar que pueden obtener las especificaciones de rendimiento en cuanto a precisión y un rango informable de resultados de la prueba comparables a los establecidos por el fabricante antes de informar de resultados de los pacientes. Se recomienda que los controles positivos y negativos prediluidos se ejecuten por duplicado en todos los ensayos para monitorizar la calidad del procedimiento de prueba. Ejecute el Control de referencia listo para usar por duplicado en todos los ensayos cualitativos.

Suponiendo que se cumplen las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, si el control no cumple las especificaciones de proporción del control siguientes, el ensayo se invalida y no deben informarse los resultados del paciente. El usuario puede repetir el ensayo, habiendo revisado el procedimiento o ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Si repite el ensayo, prepare una dilución nueva de la muestra. Es posible que los laboratorios deseen incluir controles internos en cada ejecución del ensayo. Conserve el material para dicho control a o por debajo de -20° C y evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación. Los conservantes como la azida sódica al 0,1% (p/v) no afectarán a los resultados de la muestra.

Los niveles de analitos identificados en enfermedades concretas son los establecidos por el fabricante para poblaciones específicas y pueden no necesariamente reflejar la bibliografía. Los niveles de incidencia, su relación para enfermedades específicas, los rangos de referencia y los puntos de corte adecuados deben calcularse para las poblaciones específicas a las que sirven los usuarios.

Especificaciones de la proporción de control

Protocolo	Especificaciones				
Cualitativo (proporciones)	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;"><u>Absorbancia del control positivo</u></td> <td style="border: none;">Véase la etiqueta del control positivo</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Absorbancia del control de referencia</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>	<u>Absorbancia del control positivo</u>	Véase la etiqueta del control positivo	Absorbancia del control de referencia	
	<u>Absorbancia del control positivo</u>	Véase la etiqueta del control positivo			
Absorbancia del control de referencia					
	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;"><u>Absorbancia del control negativo</u></td> <td style="border: none;"><0,95</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Absorbancia del control de referencia</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>	<u>Absorbancia del control negativo</u>	<0,95	Absorbancia del control de referencia	
<u>Absorbancia del control negativo</u>	<0,95				
Absorbancia del control de referencia					
Semi- cuantitativo	Véase la etiqueta del control positivo para el rango esperado aceptable (U/mL)				
	Concentración del control negativo < 3 U/mL				

VALORES ESPERADOS

El ELISA anti-PCC EDIA™ mide anticuerpos frente a péptidos sintéticos con residuos de citrulina (anti-PCC). El ELISA anti-PCC EDIA™ se calibra en el ensayo semicuantitativo en unidades arbitrarias usando una mezcla (pool) de sueros de pacientes positivos como calibrador. Los rangos de la curva de calibración van de 0-300 unidades/mL. Estos valores han sido elegidos de forma arbitraria por Euro-Diagnóstica al no existir un estándar internacional reconocido para expresar el título de anticuerpos anti-PCC. La especificidad y sensibilidad se evaluaron en estudios clínicos con 416 pacientes con AR, 531 pacientes con enfermedad distinta de la AR (incluyendo otras enfermedades autoinmunes y diversas enfermedades inflamatorias e infecciosas) y 262 muestras de control de sujetos adultos sanos. La sensibilidad fue del 76%. La especificidad fue del 98% para pacientes con enfermedades que no eran AR y del 99% para individuos aparentemente sanos.

Para determinar el nivel de corte, se realizó un análisis de Curva característica receptor-operador (ROC). El análisis reveló un punto con la menor suma posible de muestras falsas positivas y falsas negativas y en consecuencia, se estableció el corte en 5 U/ml.

Rango de referencia
 ≤5 U/mL = Negativo
 >5 U/mL = Positivo

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Tabla 1. Porcentaje de concordancia del anti-PCC EDIA™ en comparación con un ELISA alternativo anti-PCC. Se ensayaron un total de 678 sueros retrospectivos congelados. Cuatrocientos dieciséis muestras de pacientes con AR y 262 muestras de donantes de sangre aparentemente sanos.

Anti-PCC EDIA™		ELISA alternativo		
		Positivos	Negativos	Total
	Positivos	317	2	319
	Negativos	5	354	359
	Total	322	356	678

Porcentaje de concordancia positiva: $317/322 = 98,4\%$ IC del 95% = 96,4 -99,5%
 Porcentaje de concordancia negativa: $354/356 = 99,4\%$ IC del 95% = 98,0 -99,9%
 Porcentaje de concordancia global: $671/678 = 99,0\%$ IC del 95% = 97,9 -99,6%

El intervalo de confianza (IC) del 95% se calculó usando el método exacto.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad clínicas. Se ensayó un total de 1209 sueros retrospectivos congelados con caracterización clínica. La tabla siguiente resume los resultados.

	n	Negativos	positivos
Donantes de sangre	262	260	2
AR	416	99	317
Enfermedades infecciosas	86	85	1
Enfermedades inflamatorias (no AR)	445	437	8
TOTAL	1209	881	328

(Datos de archivo)

Sensibilidad clínica

AR = $317/416 = 76,2\%$ IC del 95% = 72,1 -80,3%

Especificidad clínica

Donantes de sangre	$260/262 = 99,2\%$	IC del 95% = 97,3 -99,9%
Enfermedades infecciosas	$85/86 = 98,8\%$	IC del 95% = 93,7 -100%
Enfermedades inflamatorias (no AR)	$437/445 = 98,2\%$	IC del 95% = 96,5 -99,2%
Grupos sin AR combinados	$782/793 = 98,6\%$	IC del 95% = 97,5 - 99,3%

El intervalo de confianza (IC) del 95% se calculó usando el método exacto.

Tabla 3. Se determinó la **precisión intraensayo** estudiando seis muestras diferentes ocho veces cada una.

	Alta (U/mL)	Media (U/mL)	Baja (U/mL)
Media	173,9	34,0	9,9
D.E.	13,8	0,6	0,2
%C.V.	7,9	1,9	2,1
	Baja (U/mL)	Baja (U/mL)	Baja (U/mL)
Media	11,8	7,8	9,7
D.E.	0,5	0,1	0,4
%C.V.	4,0	1,9	4,4

Tabla 4. La **precisión** interensayo se determinó estudiando seis muestras diferentes ocho veces cada una. Se obtuvieron los resultados para tres ejecuciones diferentes.

	Alta (U/mL)	Media (U/mL)	Baja (U/mL)
Media	183,8	36,6	9,3
D.E.	19,5	3,0	0,9
%C.V.	10,6	8,2	9,8
	Baja (U/mL)	Baja (U/mL)	Baja (U/mL)
Media	11,9	7,8	10,6
D.E.	0,8	0,7	0,9
%C.V.	6,3	9,5	8,9

Tabla 5. La **variación de lote a lote** se determinó estudiando seis muestras diferentes ocho veces cada una. Se obtuvieron resultados para tres lotes diferentes.

	Alta (U/mL)	Media (U/mL)	Baja (U/mL)
Media	232,5	41,6	11,5
D.E.	30,9	4,5	1,3
%C.V.	13,3	10,8	11,2
	Baja (U/mL)	Baja (U/mL)	Baja (U/mL)
Media	14,1	9,8	13,0
D.E.	1,2	1,0	1,2
%C.V.	8,3	10,4	9,3

Tabla 6. La **recuperación de dilución** se determinó estudiando cinco diluciones seriadas para tres muestras de pacientes diferentes.

Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/mL)	Concentración calculada (U/mL)	% de recuperación corregida por dilución
1	1/100	205,0	205,0	100
	1/200	110,5	102,5	108
	1/400	47,3	51,3	92
	1/800	24,8	25,6	97
	1/1600	10,8	12,8	84
Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/mL)	Concentración calculada (U/mL)	% de recuperación corregida por dilución
2	1/100	138,9	138,9	100
	1/200	70,3	69,5	101
	1/400	40,4	34,7	116
	1/800	18,3	17,4	105
	1/1600	8,7	8,7	100
Muestra	Dilución	Concentración media medida (U/mL)	Concentración calculada (U/mL)	% de recuperación corregida por dilución
3	1/100	47,3	47,3	100
	1/200	26,7	23,6	113
	1/400	13,0	11,8	110
	1/800	6,3	5,9	107
	1/1600	3,0	3,0	103

Límite de detección

El límite de detección del ensayo se determinó ejecutando el calibrador cero 12 veces en tres lotes diferentes. Se calculó el límite de detección de 0,5 U/mL encontrando la media más dos desviaciones estándar.

Estudio de interferencia

Se enriquecieron tres muestras positivas bajas con las siguientes concentraciones en muestras de suero diluidas: Bilirrubina F a 0,188 mg/dl, Bilirrubina C a 0,2 mg/dl, Hemoglobina a 453 mg/dl, Quilo a 0,24 U/dl y Factor reumatoide a 200 UI/ml. Los datos indican que las concentraciones ensayadas no interfieren con los resultados anti-PCC.

Para valorar la posible reactividad cruzada del antígeno IgG CCP con otros autoanticuerpos, se ensayó un total de 405 muestras de diferentes etiologías. Muestras de pacientes diagnosticados de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LES, síndrome de Sjögren, artrosis, esclerodermia, esclerosis múltiple, EMTC, enfermedad inflamatoria intestinal, polimiositis/dermatomiositis, pacientes con enfermedades autoinmunitarias no AR y muestras que reaccionaban con MPO-ANCA, PR3-ANCA y ds-ADN. Los datos indican que los autoanticuerpos ensayados no muestran reacción cruzada significativa.

LIMITACIONES DE USO

1. Un resultado positivo debe usarse conjuntamente con la evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos. Los valores obtenidos de este ensayo están pensados para ser sólo una ayuda en el diagnóstico. Cada médico debe interpretar los resultados conjuntamente con la historia del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. Pueden verse anticuerpos anti-PCC elevados en personas sin pruebas de enfermedad clínica. También, algunas personas con AR pueden tener anticuerpos indetectables. Los niveles de anticuerpos anti-PCC no necesariamente se correlacionan con el estado de la enfermedad.
3. Como los niveles de anticuerpo anti-PCC no necesariamente se correlacionan con el estado de la enfermedad, no debe iniciarse o cambiarse el tratamiento de acuerdo con un resultado positivo. Deben tenerse en cuenta los hallazgos clínicos para todas las decisiones de tratamiento.
4. No se ha establecido la monitorización de niveles de anticuerpo anti-PCC para controlar la progresión y/o la remisión de la AR.
5. No se han establecido las características de rendimiento de este ensayo para muestras pediátricas. No se ha determinado el valor diagnóstico de los anticuerpos anti-PCC para la artritis juvenil.

BIBLIOGRAFÍA












1. Van Boekel M, et al. Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4, 87-93, 2002.
2. Nienhuis R, et al. A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305, 1964.
3. Schellekens G, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273-281, 1998.
4. Van Jaarsveld C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697, 1999.
5. Schellekens, G, et al. The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163, 2000.
6. Bizzaro N, et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry* 47, 1089-1093, 2001.
7. Visser H, et al. How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A predication model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357-365, 2002.
8. Van Venrooij W, et al. Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. *Neth. J. Med.* 60, 383-388, 2002.
9. Vossenaar, E, et al. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262, 2004.
10. Meyer O, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assay in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126, 2003.
11. Rantapää-Dahlqvist S, et al. Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749, 2003.
12. Forslind K, et al. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (Anti-CCP) *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095, 2004.
13. Kastbom A, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089, 2004.
14. van Gaalen F, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 709-715, 2004.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

1. Diluya las muestras 1:101. No diluya los calibradores, el control de referencia, ni los controles positivos y negativos.
2. Añada 100 μ L de control de referencia, controles positivos y negativos/calibradores por duplicado y muestras prediluidas en los pocillos referenciados.
3. Incube durante 60 ± 10 minutos a $18-25^{\circ}$ C.
4. Lave los pocillos 3 veces.
5. Añada 100 μ L de conjugado a cada pocillo.
6. Incube durante 30 ± 5 minutos a $18-25^{\circ}$ C.
7. Lave los pocillos 3 veces.
8. Añada 100 μ L de sustrato a cada pocillo.
9. Incube durante 30 ± 5 minutos a $18-25^{\circ}$ C.
10. Añada 100 μ L de solución de parada a cada pocillo.
11. Lea la absorbancia a 550 nm.

APPENDIX, ANNEXE, APÉNDICE, ANHANG, APPENDICE

Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette

	Batch code / Code du lot / Codice de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Referencia de catálogo
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro
	Temperature limitation/ Limites de temperature/ Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Biological risk/ Risque biologiques / Riesgo biológico / Biogefährdung / Rischio biologico
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbricante
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Ausreichend für "n" Ansätze / Contenuto sufficiente per <n> test
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

Ag	Antigen (coated strips)/ Antigène (barrette revêtue) / Antigeno (tiras recubiertas) / Antigen (beschichtete Streifen) / Antigene (strip sensibilizzate)
CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Coniugato
SUBS	Substrate/ Substrat / Sustrato / Substrat / Substrato
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopp-Lösung / Soluzione di stop
BUF WASH 16X	Wash buffer 16 x concentrate/ Tampon de lavage concentré (16x) / Tampón de lavado concentrado 16x / Waschpufferkonzentrat 16fach / Tampone di lavaggio 16 x concentrato
DIL SPE 5X	Sample diluent 5 x concentrate/ Diluant échantillon (5x) / Diluyente de muestra, concentrado 5x / Probenverdünnungspuffer 5fach / Diluente per campioni 5 x concentrato
CAL	Calibrators/ Étalons / Calibradores / Kalibratoren / Calibratori
CONTROL REF	Reference control/ Contrôle de référence / Control de referencia / Referenzkontrolle / Controllo di riferimento
CONTROL +	Positive control/ Contrôle positif / Control positivo / Positivkontrolle / Controllo positivo
CONTROL -	Negative control/ Contrôle négatif / Control negativo / Negativkontrolle / Controllo negativo

DEUTSCH: VERWENDUNGSZWECK

Das EDIA™ Anti-CCP Test-Kit ist ein enzymgebundener Immunosorbent-Test (ELISA) für den semiquantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen cyclische Citrullin-Peptide (CCP) in Humanserum oder -plasma. Der Test wird zum Nachweis von Antikörpern in einer einzelnen Probe verwendet. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit anderen labordiagnostischen und klinischen Befunden zur Unterstützung der Diagnose auf rheumatoide Arthritis (RA) bestimmt. Die Untersuchung nur von ausgebildetem Laborpersonal durchführen lassen. In-vitro-Diagnostikum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS





Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten systemischen Autoimmunerkrankungen. Die Ätiologie dieser Erkrankung, von der 1-2 % der Weltbevölkerung betroffen sind, ist unbekannt. Die Diagnose der RA hängt in erster Linie von dem klinischen Erscheinungsbild der Krankheit ab. Der einzige in der Routinediagnostik bisher akzeptierte serologische Test ist die Bestimmung des Rheumafaktors (RF). RF sind Antikörper, welche gegen die konstante Region von IgG-Immunglobulinen gerichtet sind. RF weisen eine hohe Sensitivität auf, werden jedoch auch zu einem relativ hohen Prozentsatz bei anderen Autoimmunerkrankungen, Infektionen, und bis zu 15% bei gesunden Personen gefunden.

Es wurden in Seren von RA-Patienten auch andere Antikörper mit einer höheren Spezifität nachgewiesen (siehe Übersicht in 1). Als solch ein potentieller serologischer Parameter sind Anti-perinukleäre-Faktor-Antikörper (APF) in ca. 50 % der RA-Patienten mit einer Spezifität von über 70% beschrieben worden (2). Es wurden eine Anzahl cyclischer synthetischer Peptide, die nicht mit Filaggrin oder anderen bekannten Proteinen in Verbindung stehen, beschrieben, die gezielt von Antikörpern in Seren von RA-Patienten erkannt werden (3). Diese Peptide wurden danach in einem ELISA zur Bestimmung von RA spezifischen Autoantikörpern (3) genutzt. Die klinische Evaluierung dieses Testsystems zeigte, dass für eine signifikante Anzahl gut definierter RA-Patienten eine ausgezeichnete Spezifität gegenüber Kontrollseren erreicht wurde (3-8). Es konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen Anti-CCP-Antikörpern und klinischen Manifestationen wie Gelenk- und radiologischen Schädigungen bei frühen Formen der RA gefunden werden, so dass dieser Parameter für die Prognose von RA-Patienten herangezogen werden kann (7, 9-14). Der von Euro Diagnostica angebotene EDIA™ Anti-CCP-Test enthält hoch gereinigte synthetische Peptide mit Citrullinresten und ist ein zusätzliches Hilfsmittel für die RA-Diagnostik. Dieses Anti-CCP-Kit verwendet verbesserte synthetische Peptide, die eine Spezifität und Sensitivität gewährleisten (8-14).

TESTPRINZIP

Das EDIA™ Anti-CCP Antikörper-Kit basiert auf der ELISA-Methode. Der Test verwendet mit synthetischen Citrullin-Peptiden (Antigen) beschichtete Mikrotiterplatten. Verdünntes Patientenserum oder Plasma wird in die Kavitäten pipettiert und inkubiert. Sind spezifische Antikörper vorhanden, so binden sich diese an die Antigene auf der Mikrotiterplatte. Ungebundene Antikörper werden durch einen Waschschrift entfernt. Gebundene Antikörper reagieren nach Zugabe von mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörpern mit Anti-Human-IgG. Danach erfolgt ein zweiter Waschschrift sowie die Inkubation mit einem chromogenen Substrat. Das Vorhandensein von CCP-spezifischen Antikörpern wird anhand der Farbentwicklung photometrisch bei 450 nm gemessen, die der Menge des gebundenen Antikörpers proportional entspricht.

BESTANDTEILE DES TESTKITS

A	IgG-Konjugat	1 x 15 mL	Polyklonaler mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper gegen humanes IgG von der Ziege, Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1 % (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , Phenolphthaleinmonophosphat (PMP), Pufferlösung. Gebrauchsfertig. Im Dunkeln lagern.	
C	Stopp-Lösung	1 x 15 mL	Natriumhydroxid, EDTA, Carbonatpuffer (pH >10). Gebrauchsfertig.	
D	Waschpuffer-Konzentrat (16fach)	2 x 25 mL	Boratpuffer, 0,4 % (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
E	CCP-beschichtete Kavitäten in einem Rahmen	96 Kavitäten	Mit CCP-Antigen beschichtet, in einer wieder verschließbaren Folienverpackung mit Trockenmittel.	
F	Konzentrat zur Probenverdünnung (5fach)	1 x 25 mL	Phosphatpuffer, Proteinstabilisator, 0,5 % (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
1-6	Anti-CCP Kalibratoren	6 x 1,0 mL	Humanplasma, Puffer, <0,1 % (w/v) Natriumazid. 0, 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Gebrauchsfertig.	
7	Anti-CCP Referenzkontrolle	1 x 1,5 mL	Humanplasma, Puffer, <0,1 % (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
+/-	Positivkontrolle Negativkontrolle	1 x 1,5 mL 1 x 1,5 mL	Humanplasma, Puffer, <0,1 % (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
	Gebrauchsanweisung			

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Anmerkungen zur Handhabung und Verfahrensweise

1. Bestandteile des Kits bei 2-8° C lagern und bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwenden. Keine verfallenen Reagenzien benutzen.
2. Keine unterschiedlichen Chargen-Nummern verwenden.
3. Kits nicht einfrieren.
4. Waschpufferkonzentrat und Konzentrat zur Probenverdünnung muss vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünnte Probenverdünnung sind bei 2-8° C bis zu 6 Monate stabil (bakterielle Kontamination vermeiden).
6. Überzählige Mikrotiterkavitäten in die Folienverpackung zurückgeben und in dem wieder verschließbaren Beutel aus Aluminiumfolie mit Trockenmittel bei 2-8° C bis zum weiteren Gebrauch lagern.
7. Substrat im Dunkeln lagern.
8. Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder jede Probe eine frische Einwegpipettenspitze verwenden.
9. Optimale Ergebnisse werden durch die exakte Befolgung dieser Anweisung erzielt. Während des gesamten Ablaufs ist sorgfältiges Pipettieren und Waschen erforderlich, um Genauigkeit und Richtigkeit zu gewährleisten.

Anzeichen für den Verfall

Das Substrat muss hellgelb sein. Eine rosa Verfärbung weist auf Kontamination hin, woraufhin das Reagenz verworfen werden muss. Eine Trübung oder Ausfällung in den Bestandteilen weist auf einen Verfall hin, woraufhin das Reagenz verworfen werden muss.

Probenentnahme und Lagerung

Für den Test Serum- oder Plasmaproben (EDTA und Heparin) verwenden. Keine stark hämolytischen, lipämischen oder trüben Proben verwenden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen und nicht wieder einfrieren. Proben nicht länger als 48 Stunden bei 4-8° C lagern. Zur längerfristigen Lagerung bei -20° C einfrieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

**Nur zur In-vitro-Diagnostik.
Sicherheitsmaßnahmen**

1. Streng den Anweisungen dieser Beschreibung folgen, ganz besonders die Handhabung und Lagerbedingungen.
2. Die Kontrollen und Kalibratoren enthalten Humanserum. Obwohl getestet und auf HIV 1+2, HCV, HbsAg und HIV-1 Ag als negativ befundet, muss dieses Material als potentiell infektiös betrachtet werden. - Die Centers for Disease Control and Prevention und das National Institute of Health empfehlen, potentiell infektiöse Substanzen nach Biosafety Level 2 zu behandeln.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, wo mit Test-Kits und Proben umgegangen wird, nicht rauchen, essen, trinken oder sich schminken.
5. Hauterkrankungen, Schnitte, Schürfwunden oder andere Hautverletzungen entsprechend schützen.
6. Die Kalibratoren, Kontrollen, das Konjugat, Probenverdünnungs- und Waschpufferkonzentrat enthält Natriumazid, das bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden kann. Bei der Entsorgung mit großen Mengen an Wasser nachspülen, um eine Ansammlung von Azid zu vermeiden.
7. Die Stopp-Lösung enthält Natriumhydroxid. Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Material mit reichlich Wasser aufwischen. Bei Kontakt mit Haut oder Augen mit Wasser spülen und in ärztliche Behandlung begeben.
8. Das Substrat enthält PMP, Bronidox L und Dietanolamin. Kontakt mit Haut, Augen und Atemwege vermeiden. Bei Kontakt mit Haut, Augen oder Atemwege mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
9. Sicherheitsdatenblätter der gefährlichen Bestandteile dieses Kits können auf Anfrage über Euro Diagnostica bezogen werden.

B.



Achtung

SUBS

Enthält: Dietanolamin

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Verursacht schwere Augenreizung. |
| P264: | Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen. |
| P280: | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden. |
| P305+P351+P338: | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. |
| P337+P313: | Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Achtung

Enthält: Natriumhydroxid

- H315: Verursacht Hautreizungen.
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P302+P352: BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P332+P313: Im Falle einer Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Achtung

Enthält: Natriumazid

- H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
 EUH032: Kontakt mit Säure setzt sehr giftige Gase frei.
 H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit lang anhaltender Wirkung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
 P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

VORBEREITUNG

Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien/Geräte

1. Lesegerät für Platten/Streifen mit 96 Kavitäten mit 550 nm Filter (540-565nm zulässig).
2. Präzisionspipetten zur Abgabe von 10 µl, 100 µl, 1 mL. Automatikpipette zur Abgabe von 100 µl. Automatikpipette zur Abgabe von 200 µl zum manuellen Waschen, automatisches Plattenwaschgerät optional.
3. Messzylinder aus Glas oder Kunststoff: 1× 100 mL, 1 × 400 mL.
4. 1 mL Gefäße.
5. Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser.
6. Papierhandtücher.
7. Zeitschaltuhr zum Einstellen von 30 und 60 Minuten.

Testvorbereitung

Vor Gebrauch alle Kit-Komponenten einschließlich der Mikrotiterplatten auf Raumtemperatur bringen (18-25° C). Reagenzien leicht durch Umdrehen mischen.

Referenz-, Positiv- und Negativkontrolle nicht verdünnen.

Folgende Reagenzien und Proben verdünnen und gut mischen.

Reagenz	Volumen	Zugabe von
Waschpufferkonzentrat	1 Fläschchen	375 mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Konzentrat zur Probenverdünnung	1 Fläschchen	100 mL destilliertes/deionisiertes Wasser

Proben	Volumen	Zugabe von
Proben	10 µl	1 mL verdünnte Probenverdünnung

Die Anzahl erforderlicher Mikrotiterkavitäten für den derzeitigen Test berechnen und in den Mikrotiter-Rahmen stecken. Überzählige Kavitäten in die Folienverpackung mit Trockenmittel zurückgeben und bis zum weiteren Gebrauch bei 2-8 °C lagern. Sicherstellen, dass alle Kavitäten mit dem Testaufkleber längs der unteren Kante unterhalb Reihe H fest in dem Mikrotiter-Rahmen sitzen.

TESTANLEITUNG

Qualitative Bestimmung: Referenzkontrolle, positive und negative Kontrollen und Proben testen.

Semi-quantitative Bestimmung: Kalibratoren (1-6), positive und negative Kontrollen und Proben testen.

1. Kavitäten zur Identifizierung beschriften.
2. Im Doppelansatz 100 µl Referenz-, Positiv- und Negativkontrolle/Kalibratoren, sowie vorverdünnte (1:101) Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten Pipettenspitzen wechseln. Dieser Schritt darf für ein Set Kalibratoren/Kontrollen/Proben 15 Minuten nicht überschreiten.
3. 60 ±10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Inhalt der Kavitäten durch schnelles Umdrehen in ein für biologische Materialien geeignetes Waschbecken dekantieren. Dabei die potenziellen Infektionsrisiken der Proben bedenken. Umgekehrte Kavitäten auf Papiertüchern ausklopfen, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen.
5. Kavitäten **dreimal** mit mindestens 200 µl verdünntem Waschpuffer waschen. **Nach jedem Waschschrift dekantieren und überschüssige Flüssigkeit ausklopfen.**
6. 100 µl Konjugat in jede Kavität geben.
7. 30 ±5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
8. Die Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. 100 µl Substrat in jede Kavität geben.
10. 30 ±5 Minuten bei 18-25° C inkubieren. **Nicht dekantieren.**
11. In derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität geben. Zum Mischen leicht gegen die Kavitäten klopfen.
12. Die Kavitäten innerhalb 24 Stunden bei 550 nm (540-565 nm) ablesen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test separat bewerten.

Qualitative Bestimmung

Den Bindungsindex (optische Dichte) für die positiven und negativen Kontrollen und für jede Probe berechnen.

$$\text{Bindungsindex} = \frac{\text{Extinktionswert der Probe oder Kontrolle}}{\text{mittlerer Extinktionswert der Referenzkontrolle}}$$

Benutzer müssen ein Cut-Off zwischen positiven und negativen Proben berechnen, der für ihre Patientenpopulation spezifisch ist. Ergebnisse für von Euro Diagnostica in einer klinischen Prüfung verwendete Patientenpopulationen weisen auf ein folgendes Cut-Off hin:

Bindungsindex Interpretation der Ergebnisse

<0,95	Negativ
≥0,95 bis ≤ 1,0	Grenzwertig, Wiederholung der Bestimmung empfohlen
>1,0	Positiv

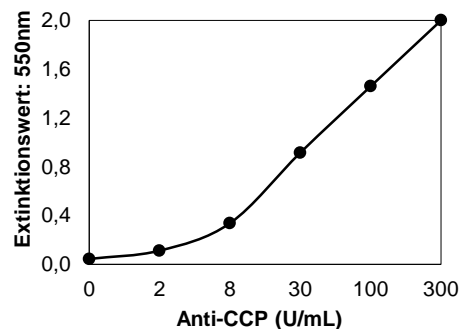
Semi-quantitative Bestimmung

Den Extinktionsmittelwert jedes Kalibrators gegen \log_{10} Konzentration (siehe Tabelle unten) auf entsprechendem Millimeterpapier auftragen. Von dieser Kalibrationskurve können dann die Konzentrationen der Kontrollen und Proben abgelesen werden. Die unten gezeigte, unter Einsatz einer 4-Parameter Logistic (4PL) erstellten typische Kurve dient Anschauungszwecken, nicht zur Interpretation von Ergebnissen verwenden. Proben mit Extinktionen über Kalibrator 6 (300 U/mL) befinden sich außerhalb des Testbereichs und sollten als >300 U/mL angegeben, oder verdünnt und noch einmal getestet werden. Verdünnungsfaktor in die Berechnung mit einbeziehen. Anmerkung: Wie bei jedem Test der Antikörper bestimmt dieser Test anstelle der Konzentration die Aktivität des in der Probe vorhandenen Antikörpers. Die Aktivität kann durch eine Reihe von Faktoren wie der Avidität des Antikörpers beeinträchtigt werden. Proben mit Ergebnissen von ≤ 5 U/ml gelten als negativ. Proben >5 U/ml gelten als positiv.

Kalibrator-Konzentrationen

Kalibrator-Nr.	Konzentration U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	300

Typische Standardkurve



QUALITÄTSKONTROLLE

Sicherstellen, dass das Plattenlesegerät gemäß der Anweisung des Herstellers gewartet und kalibriert wird, und dass die korrekte Wellenlänge eingestellt ist.

Der Anwender muss mit der Testanleitung, besonders mit den Abschnitten Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen sowie Anmerkungen zur Handhabung und Verfahrensweise, vollständig vertraut sein.

Vor der Ausgabe von Testergebnissen für Patienten sollte der Anwender zeigen, dass seine Leistungsspezifikationen für Präzision und der Nachweisbereich der Testergebnisse mit denen des Herstellers vergleichbar sind. Es wird empfohlen, dass die vorverdünnten Positiv- und Negativkontrollen bei allen Ansätzen im Doppelansatz durchgeführt werden, um die Qualität des Testverfahrens zu überwachen. Bei allen qualitativen Tests die gebrauchsfertige Referenzkontrolle im Doppelansatz mitführen.

Unter der Voraussetzung, dass die vom Hersteller beschriebenen Spezifikationen zur Präzision erfüllt sind, gelten alle Kontrollen, die die Spezifikationen des unten genannten Kontrollindex nicht erfüllen, als ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht ausgegeben werden. Der Bediener kann den Test nach Überprüfen des Verfahrens wiederholen, oder sich mit dem Vertrieb/Hersteller in Verbindung setzen. Bei einer Wiederholung des Tests von der Probe eine neue Verdünnung herstellen. Labors können nach Wunsch bei jedem Testlauf eigene interne Kontrollen mitführen. Dieses Kontrollmaterial bei oder unter -20 °C lagern und nach dem Auftauen nicht erneut einfrieren. Konservierungsmittel wie 0,1 % (w/v) Natriumazid haben auf das Testergebnis keinen Einfluss.

Bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesene Analytniveaus sind vom Hersteller für bestimmte Populationen festgelegte Werte, die nicht unbedingt mit der Literatur übereinstimmen müssen. Inzidenzniveaus, ihre Verbindung mit bestimmten Erkrankungen, Referenzbereiche und entsprechende Cut-Off-Punkte sollten für die vom Anwender bedienten spezifischen Populationen berechnet werden.

Spezifikationen des Kontroll-Quotienten

Bestimmung	Spezifikationen
Qualitativ (Quotienten)	<u>Extinktion der Positivkontrolle</u> Extinktion der Referenzkontrolle Siehe Aufkleber der Positivkontrolle
	<u>Extinktion der Negativkontrolle</u> Extinktion der Referenzkontrolle <0,95
Semi- quantitativ	Für zulässigen erwarteten Bereich (U/mL) siehe Aufkleber der Positivkontrolle
	Konzentration der Negativkontrolle < 3 U/mL

ERWARTETE WERTE

Der EDIA™ Anti-CCP ELISA misst Antikörper gegen zyklische synthetische Peptide mit Citrullin-Resten (Anti-CCP). Der semi-quantitative Test ist unter Verwendung von positiven Patientenseren als Kalibrator in arbiträren Einheiten kalibriert. Die Kalibrator-Kurve reicht von 0 -300 U/mL. Euro Diagnostica hat diese Kalibrierung arbiträre gewählt, da keine allgemein (inter)national anerkannten Standardwerte zur Angabe des Titers von Anti-CCP-Antikörpern existieren. Die Spezifität und Sensitivität wurde an 416 RA-Patienten, 531 nicht an RA erkrankten Patienten (einschließlich anderer Autoimmunerkrankungen, ein großer Bereich an entzündlichen und infektiösen Erkrankungen) und 262 gesunden Kontrolle (Proben von Erwachsenen) ermittelt. Die Sensitivität betrug 76 %. Die Spezifität betrug bei nicht an RA erkrankten Patienten 98% und bei anscheinend gesunden Personen 99 %.

Zur Bestimmung des Cut-Off-Werts wurde eine „Receiver Operator Characteristic (ROC)“-Analyse durchgeführt. Die Analyse gab einen Punkt mit der am niedrigsten möglichen Summe an falsch-positiven und falsch-negativen Proben an, woraufhin der Cut-Off auf 5 U/ml eingestellt wurde.

Referenzbereich ≤5U/mL = Negativ >5U/mL = Positiv
--

LEISTUNGSMERKMALE

Tabelle 1. Übereinstimmung in % des EDIA™ Anti-CCP verglichen mit einem anderen CCP-ELISA. Es wurden retrospektiv insgesamt 678 eingefrorene Proben getestet. 416 Proben waren von RA-Patienten und 262 Proben von anscheinend gesunden Blutspendern.

EDIA™ Anti-CCP		Alternativer ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt-
Positiv		317	2	319
Negativ		5	354	359
Gesamt-		322	356	678

Übereinstimmung Positive (%): $317/322 = 98,4\%$ 95 % CI = 96,4 – 99,5 %
 Übereinstimmung Negative (%): $354/356 = 99,4\%$ 95 % CI = 98,0 – 99,9 %
 Übereinstimmung, gesamt (%): $671/678 = 99,0\%$ 95 % CI = 97,9 – 99,6 %

Der 95 % Vertrauensbereich (CI) wurde mit der exakten Methode errechnet.

Tabelle 2. Klinische Sensitivität und Spezifität. Es wurden retrospektiv insgesamt 1209 eingefrorene Proben mit klinischen Eigenschaften getestet. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

	Anzahl	negativ	positiv
Blutspender	262	260	2
RA	416	99	317
Infektionserkrankungen	86	85	1
Entzündliche Erkrankungen (nicht RA)	445	437	8
GESAMT	1209	881	328

(Daten liegen dem Hersteller vor)

Klinische Sensitivität:

RA $317/416 = 76,2\%$ 95 % CI = 72,1 – 80,3 %

Klinische Spezifität

Blutspender	$260/262 = 99,2\%$	95 % CI = 97,3 – 99,9 %
Infektionserkrankungen	$85/86 = 98,8\%$	95 % CI = 93,7 – 100 %
Entzündliche Erkrankungen (nicht RA)	$437/445 = 98,2\%$	95 % CI = 96,5 – 99,2 %
Nicht RA-Gruppen, kombiniert	$782/793 = 98,6\%$	95 % CI = 97,5 – 99,3%

Der 95 % Vertrauensbereich (CI) wurde mit der exakten Methode errechnet.

Tabelle 3. Die **Präzision innerhalb des Tests** wurde durch jeweils 8-maliges Testen von sechs verschiedenen Proben bestimmt.

	Hoch (U/mL)	Mittel (U/mL)	Niedrig (U/mL)
Mittelwert	173,9	34,0	9,9
s	13,8	0,6	0,2
VK %	7,9	1,9	2,1
	Niedrig (U/mL)	Niedrig (U/mL)	Niedrig (U/mL)
Mittelwert	11,8	7,8	9,7
s	0,5	0,1	0,4
VK %	4,0	1,9	4,4

Tabelle 4. Die **Präzision zwischen den Tests** wurde durch Testen sechs verschiedener Proben bestimmt (je acht Mal). Es wurden Ergebnisse aus drei verschiedenen Läufen ermittelt.

	Hoch (U/mL)	Mittel (U/mL)	Niedrig (U/mL)
Mittelwert	183,8	36,6	9,3
s	19,5	3,0	0,9
VK %	10,6	8,2	9,8
	Niedrig (U/mL)	Niedrig (U/mL)	Niedrig (U/mL)
Mittelwert	11,9	7,8	10,6
s	0,8	0,7	0,9
VK %	6,3	9,5	8,9

Tabelle 5. Die **Schwankungen von Charge zu Charge** wurde durch 8-maliges Testen von sechs verschiedenen Proben bestimmt. Es wurden Ergebnisse mit drei verschiedenen Chargen ermittelt.

	Hoch (U/mL)	Mittel (U/mL)	Niedrig (U/mL)
Mittelwert	232,5	41,6	11,5
s	30,9	4,5	1,3
VK %	13,3	10,8	11,2
	Niedrig (U/mL)	Niedrig (U/mL)	Niedrig (U/mL)
Mittelwert	14,1	9,8	13,0
s	1,2	1,0	1,2
VK %	8,3	10,4	9,3

Tabelle 6. Die **Wiederfindung der Verdünnung** wurde durch Testen von 5 Reihenverdünnungen von 3 verschiedenen Patientenproben bestimmt.

Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/mL)	Errechnet Konzentration (U/mL)	Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung
1	1/100	205,0	205,0	100
	1/200	110,5	102,5	108
	1/400	47,3	51,3	92
	1/800	24,8	25,6	97
	1/1600	10,8	12,8	84
Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/mL)	Errechnet Konzentration (U/mL)	Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung
2	1/100	138,9	138,9	100
	1/200	70,3	69,5	101
	1/400	40,4	34,7	116
	1/800	18,3	17,4	105
	1/1600	8,7	8,7	100
Probe	Verdünnung	Mittelwert, gemessene Konzentration (U/mL)	Errechnet Konzentration (U/mL)	Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung
3	1/100	47,3	47,3	100
	1/200	26,7	23,6	113
	1/400	13,0	11,8	110
	1/800	6,3	5,9	107
	1/1600	3,0	3,0	103

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des Tests wurde durch 12-maliges Testen des Nullkalibrator mit 3 verschiedenen Chargen bestimmt. Die Nachweisgrenze von 0,5 U/mL wurde durch Feststellen des Mittelwerts plus 2-Standardabweichungen berechnet.

Interferenzstudie

Drei schwach positive Proben wurden mit den folgenden Konzentrationen in verdünnten Serumproben versetzt: Bilirubin F auf 0,188 µg/dl, Bilirubin C auf 0,2 mg/dl, Hämoglobin auf 453 mg/dl, Chylus auf 0,24 U/dl und Rheuma Faktor auf 200 IU/ml. Die Daten weist darauf hin, dass die getesteten Konzentrationen die Anti-CCP Testergebnisse nicht beeinflussen.

Um eine mögliche Kreuzreaktion von CCP IgG-Antigen mit anderen Autoantikörpern zu beurteilen, wurden insgesamt 405 Proben unterschiedlicher Ätiologie getestet. Proben von Patienten, die mit den Diagnosen M. Crohn, Colitis ulcerosa, SLE, Sjögren-Syndrom, Osteoarthritis, Sklerodermie, Multiple Sklerose, MCTD, entzündliche Darmerkrankung, Polymyositis/Dermatomyositis, nicht-RA Autoimmunpatients und Proben, die mit MPO-ANCA, PR3-ANCA und ds-DNA reagieren. Daten weisen darauf hin, dass die getesteten Autoantikörper keine signifikante Kreuzreaktion zeigten.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Ein positives Ergebnis muss in Verbindung mit einer klinischen Beurteilung und anderer diagnostischer Verfahren gesehen werden. Die mit diesem Test erzielten Werte sind nur zur Unterstützung der Diagnose gedacht. Der Arzt muss die Ergebnisse in Verbindung mit der Patientenanamnese, den Befunden der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Verfahren interpretieren.
2. Erhöhte Anti-CCP Antikörper können bei Personen ohne Anhalt auf eine klinische Erkrankung gefunden werden. Auch können einige Personen mit RA über keine nachweisbaren Antikörper verfügen. Anti-CCP Antikörperspiegel müssen nicht unbedingt mit dem Erkrankungsstatus korrelieren.
3. Aus diesem Grund sollte eine Behandlung nicht wegen eines positiven Ergebnisses begonnen oder verändert werden. Für alle Behandlungsentscheidungen klinische Befunde in die Betrachtung mit einbeziehen.
4. Es wurden keine Anti-CCP Antikörperspiegel für die Überwachung der Progression und/oder Remission der RA festgelegt.
5. Für pädiatrische Proben wurden keine Leistungsmerkmale für diesen Test festgelegt. Der diagnostische Wert von Anti-CCP Antikörpern für die juvenile Arthritis wurde nicht bestimmt.

LITERATUR











1. Van Boekel M, et al. Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4, 87-93, 2002.
2. Nienhuis R, et al. A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305, 1964.
3. Schellekens G, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273-281, 1998.
4. Van Jaarsveld C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697, 1999.
5. Schellekens, G, et al. The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163, 2000.
6. Bizzaro N, et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry* 47, 1089-1093, 2001.
7. Visser H, et al. How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A predication model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357-365, 2002.
8. Van Venrooij W, et al. Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. *Neth. J. Med.* 60, 383-388, 2002.
9. Vossenaar, E, et al. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262, 2004.
10. Meyer O, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assay in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126, 2003.
11. Rantapää-Dahlqvist S, et al. Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749, 2003.
12. Forslind K, et al. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (Anti-CCP) *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095, 2004.
13. Kastbom A, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089, 2004.
14. van Gaalen F, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 709-715, 2004.

ZUSAMMENFASSUNG DES TESTANLEITUNG

1. Proben 1:101 verdünnen. Kalibratoren, Referenz-, Positiv- und Negativkontrollen nicht verdünnen.
2. Im Doppelansatz 100 µl Referenz-, Positiv- und Negativkontrolle/Kalibratoren, sowie vorverdünnte Proben in die entsprechend gekennzeichneten Kavitäten geben.
3. 60 ±10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Kavitäten dreimal waschen.
5. 100 µl Konjugat in jede Kavität geben.
6. 30 ±5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
7. Kavitäten dreimal waschen.
8. 100 µl Substrat in jede Kavität geben.
9. 30 ±5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
10. 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität geben.
11. Extinktion bei 550 nm ablesen.

APPENDIX, ANNEXE, APÉNDICE, ANHANG, APPENDICE

Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette

	Batch code / Code du lot / Codice de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Referencia de catálogo
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro
	Temperature limitation/ Limites de temperature/ Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Biological risk/ Risque biologiques / Riesgo biológico / Biogefährdung / Rischio biologico
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbricante
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Ausreichend für "n" Ansätze / Contenuto sufficiente per <n> test
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

Ag	Antigen (coated strips)/ Antigène (barrette revêtue) / Antigeno (tiras recubiertas) / Antigen (beschichtete Streifen) / Antigene (strip sensibilizzate)
CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Coniugato
SUBS	Substrate/ Substrat / Sustrato / Substrat / Substrato
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopp-Lösung / Soluzione di stop
BUF WASH 16X	Wash buffer 16 x concentrate/ Tampon de lavage concentré (16x) / Tampón de lavado concentrado 16x / Waschpufferkonzentrat 16fach / Tampone di lavaggio 16 x concentrato
DIL SPE 5X	Sample diluent 5 x concentrate/ Diluant échantillon (5x) / Diluyente de muestra, concentrado 5x / Probenverdünnungspuffer 5fach / Diluente per campioni 5 x concentrato
CAL	Calibrators/ Étalons / Calibradores / Kalibratoren / Calibratori
CONTROL REF	Reference control/ Contrôle de référence / Control de referencia / Referenzkontrolle / Controllo di riferimento
CONTROL +	Positive control/ Contrôle positif / Control positivo / Positivkontrolle / Controllo positivo
CONTROL -	Negative control/ Contrôle négatif / Control negativo / Negativkontrolle / Controllo negativo

ITALIANO: USO PREVISTO

Il kit anti-CCP EDIA™ è un dosaggio immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi IgG contro il peptide citrullinato ciclico (CCP) nel siero o nel plasma umano. Il dosaggio viene utilizzato per determinare gli anticorpi in un singolo campione. I risultati del dosaggio devono essere utilizzati come aiuto nella diagnosi dell'artrite reumatoide (AR) in combinazione con altri esami clinici e di laboratorio. L'analisi deve essere eseguita da professionisti di laboratorio esperti. Per uso diagnostico in vitro.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'artrite reumatoide (AR) è una delle più comuni malattie autoimmuni sistemiche. Colpisce l'1-2% della popolazione mondiale e la sua eziologia è sconosciuta. La diagnosi della AR si basa principalmente sulle sue manifestazioni cliniche. L'unico test sierologico usato nella routine è la determinazione del Fattore Reumatoide nel siero. Il Fattore Reumatoide è un anticorpo diretto contro le regioni costanti delle immunoglobuline di classe IgG. Questo anticorpo è comunque presente in percentuali relativamente alte anche in altre malattie autoimmuni, in alcune infezioni e nel 15% degli individui sani.





Anticorpi di natura più specifica sono stati osservati nel siero di pazienti affetti da AR (ved. (1)). Anticorpi anti-fattore perinucleare (APF) sono stati descritti in circa il 50% dei pazienti affetti da AR con una specificità superiore al 70% (2). Di recente è stato descritto un certo numero di peptidi sintetici ciclici non legati alla filaggrina o altre proteine note che vengono riconosciuti dagli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da AR (3). Questa scoperta ha portato allo sviluppo di un numero di peptidi che vengono riconosciuti in modo specifico dagli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti con RA che sono stati utilizzati per la messa a punto di un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione di autoanticorpi specifici (ELISA) (3). Studi clinici hanno dimostrato che il kit ELISA ha dato risultati positivi in un numero significativo di sieri di pazienti affetti da AR conclamata, con una elevata specificità nei confronti dei sieri di controllo (3-8). È stato riscontrato che il dosaggio degli anticorpi anti-CCP ha valore sia diagnostico che prognostico in rapporto al coinvolgimento e al danno articolare rilevabile radiologicamente nella AR in fase precoce (7, 9-14). Il dosaggio anti-CCP EDIA™ distribuito da Euro Diagnostica utilizza peptidi sintetici altamente purificati, contenenti residui di citrullina e costituisce un ulteriore strumento di diagnosi della AR. Questo kit anti-CCP contiene peptidi sintetici di alta qualità, selezionati per le loro prestazioni nella determinazione degli autoanticorpi anti-RA (8-14).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit per la determinazione degli anticorpi anti-CCP EDIA™ è basato sulla metodologia ELISA. Utilizza micropozzetti sensibilizzati con peptidi sintetici citrullinati (antigene). Il siero o il plasma diluito del paziente viene incubato nei micropozzetti. Se gli anticorpi specifici sono presenti si legano all'antigene adeso ai micropozzetti. I micropozzetti vengono quindi lavati per eliminare gli anticorpi non legati e il complesso antigene-anticorpo viene determinato per mezzo di anticorpi anti IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina. A questo passaggio si fa seguire un secondo lavaggio ed un'incubazione con un substrato cromogenico.

La presenza di anticorpi produrrà una reazione colorimetrica, proporzionale alla quantità di anticorpo legato che potrà essere determinato mediante spettrofotometria.

COMPONENTI DEL KIT

A	Coniugato IgG	1 x 15 mL	Anticorpo policlonale caprino anti-IgG umane coniugato con fosfatasi alcalina, tampone Tris, stabilizzatore proteico, <0,1% (p/v) di sodio azide. Pronto per l'uso.	
B	Substrato	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , fenoltaleina monofosfato (PMP), soluzione tampone. Pronto per l'uso. Non esporre alla luce durante la conservazione.	
C	Soluzione bloccante	1 x 15 mL	Idrossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH>10). Pronto per l'uso.	
D	Tampone di lavaggio concentrato (16x)	2 x 25 mL	Tampone borato, 0,4% (p/v) di sodio azide. Diluire prima dell'uso.	
E	Micropozzetti sensibilizzati con CCP e supporto	96 micropozzetti	Sensibilizzati con antigene CCP, in una confezione di fogli di pellicola richiudibile con essiccante.	
F	Diluyente per campioni concentrato (5x)	1 x 25 mL	Tampone fosfato, stabilizzatore proteico, 0,5% (p/v) di sodio azide. Diluire prima dell'uso.	
1-6	Calibratori anti-CCP	6 x 1,0 mL	Plasma umano, tampone, <0,1% (p/v) di sodio azide. 0, 2, 8, 30, 100, 300 U/mL. Pronto per l'uso.	
7	Controllo di riferimento anti-CCP	1 x 1,5 mL	Plasma umano, tampone, <0,1% (p/v) di sodio azide. Pronto per l'uso.	
+/-	Controllo positivo Controllo negativo	1 x 1,5 mL 1 x 1,5 mL	Plasma umano, tampone, <0,1% (p/v) di sodio azide. Pronto per l'uso.	
	Istruzioni per l'uso			

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Note procedurali e per la manipolazione

1. Conservare i componenti del kit a 2-8° C ed utilizzarli entro la data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.
2. Non mescolare numeri di lotto diversi.
3. Non congelare i kit.
4. Tampone di lavaggio concentrato e diluyente per campioni concentrato devono essere diluiti prima dell'uso. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Il tampone di lavaggio diluito e il diluyente per campioni diluito sono stabili a 2-8° C per un massimo di 6 mesi se si evita la contaminazione microbica.
6. Riporre i micropozzetti in eccesso nella confezione di fogli di pellicola e conservare nel sacchetto in foglio di alluminio richiudibile con l'essiccante a 2-8° C fino a quando necessario.
7. Non esporre il substrato alla luce durante la conservazione.
8. Evitare la contaminazione dei reagenti. Utilizzare un puntale nuovo ogni volta che si maneggia un reagente o un campione.
9. La scrupolosa osservanza del presente protocollo consentirà di ottenere ottimi risultati. Le operazioni di pipettaggio e lavaggio devono essere svolte con attenzione durante l'intera procedura per mantenere precisione ed accuratezza.

Segni di deterioramento

Il substrato deve presentare una colorazione giallo pallido. Una colorazione rosa è indice di contaminazione, pertanto il reagente deve essere scartato. Torbidità o precipitazione in qualsiasi componente sono indice di deterioramento, pertanto il componente deve essere scartato.

Prelievo e conservazione del campione

Si consiglia di eseguire il test su campioni di siero/plasma (EDTA e eparina); non utilizzare campioni fortemente lipemici o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni decongelati prima di eseguire il test ed evitare ripetuti congelamenti/scongelamenti. Conservare i campioni per un massimo di 48 ore a 4-8° C. Per periodi più lunghi, congelare i campioni a -20° C.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI**Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.****Precauzioni di sicurezza**

1. Attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel presente opuscolo, in particolare per quanto riguarda le condizioni di manipolazione e conservazione.
2. I controlli e i calibratori contengono siero di origine umana. Sebbene siano stati testati e confermati negativi per la presenza di HIV 1+2, HCV, HbsAg e HIV-1 Ag, questo materiale deve essere trattato come potenzialmente infettivo. – I Centers for Disease Control and Prevention e i National Institutes of Health stabiliscono che gli agenti potenzialmente infettivi vengano trattati secondo quanto previsto per il livello di biosicurezza 2 (Biosafety Level 2).
3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, mangiare, bere o applicarsi cosmetici nelle aree in cui si manipolano kit e campioni.
5. Proteggere in modo adeguato qualsiasi malattia cutanea, ferita, abrasione e altre lesioni cutanee.
6. Calibratori, controlli, coniugato, diluente per campioni concentrato e tampone di lavaggio concentrato contengono sodio azide che può reagire con tubature di rame e piombo e formare composti azido-metallici altamente esplosivi. Eliminare con abbondanti quantità d'acqua per evitare l'accumulo di azidi.
7. La soluzione bloccante contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Lavare eventuali versamenti con abbondanti quantità di acqua. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare con acqua e consultare un medico.
8. Il substrato contiene PMP, Bronidox L e dietanolamina. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e il sistema respiratorio. In caso di contatto con queste parti risciacquare con acqua e consultare un medico.
9. Le schede tecniche sulla sicurezza dei materiali di tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili su richiesta presso Euro Diagnostica.

B.**Attenzione**

SUBS

Contiene: Dietanolamine

- H319: Provoca grave irritazione oculare.
 P264: Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
 P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 P305+P351+P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 P337+P313: Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



C.

SOLN	STOP
------	------

Attenzione

Contiene: Idrossido di sodio

H315:	Provoca irritazione cutanea.
H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P332+P313:	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attenzione

Contiene: Azide di sodio

H302:	Nocivo se ingerito.
EUH032:	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
H412:	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso..
P301+P312:	IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P273:	Non disperdere nell'ambiente.

PREPARAZIONE

Materiali/strumenti necessari ma non forniti

1. Lettore di strip/piastre da 96 micropozzetti con filtro da 550 nm (un filtro da 540-565 nm è accettabile).
2. Pipette di precisione da 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipetta automatica da 100 µL. Pipetta automatica da 200 µL per il lavaggio manuale, dispositivo automatico di lavaggio delle piastre opzionale.
3. Cilindri di misurazione in vetro/plastica: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Contenitori volumetrici da 1 mL.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette di carta.
7. Timer per intervalli di 30 e 60 minuti.

Preparazione al dosaggio

Prima dell'uso, portare tutti i componenti del kit, inclusi micropozzetti, a temperatura ambiente (18-25° C). Mescolare i reagenti capovolgendoli delicatamente.

Non diluire i controlli positivi, negativi e di riferimento.

Diluire i seguenti reagenti e campioni e mescolare con cura.

Reagente	Volume	Aggiungere
Tampone di lavaggio concentrato	1 flacone	375 mL di acqua distillata/deionizzata
Diluyente per campioni concentrato	1 flacone	100 mL di acqua distillata/deionizzata

Campione	Volume	Aggiungere
Campione	10 µL	1 mL di diluyente per campioni diluito

Calcolare il numero di micropozzetti necessari per il test e riporli nel relativo supporto. Riporre i micropozzetti in eccesso nella confezione di fogli di pellicola con l'essiccante e conservare a 2-8° C fino a quando necessario. Assicurarsi che tutti i micropozzetti siano ben fissati nel relativo supporto e che l'etichetta di identificazione del kit si trovi lungo il bordo inferiore sotto la riga H.

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

Protocollo qualitativo: eseguire l'analisi del controllo di riferimento, dei controlli positivi e negativi e dei campioni.

Protocollo semi-quantitativo: eseguire l'analisi dei calibratori (1-6), dei controlli positivi e negativi e dei campioni.

1. Identificare i micropozzetti.
2. Dispensare 100 µL dei controlli positivo, negativo, e di riferimento e dei calibratori in duplicato e dei campioni del paziente pre-diluiti (1:101) negli appositi micropozzetti. Non dimenticare di sostituire i puntali della pipetta tra le varie fasi di addizione. Questo passaggio non deve superare i 15 minuti per nessun set di calibratori/controlli/campioni.
3. Incubare per 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Decantare il contenuto dei micropozzetti capovolgendoli velocemente su un lavello adatto per lo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale rischio infettivo dei campioni. Asciugare esternamente i micropozzetti con le salviette di carta.
5. Lavare i micropozzetti per **tre volte** utilizzando almeno 200 µL di tampone di lavaggio diluito.
Decantare e asciugare dopo ogni fase di lavaggio.
6. Aggiungere 100 µL di coniugato in ogni pozzetto.
7. Incubare per 30±5 minuti a 18-25° C.
8. Ripetere i passaggi 4 e 5.
9. Aggiungere 100 µL di substrato in ogni pozzetto.
10. Incubare per 30±5 minuti a 18-25° C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100 µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto, seguendo lo stesso ordine e con la stessa velocità utilizzata per il substrato. Picchiettare delicatamente i micropozzetti per mescolare.
12. Leggere i micropozzetti entro 24 ore a 550 nm (540-565 nm).

CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Durante il calcolo e l'interpretazione dei risultati, considerare ogni test separatamente.

Protocollo qualitativo

Calcolare il rapporto tra i valori di assorbanza (densità ottica) per i controlli negativi e positivi e per ciascun campione.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{Valore di assorbanza campione o controllo}}{\text{Valore di assorbanza medio controllo di riferimento}}$$

Gli utilizzatori devono calcolare un valore cut-off compreso fra il controllo positivo e il controllo negativo che sia specifico per la popolazione in esame. I risultati ottenuti sulla popolazione testata da Euro Diagnostica hanno indicato i seguenti cut-off:

<u>Rapporto di assorbanza</u>	<u>Interpretazione dei risultati</u>
<0,95	Negativo
≥da 0,95 a ≤1,0	Valore limite - si raccomanda di ripetere il saggio
>1,0	Positivo

Protocollo semi-quantitativo

Interpolare il valore di assorbanza medio di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione \log_{10} (ved. tabella riportata di seguito) sull'apposita carta millimetrata. Sarà quindi possibile ricavare le concentrazioni dei controlli e dei campioni dalla curva di calibrazione; di seguito riportiamo una curva tipica logistica a 4 parametri (4PL) a scopo di riferimento. Essa non deve essere utilizzata per l'interpretazione dei risultati. I campioni con valore di assorbanza al di sopra del calibratore 6 (300 U/mL) sono al di fuori del range del test e devono essere registrati come >300 U/mL o diluiti e ridosati apportando una correzione per questo ulteriore fattore di diluizione.

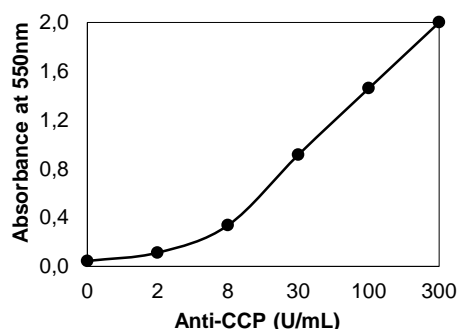
Nota: Come in tutti i test per la determinazione degli anticorpi, questo kit determina l'attività dell'anticorpo presente nel campione piuttosto che la concentrazione. L'attività può essere influenzata da una serie di parametri, come ad esempio l'avidità dell'anticorpo.

I campioni con risultati ≤ 5 U/mL vengono considerati negativi. I campioni con risultati >5 U/mL vengono considerati positivi.

Concentrazioni calibratori

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

Curva standard tipica



CONTROLLO DI QUALITÀ

Assicurarsi che venga eseguita un'adeguata manutenzione e calibrazione del lettore di piastre secondo le istruzioni del produttore e che venga utilizzata la lunghezza d'onda corretta.

Gli utilizzatori devono assicurarsi di conoscere perfettamente le istruzioni del test, in particolare la sezione Avvertenze e precauzioni e le Note procedurali e per la manipolazione.

Prima di registrare i risultati del test del paziente, gli utilizzatori devono dimostrare di saper ottenere specifiche di prestazione per precisione e intervallo riferibile dei risultati del test paragonabili a quelle ottenute dal produttore. Si consiglia di eseguire l'analisi dei controlli positivi e negativi pre-diluiti in duplicato in tutti i dosaggi al fine di monitorare la qualità della procedura di test. Eseguire l'analisi del controllo di riferimento pronto per l'uso in duplicato in tutti i dosaggi qualitativi.

Supponendo che le specifiche di precisione fornite dal produttore vengano soddisfatte, la mancata conformità di un controllo alle specifiche di rapporto dei controlli riportate di seguito rendono il test non valido, pertanto i risultati del paziente non devono essere registrati. L'operatore può ripetere il test dopo aver riesaminato la procedura oppure contattare il distributore/produttore. In caso di ripetizione del test, preparare una nuova diluizione del campione. I laboratori potrebbero voler includere controlli interni in ogni ciclo di dosaggio. Conservare tale materiale di controllo ad una temperatura uguale o inferiore a -20°C ed evitare di ripetere i cicli di congelamento/decongelamento. I conservanti, come la sodio azide a 0,1% (p/v), non influiscono sui risultati del campione.

I livelli di analiti identificati in particolari malattie sono quelli stabiliti dal produttore per popolazioni specifiche e possono non necessariamente rispecchiare la letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto per malattie specifiche, gli intervalli di riferimento e i punti di cut-off adeguati devono tutti essere calcolati per la popolazione specifica presa in esame dagli utilizzatori.

Specifiche di rapporto dei controlli

Protocollo	Specifiche
Qualitativo (rapporti)	<u>Assorbanza controllo positivo</u> Ved. etichetta controllo positivo Assorbanza controllo di riferimento
	<u>Assorbanza controllo negativo</u> <0,95 Assorbanza controllo di riferimento
Semi- quantitativo	Ved. etichetta controllo positivo per l'intervallo previsto accettabile (U/mL)
	Concentrazione controllo negativo < 3 U/mL

VALORI PREVISTI

Il kit ELISA anti-CCP EDIA™ misura gli anticorpi diretti contro i peptidi sintetici con residui di citrullina (anti-CCP). È stato calibrato nel dosaggio semi-quantitativo in unità arbitrarie utilizzando un pool di sieri positivi come calibratore. La curva di calibrazione va da 0 a 300 unità/mL. Tali valori sono stati scelti arbitrariamente da Euro Diagnostica, dato che non esiste in mancanza di uno standard internazionalmente riconosciuto per l'espressione del titolo di anticorpi anti-CCP. La specificità e la sensibilità sono state valutate con 416 pazienti affetti da AR, 531 affetti da malattie diverse dalla AR (incluse altre malattie autoimmuni e una gamma di malattie infiammatorie e infettive) e 262 controlli sani, campioni prelevati da soggetti adulti. La sensibilità è risultata del 76% e la specificità del 98% nei pazienti affetti da malattie diverse dalla AR e del 99% nei soggetti apparentemente sani.

Per determinare il livello cut-off è stata eseguita un'analisi della curva operativa caratteristica (ROC, Receiver Operator Characteristic). L'analisi ha individuato un punto con la somma più bassa possibile di campioni falsi positivi e campioni falsi negativi, pertanto il cut-off è stato fissato a 5 U/mL.

Intervallo di riferimento
 ≤ 5 U/mL = negativo
 > 5 U/mL = positivo

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Tabella 1. Percentuale di concordanza del test anti-CCP EDIA™ rispetto ad un dosaggio anti-CCP ELISA alternativo. Sono stati analizzati in totale 678 campioni di siero retrospettivi congelati. 416 di pazienti affetti da AR e 262 da donatori di sangue apparentemente sani.

		ELISA alternativo		
		Positivi	Negativi	Totale
anti-CCP EDIA™	Positivi	317	2	319
	Negativi	5	354	359
	Totale	322	356	678

Percentuale di concordanza positiva: $317/322 = 98,4\%$ 95% IC = 96,4 – 99,5%
 Percentuale di concordanza negativa: $354/356 = 99,4\%$ 95% IC = 98,0 – 99,9%
 Percentuale di concordanza totale: $671/678 = 99,0\%$ 95% IC = 97,9 – 99,6%

L'intervallo di confidenza al 95% (IC) è stato calcolato utilizzando il metodo esatto.

Tabella 2. Specificità e sensibilità clinica. Sono stati analizzati complessivamente 1209 campioni di siero retrospettivi congelati con caratterizzazione clinica. La seguente tabella riassume i risultati.

	n	negativi	positivi
Donatori di sangue	262	260	2
AR	416	99	317
Malattie infettive	86	85	1
Malattie infiammatorie (non AR)	445	437	8
TOTALE	1209	881	328

(Dati su file)

Sensibilità clinica

AR $317/416 = 76,2\%$ 95% IC = 72,1 – 80,3%

Specificità clinica

Donatori di sangue $260/262 = 99,2\%$ 95% IC = 97,3 – 99,9%
 Malattie infettive $85/86 = 98,8\%$ 95% IC = 93,7 - 100%
 Malattie infiammatorie (non AR) $437/445 = 98,2\%$ 95% IC = 96,5 – 99,2%
 Gruppi combinati non AR $782/793 = 98,6\%$ 95% CI = 97.5 - 99.3%

L'intervallo di confidenza al 95% è stato calcolato utilizzando il metodo esatto.

Tabella 3. La **precisione intra-saggio** è stata determinata testando sei diversi campioni, ognuno per otto volte.

	Elevata (U/mL)	Media (U/mL)	Bassa (U/mL)
Media	173,9	34,0	9,9
D.S.	13,8	0,6	0,2
% C.V.	7,9	1,9	2,1
	Bassa (U/mL)	Bassa (U/mL)	Bassa (U/mL)
Media	11,8	7,8	9,7
D. S.	0,5	0,1	0,4
%C.V.	4,0	1,9	4,4

Tabella 4. La **precisione inter-saggio** è stata determinata testando sei campioni diversi ognuno per otto volte. Sono stati ricavati i risultati per le tre diverse serie.

	Elevata (U/mL)	Media (U/mL)	Bassa (U/mL)
Media	183,8	36,6	9,3
D.S.	19,5	3,0	0,9
% C.V.	10,6	8,2	9,8
	Bassa (U/mL)	Bassa (U/mL)	Bassa (U/mL)
Media	11,9	7,8	10,6
D.S.	0,8	0,7	0,9
%C.V.	6,3	9,5	8,9

Tabella 5. La **variazione da lotto a lotto** è stata determinata testando sei diversi campioni, ognuno per otto volte. Sono stati ricavati i risultati per tre diversi lotti.

	Elevata (U/mL)	Media (U/mL)	Bassa (U/mL)
Media	232,5	41,6	11,5
D.S.	30,9	4,5	1,3
% C.V.	13,3	10,8	11,2
	Bassa (U/mL)	Bassa (U/mL)	Bassa (U/mL)
Media	14,1	9,8	13,0
D.S.	1,2	1,0	1,2
%C.V.	8,3	10,4	9,3

Tabella 6. Il recupero di diluizione è stato determinato testando cinque diluizioni in serie di tre diversi campioni del paziente.

Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/mL)	Concentrazione calcolata (U/mL)	Recupero % diluizione corretto
1	1/100	205,0	205,0	100
	1/200	110,5	102,5	108
	1/400	47,3	51,3	92
	1/800	24,8	25,6	97
	1/1600	10,8	12,8	84
Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/mL)	Concentrazione calcolata (U/mL)	Recupero % diluizione corretto
2	1/100	138,9	138,9	100
	1/200	70,3	69,5	101
	1/400	40,4	34,7	116
	1/800	18,3	17,4	105
	1/1600	8,7	8,7	100
Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (U/mL)	Concentrazione calcolata (U/mL)	Recupero % diluizione corretto
3	1/100	47,3	47,3	100
	1/200	26,7	23,6	113
	1/400	13,0	11,8	110
	1/800	6,3	5,9	107
	1/1600	3,0	3,0	103

Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento del test è stato determinato eseguendo il calibratore zero 12 volte su tre diversi lotti. Il limite di rilevamento di 0,5 U/mL è stato calcolato trovando la media più due deviazioni standard.

Studio di interferenza

Tre campioni positivi bassi sono stati aggiunti alle seguenti concentrazioni in campioni di siero diluiti: Bilirubina F a 0,188 mg/dL, Bilirubina C a 0,2 mg/dL, Emoglobina a 453 mg/dL, Chilo a 0,24 U/dL e Fattore Reumatoide a 200 UI/mL. I dati indicano che le concentrazioni analizzate non interferiscono con i risultati del test anti-CCP.

Per valutare la potenziale reazione crociata dell'antigene igG CCP con altri autoanticorpi, sono stati analizzati un totale di 405 campioni di diversa eziologia. Campioni prelevati da pazienti a cui erano stati diagnosticati morbo di Crohn, colite ulcerosa, LES, sindrome di Sjögren, osteoartrite, sclerodermia, sclerosi multipla, MCTD, malattia infiammatoria intestinale, polimiositi/dermatomiositi, pazienti autoimmuni non AR e campioni reattivi a MPO-ANCA, PR3-ANCA e ds-DNA. I dati indicano che gli anticorpi esaminati non mostrano alcuna significativa reazione crociata.

LIMITAZIONI D'USO

1. Un risultato positivo deve essere valutato in combinazione con le procedure di valutazione clinica e altri procedimenti diagnostici. I valori ottenuti con questo test devono essere considerati solo come aiuto nella diagnosi. Ogni medico deve interpretare i risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami fisici e di altri procedimenti diagnostici.
2. Livelli di anticorpi anti-CCP elevati possono essere riscontrati in soggetti senza alcuna evidenza di malattia clinica. Inoltre è possibile che alcuni soggetti affetti da AR abbiano anticorpi non rilevabili. I livelli di anticorpi anti-CCP non sono necessariamente correlati allo stato di malattia.
3. Poiché i livelli di anticorpi anti-CCP non sono necessariamente correlati allo stato di malattia, non avviare né modificare il trattamento sulla base di un risultato positivo. È necessario prendere in considerazione gli esami clinici per tutte le decisioni relative al trattamento.
4. Non è stato stabilito il monitoraggio dei livelli di anticorpi anti-CCP per la progressione e/o la remissione della AR.
5. Non sono state stabilite le caratteristiche di prestazione di questo dosaggio per i campioni pediatrici. Il valore diagnostico degli anticorpi anti-CCP per l'artrite giovanile non è stato determinato.

BIBLIOGRAFIA












1. Van Boekel M, et al. Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4, 87-93, 2002.
2. Nienhuis R, et al. A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis. The anti perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 302-305, 1964.
3. Schellekens G, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273-281, 1998.
4. Van Jaarsveld C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 689-697, 1999.
5. Schellekens, G, et al. The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163, 2000.
6. Bizzaro N, et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry* 47, 1089-1093, 2001.
7. Visser H, et al. How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A predication model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357-365, 2002.
8. Van Venrooij W, et al. Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. *Neth. J. Med.* 60, 383-388, 2002.
9. Vossenaar, E, et al. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239-262, 2004.
10. Meyer O, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assay in early Rheumatoid Arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis* 62, 120-126, 2003.
11. Rantapää-Dahlqvist S, et al. Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741-2749, 2003.
12. Forslind K, et al. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (Anti-CCP). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1090-1095, 2004.
13. Kastbom A, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project). *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085-1089, 2004.
14. van Gaalen F, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 709-715, 2004.

SOMMARIO DEL PROTOCOLLO

1. Diluire i campioni 1:101. Non diluire i calibratori, i controlli positivi, negativi o di riferimento.
2. Dispensare 100 μ L dei controlli positivi, negativi o di riferimento/calibratori in duplicato e campioni pre-diluiti nei micropozzetti identificati.
3. Incubare per 60 ± 10 minuti a $18-25^{\circ}$ C.
4. Lavare i micropozzetti per 3 volte.
5. Aggiungere 100 μ L di coniugato in ogni pozzetto.
6. Incubare per 30 ± 5 minuti a $18-25^{\circ}$ C.
7. Lavare i micropozzetti per 3 volte.
8. Aggiungere 100 μ L di substrato in ogni pozzetto.
9. Incubare per 30 ± 5 minuti a $18-25^{\circ}$ C.
10. Aggiungere 100 μ L di soluzione di stop in ogni pozzetto.
11. Leggere l'assorbanza a 550 nm.

APPENDIX, ANNEXE, APÉNDICE, ANHANG, APPENDICE

Symbols used on labels / Symboles utilisés sur les étiquettes / Simbolos usados en las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Simboli utilizzati sulle etichette

	Batch code / Code du lot / Codice de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Referencia de catálogo
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro
	Temperature limitation/ Limites de temperature/ Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Biological risk/ Risque biologiques / Riesgo biológico / Biogefährdung / Rischio biologico
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbricante
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Ausreichend für "n" Ansätze / Contenuto sufficiente per <n> test
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

Ag	Antigen (coated strips)/ Antigène (barrette revêtue) / Antigeno (tiras recubiertas) / Antigen (beschichtete Streifen) / Antigene (strip sensibilizzate)
CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Coniugato
SUBS	Substrate/ Substrat / Sustrato / Substrat / Substrato
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopp-Lösung / Soluzione di stop
BUF WASH 16X	Wash buffer 16 x concentrate/ Tampon de lavage concentré (16x) / Tampón de lavado concentrado 16x / Waschpufferkonzentrat 16fach / Tampone di lavaggio 16 x concentrato
DIL SPE 5X	Sample diluent 5 x concentrate/ Diluant échantillon (5x) / Diluyente de muestra, concentrado 5x / Probenverdünnungspuffer 5fach / Diluente per campioni 5 x concentrato
CAL	Calibrators/ Étalons / Calibradores / Kalibratoren / Calibratori
CONTROL REF	Reference control/ Contrôle de référence / Control de referencia / Referenzkontrolle / Controllo di riferimento
CONTROL +	Positive control/ Contrôle positif / Control positivo / Positivkontrolle / Controllo positivo
CONTROL -	Negative control/ Contrôle négatif / Control negativo / Negativkontrolle / Controllo negativo

EURO DIAGNOSTICA AB
Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
E-mail: info@eurodiagnostica.com
www.eurodiagnostica.com