



DCM117-2
Ed. 03/2012

Anti CCP

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro i peptidi citrullinati ciclici (CCP) nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO117

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Anti CCP è un test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida sviluppato per la determinazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG diretti contro i peptidi citrullinati ciclici, presenti nel siero o nel plasma umano.

Il kit Anti CCP è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Artrite Reumatoide (AR) è una delle malattie autoimmuni più diffuse (1-2% popolazione europea). La manifestazione clinica più significativa è una infiammazione delle membrane sinoviali che porta a dolorosi rigonfiamenti delle articolazioni e all'anchilosi.

Nel porre la diagnosi di AR come quadro clinico a sé stante è necessario poter escludere con sicurezza altre forme di artrite: in tale percorso diagnostico il laboratorio gioca un ruolo importante con la determinazione dei fattori reumatoidi (FR), anticorpi di classe IgM rilevabili nel 60-80% dei pazienti con AR. I FR sono marcatori sensibili ma non molto specifici; per contro gli Anti CCP sono caratterizzati da una specificità di oltre il 90% per AR e sono rilevabili ad uno stadio molto precoce, subclinico della malattia. Circa il 70% dei pazienti con AR sono positivi per Anti CCP a fronte di solo il 2% dei soggetti di controllo.

La loro determinazione risulta quindi utile nella diagnosi della AR e in particolare nei casi di artriti erosive, nell'infanzia e nei casi di AR giovanile.

Appaiono, inoltre, utili nel differenziare le collagenopatie con artrite concomitante dalla AR. Presentano un importante valore prognostico nell'evoluzione di danni articolari rilevabili radiologicamente. La loro determinazione quantitativa è utile nel controllo e verifica della terapia farmacologica. L'utilizzo insieme alla determinazione del FR massimizza il rapporto sensibilità/specificità. Non va dimenticato infatti che il 20% delle AR sono FR-negative e che il 15/20% delle AR sono positive solo al FR. La contemporanea positività al FR e CCP ha un valore predittivo positivo quasi del 100%. I livelli di anticorpi Anti CCP non sono necessariamente correlati allo stadio evolutivo della malattia. Il grande pregio degli anticorpi Anti CCP è quello di essere riscontrabili nel siero dei pazienti fino a 10 anni prima della comparsa dei sintomi. Inoltre nei casi di artrite precoce la positività al test secondo alcuni studi è correlabile al successivo sviluppo di lesioni erosive ossee a livello delle articolazioni.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti CCP si basa sul legame degli anticorpi presenti con i peptidi citrullinati ciclici adsorbiti sulla micropiastra. Nella prima fase gli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti si legano alla

superficie interna dei pozzetti. Dopo 60 minuti di incubazione la micropiastra viene lavata con tampone di lavaggio per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito. Successivamente una soluzione di immunoglobuline anti IgG umane coniugate con perossidasi di rafano riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante tampone di lavaggio. Infine si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale.

La concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- Anti CCP Calibrators (5 fialoni, 1,0 mL ciascuno)
CAL1 REF DCE002/11706-0
CAL2 REF DCE002/11707-0
CAL3 REF DCE002/11708-0
CAL4 REF DCE002/11709-0
CAL5 REF DCE002/11710-0
- Control (1 fialone, 1,0 mL, pronto all'uso)
Controllo Positivo REF DCE045/11702-0
- Sample diluent (1 fialone, 100 mL)
REF DCE053/11753-0
- Conjugate (1 fialone, 15 mL)
Sheep anti human-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/11702-0
- Coated Microplate
(1 micropiastra breakable con peptidi citrullinati ciclici adsorbiti) REF DCE002/11703-0
- TMB Substrate (1 fialone, 15 mL)
3,3',5,5'-tetrametilbenzidina REF DCE004/11704-0
- Stop Solution (1 fialone, 15 mL)
Acido solforico 0,25 M REF DCE005/11705-0
- 10X Conc. Wash Solution (1 fialone, 100 mL)
REF DCE054/11754-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm).

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente $\text{TMB}/\text{H}_2\text{O}_2$ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolarli accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE:** il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali,

flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.

A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reagente decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₁...C₅)

Per gli anticorpi Anti CCP il sistema di misurazione è calibrato in unità espresse come U/mL. Queste unità mostrano un fattore costante 1:12 rispetto al WHO Reference Standard W1066 per artriti reumatoidi. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	1	20	40	400	2000

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Le matrici di elezione per la determinazione degli anticorpi Anti CCP sono siero o plasma umano. **Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent;** ad esempio 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione. I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C fino a 3 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi i campioni dovrebbero essere congelati a -20 °C. Per evitare

ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Evitare l' utilizzo di campioni fortemente lipemici o emolizzati.
Il Controllo è pronto all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni flacone di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli, per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.**
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₁-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione o Controllo	Bianco
Calibratore C ₁ -C ₅	100 µL		
Controllo		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 60 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. RISULTATI

7.1. Criteri di validità

I campioni che abbiano OD superiori rispetto al Calibratore 5 (2000 U/mL) dovrebbero essere diluiti ulteriormente e la concentrazione di anticorpi Anti CCP dovrebbe essere calcolata applicando il fattore di diluizione

7.2. Curva di calibrazione

Per il test Anti CCP il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti CCP. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

N	OD1	OD2	mean	U/mL
CAL1	0.037	0.043	0.040	1
CAL2	0.304	0.285	0.295	20
CAL3	0.514	0.551	0.533	40
CAL4	1.771	1.589	1.680	400
CAL5	2.631	2.284	2.458	2000
Patient 1	1.024	1.019	1.022	103

8. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti CCP IgG:

Anti CCP (U/mL)	
Normale	< 30
Elevato	≥ 30

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di Anti CCP sierici.

8.1. Sensibilità e Specificità

I risultati ottenuti hanno mostrato una sensibilità clinica del 79% e una specificità del 97% per la diagnosi dell'artrite reumatoide.

8.2. Limite di rilevabilità

La minor concentrazione di anti CCP che può essere distinta dal Calibratore zero è di circa 1,12 U/mL con limite di confidenza del 98%.

8.3. Intra-assay ed inter-assay

8.3.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 12 volte due diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è $\leq 5,5\%$

8.3.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di un siero di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-assay è $\leq 6,8\%$.

9. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Bizzaro N. et al. Diagnostic Accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem 47:6, 1089-1093,2001
2. Schellekens G. et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 43:155-163 (2000)
3. Baeten D. et al. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum 44:2255-2262 (2001)
4. del Val del Amo N, Ibanez Bosch R, Fito Manteca C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: relation with disease aggressiveness. Clin Exp Rheumatol. 2006;24(3):281-6
5. Samanci N, Ozdem S, Akbas H, et al. Diagnostic value and clinical significance of Anti CCP in patients with advanced rheumatoid arthritis. J Natl Med Assoc. 2005;97(8):1120-6
6. Matsui T, Shimada K, Ozawa N, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2006;33(12):2390-7
7. Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, et al. Validazione del primo Calibratore internazionale WHO per gli anticorpi anti-Peptidi Citrullinati RiMEL/IJLaM 2008; 4(suppl): F23 – 203
8. Kroot EJ, De Jong BA, Van Leeuwen MA, Swinkels H, Van den Hoogen FH, Van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinate peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43: 1831-5.

Ed. 03/2012

DCM117-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. 0039-0742-24851
Fax 0039-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM117-2
Ed. 03/2012

Anti CCP

for routine analysis

Quantitative determination of IgG antibodies against cyclical citrullinated peptides (CCP) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO117

INTENDED USE

Anti CCP kit is an immunoenzymatic test (ELISA), intended for the quantitative determination of IgG class antibodies directed against cyclic citrullinated peptides, present in human serum or plasma.

Anti CCP kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune diseases (1-2% European population). The most significant clinical symptom is an inflammation of the synovial membranes which causes a painful swelling of the articulations and the ankylosis.

In order to correctly diagnose RA it is necessary to exclude other forms of arthritis: in such a diagnostic process, the laboratory plays an important role in the determination of Rheumatoid Factor (RF) antibodies of class IgM, detectable in 60-80% of the patients with RA. The RF antibodies are sensitive but not very specific markers; on the contrary, Anti CCPs are characterized by a specificity of over 90% in patients affected by RA, and are detectable in a very early asymptomatic stage in the approximately 70% of RA patients whereas only 2% of the control subjects resulted positive.

Therefore, the presence of Anti CCP antibodies can be used in the diagnosis of RA, particularly in the case of erosive arthritis, in childhood in the case of juvenile RA.

The test also appears, to be useful in differentiating the collagen pathologies with concomitant arthritis from the RA. The Anti CCP antibodies test has an important prognostic value in the monitoring of articular radiologically detectable damage. The kit's quantitative determination is useful in the control and verification of the effects of pharmacological therapy.

The Anti CCP antibody test, together with the determination of RF, increases the ratio of sensitivity / specificity. 20% of the RAs are RF-negative and 15/20% of the RAs are positive only to RF. The simultaneous positive result of a sample to RF and CCP has a positive predictive value of about 100%.

The levels of Anti CCP antibodies are not necessarily correlated to the evolutionary stage of the illness. The advantage of the Anti CCP antibodies is that they are detectable in the patient sera up to 10 years prior to the appearance of symptoms. In addition, in cases of early arthritis a positive test result, according to some studies is related to the development of bone erosive lesions of the articulations.

2. PRINCIPLE

Anti CCP test is based on the binding of the antibodies present in the sample, to the cyclical citrullinated peptides adsorbed on the microplate.

In the first step the antibodies present in the calibrators, in the controls or in the prediluted patient samples are bound to the internal surface of the wells. After 60 minutes of incubation, the microplate is washed with a wash buffer to remove the non-reacted serum components. Then a solution of anti-human IgG conjugated with peroxidase recognizes the antibodies of class IgG bound to the immobilized antigens.

After 30 minutes of incubation the excess of enzyme conjugate, that is not specifically bound, is removed by the wash buffer. At this point, a substrate solution containing chromogenic TMB is added to the microplate. After 15 minutes of incubation the colour development is stopped by adding the stop solution. The solution turns yellow at this point. The level of developed colour is directly proportional to the concentration of the anti CCP IgG antibodies present in the original sample.

The concentration of the anti CCP IgG antibodies in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Anti CCP Calibrators (5 vials, 1,0 mL each)

CAL1

REF DCE002/11706-0

CAL2

REF DCE002/11707-0

CAL3

REF DCE002/11708-0

CAL4

REF DCE002/11709-0

CAL5

REF DCE002/11710-0

2. Control (1 vial, 1,0 mL, ready to use)

Positive Control

REF DCE045/11702-0

3. Sample diluent (1 vial, 100 mL)

REF DCE053/11753-0

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Sheep anti human-IgG conjugate with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/11702-0

5. Coated Microplate

(1 breakable microplate coated with cyclical citrullinated peptides)

REF DCE002/11703-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

REF DCE004/11704-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0,25M

REF DCE005117/05-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 100 mL)

REF DCE054/11754-0

3.2. Necessary Reagents not supplied

Distilled water

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm).

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent $\text{TMB}/\text{H}_2\text{O}_2$ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the

procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.

For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.

- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of CALibrators (C₁...C₅)

For Anti CCP antibodies the system of measurement is calibrated in U/mL. These units show a constant factor of 1:12 in comparison to the Standard WHO Reference W1066 for rheumatoid arthritis. The Calibrators are ready to use and have the following concentrations:

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	1	20	40	400	2000

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Sample preparation

The samples for the determination of the Anti CCP antibodies are human serum or plasma. **All samples of serum or plasma must be prediluted 1:100 with sample diluents;** for example 10 µL of sample can be diluted with 990 µL of sample diluent.

Draw the blood through venous collection in a vacutainer and separate the serum (after clot formation) or the plasma from the cells by centrifugation.

The samples can be stored refrigerated at 2-8 °Cs for up to 3 days. For longer periods of storage the samples should be frozen to -20°C. To avoid repeated freezing and thawing, the samples should be fractioned. Avoid the use of samples with high levels of lipids or hemolysis.

The Controls are ready to use.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals. In this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals is observed. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL taking care also to transfer the crystals completely, then mix until the crystals are completely dissolved.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.**
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₁-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₁ -C ₅	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate for 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of the diluted wash solution.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate for 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank within 5 minutes.			

7. RESULTS

7.1. Validating the Results

The samples having an OD value higher the Calibrator 5 (2000 U/mL) should be subsequently diluted and the concentration of Anti CCP antibodies should be calculated applying the dilution factor.

7.2. Calibration curve

For the Anti CCP test the method of choice for treatment of results is a 4-parameter-fit with axes Lin-Log for optical density and concentration, respectively. Also, it is possible to use a smoothed spline approximation and coordinated Lin-Log. However, it is recommended to use a Lin-Log curve.

First calculate the average optical density with calibrators. Use a sheet of paper with Lin-Log axes and plot averaged

optical density of each calibrator versus their concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Typical results (to consider only as an example)

The below reported table shows the typical results for the Anti CCP test. The data are to be considered as example only and not be used for the calculation of the results

N	OD1	OD2	mean	U/mL
CAL1	0.037	0.043	0.040	1
CAL2	0.304	0.285	0.295	20
CAL3	0.514	0.551	0.533	40
CAL4	1.771	1.589	1.680	400
CAL5	2.631	2.284	2.458	2000
Patient 1	1.024	1.019	1.022	103

8. REFERENCE VALUES

In a study of the normal values performed with samples of serum from healthy donors, the followings intervals of normality with the Anti CCP IgG test have been determined

Anti CCP (U/mL)	
Normale	< 30
Elevato	≥ 30

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

The positive results should be verified relative to the clinical state of the patient. In addition, every decision related to the therapy should be taken on an individual patient basis. Each laboratory should establish its own normal and pathological intervals of serum Anti CCP.

8.1. Sensitivity and Specificity

The obtained results have shown a 79% clinical sensitivity and a 97% specificity for the diagnosis of rheumatoid arthritis.

8.2. Detection limit

The lowest concentration of anti CCP that can be distinguished from the Calibrator zero is 1.12 U/mL with 98% confidence limit.

8.3. Intra-assay and inter-assay

8.3.1. Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 12 times two different sera with values in the range of calibration curve. The within assay variability is ≤ 5.5%.

8.3.2. Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate the measurements of one control serum with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is ≤ 6.8%.

9. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Bizzaro N. et al. Diagnostic Accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 47:6, 1089-1093,2001
2. Schellekens G. et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43:155-163 (2000)
3. Baeten D. et al. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 44:2255-2262 (2001)
4. del Val del Amo N, Ibanez Bosch R, Fito Manteca C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: relation with disease aggressiveness. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(3):281-6
5. Samanci N, Ozdem S, Akbas H, et al. Diagnostic value and clinical significance of Anti CCP in patients with advanced rheumatoid arthritis. *J Natl Med Assoc.* 2005;97(8):1120-6
6. Matsui T, Shimada K, Ozawa N, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2006;33(12):2390-7
7. Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, et al. Validazione del primo Calibrator internazionale WHO per gli anticorpi anti-Peptidi Citrullinati RIMEL/IJLaM 2008; 4(suppl): F23 – 203
8. Kroot EJ, De Jong BA, Van Leeuwen MA, Swinkels H, Van den Hoogen FH, Van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinate peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-5.

Ed. 03/2012

DCM117-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. 0039-0742-24851
Fax 0039-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM117-2
Ed. 03/2012

Anti CCP

para análisis diagnóstico

Prueba inmunoenzimática para la determinación cuantitativa de los anticuerpos clase IgG contra los péptidos cíclicos citrulinados en suero o plasam humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO117

USO PREVISTO

El kit Anti CCP es un test inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida para la determinación cuantitativa de los anticuerpos clase IgG dirigidos contra los péptidos cíclicos citrulinados presentes en el suero o plasma humano.

El kit Anti CCP es para uso exclusivo en el laboratorio.

1. IMPORTANCIA CLINICA

La Artritis Reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmunes más frecuente (1-2% de la población). La manifestación clínica más significativa es una inflamación de las membranas sinoviales con hinchazón dolorosa de las articulaciones y anquilosis. En el diagnóstico de la AR se debe excluir con seguridad otras formas de artritis: en este punto el laboratorio juega un papel importante a través de la determinación de los Factores Reumatoides, anticuerpos de clase IgM detectables en el 60-80% de los pacientes con AR. Los FR son marcadores sensibles pero no muy específicos, por otro lado los anticuerpos Anti CCP muy específicos para AR (más del 90%) y detectables en un estadio muy precoz, estado subclínico de la enfermedad. Alrededor del 70% de los pacientes con AR son positivos al test de Anti CCP versus el 2% del grupo control. Por lo tanto su determinación resulta muy útil en el diagnóstico de la AR en particular en los casos de artritis erosivas, en la infancia y en los casos de AR juvenil. Son útiles en diferenciar colagenopatías artríticas de la AR, tiene un valor pronóstico en la evolución de los daños articulares evaluado radiológicamente. Su determinación cuantitativa es importante para el control de la terapia farmacológica, si se utilizan en conjunto con la determinación de FR se maximiza la relación sensibilidad/especificidad. No debe olvidarse que el 20% de las AR son FR negativas, el 15-20% de las AR son positivas únicamente a los test de FR. La contemporánea positividad de Anti CCP y FR tiene un valor predictivo del 100%. Los niveles de anticuerpos Anti CCP no son necesariamente correlacionados con el estadio evolutivo de la AR, de hecho el mayor valor de la prueba es su capacidad de detectar los anticuerpos Anti CCP hasta 10 años antes del apareamiento de los síntomas. Además en los casos de artritis precoz la positividad al test, según algunos estudios, se correlaciona con el desarrollo posterior de lesiones óseas erosivas a nivel de las articulaciones.

2. PRINCIPIO DEL METODO

El test Anti CCP se basa sobre la unión de los anticuerpos presentes en la muestra con los péptidos cíclicos citrulinados ligados al micropozo. Los anticuerpos presentes en los controles, Calibradores y muestras se unen a la superficie interna de los micropozos, después de

60 minutos de incubación la microplaca se lava con la solución de lavado para eliminar los componentes que no han reaccionado. Una solución de inmunoglobulinas anti-human IgG conjugada con peroxidasa de rábano reconoce los anticuerpos de clase IgG ligados a los antígenos inmovilizados. Después de 30 minutos de incubación el exceso de conjugado enzimático se elimina con un lavado. Se agrega a los pozos una solución cromogénica (sustrato TMB) y después de 15 minutos se agrega la solución de parada. El color de la solución se torna amarillo. La intensidad de color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra original.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

- Anti CCP Calibradores (5 viales, 1 mL cada uno)
CAL1 REF DCE002/11706-0
CAL2 REF DCE002/11707-0
CAL3 REF DCE002/11708-0
CAL4 REF DCE002/11709-0
CAL5 REF DCE002/11710-0
- Control (1 vial, 1,0 mL, listo para el uso)
Control Positivo REF DCE045/11702-0
- Diluyente de muestra (1 vial, 100 mL)
REF DCE053/11753-0
- Conjugado (1 vial, 15 mL)
Anti IgG humana (de oveja) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)
REF DCE002/11702-0
- Microplaca
(1 microplaca fraccionable marcada con péptidos cíclicos citrulinados)
REF DCE002/11703-0
- TMB Substrato (1 vial, 15 mL)
3,3', 5,5'-tetrametilbencidina 0,26 g/L, peróxido de hidrogeno 0,05%
REF DCE004/11704-0
- Solución de parada (1 vial, 15 mL)
Acido sulfúrico 0,25M
REF DCE005/11705-0
- Solución de lavado 10X (1 vial, 100 mL)
REF DCE054/11754-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada.

3.3. Materiales requeridos

Dispensadores automáticos.
Lector de microplacas (450 nm)

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los Controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavado para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para

determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugado y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso**. Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

El sistema de medición para los anticuerpos Anti CCP se ha calibrado en unidades expresadas como U/mL. Estas unidades muestran un factor constante de 1:12 con respecto al WHO Reference Standard W1066 para las artritis reumatoides. Los Calibradores están listos para usarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	1	20	40	400	2000

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparación de la muestra

Utilice muestra de suero o plasma humano. **Todas las muestras deben ser diluidas 1:100 con el diluyente de muestra**, por ejemplo 10µL de muestra con 990 µL de diluyente de muestra. Extraer la muestra por punción venosa con sistema vacutainer, separar el suero por centrifugación después de la formación del coagulo. Las muestras pueden conservarse a 2°-8°C durante tres días, por periodos de conservación prolongados congelar a -20°C. Evitar repetidas tandas de congelación y

descongelación, si es necesario alicuotar las muestras. Evitar el uso de muestra fuertemente hemolizadas o lipemicas.

Los controles son listo para usar.

6.3. Preparación de la Solución de Lavado

Antes de su uso diluya el contenido de cada vial de solución de lavado concentrada (10X) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Si quiere preparar cantidades menores agregue una parte de solución de lavado concentrada mas nueve partes de agua destilada. La solución de lavado diluida es estable 30 días almacenada 2-8° C. En la solución de lavado concentrada puede aparecer cristales, en este caso llevar a temperatura ambiente y mezclar hasta disolución o bien aforar el contenido a un litro (incluya los cristales) y agitar hasta completa disolución.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.**
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₁-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Control	Blanco
Calibradores C ₁ -C ₅	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra Diluida		100 µL	
Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22-28°C) Descartar el sobrenadante y lavar los pozos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C) Descartar el sobrenadante y lavar los pozos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente al resguardo de la luz (22-28°C).			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco en un plazo de 5 minutos.			

7. RESULTADOS

7.1. Criterios de validez

Las muestras con valores de OD superiores al Calibrador 5 (2,000 U/mL) deberían diluirse y la concentración obtenida corregirse por el factor de dilución.

7.2. Curva de calibración

Para el test Anti CCP el método de cálculo de elección para el tratamiento de los resultados es elaborar un cálculo de 4 parámetros con ejes lin-log, se pueden también utilizar aproximaciones spline y coordenadas Log-Log. Nuestra recomendación es utilizar una curva Lin-Log.

Primero se calculan los promedios de las absorbancias de los Calibradores, utilizar un papel lin-log y trazar las OD de los Calibradores versus su concentración respectiva. Unir los puntos con la mejor curva (pueden unirse por segmentos rectos) y calcular la concentración de las muestras interpolando los valores de OD en la curva.

Resultados típicos (considérese como un ejemplo):

La tabla ejemplifica resultados típicos para el test de Anti CCP, los datos reportados son ejemplificativos y no deben utilizarse para el cálculo de las concentraciones de las muestras.

N	OD1	OD2	Media	U/mL
C ₁	0.037	0.043	0.040	1
C ₂	0.304	0.285	0.295	20
C ₃	0.514	0.551	0.533	40
C ₄	1.771	1.589	1.680	400
C ₅	2.631	2.284	2.458	2000
Muestra 1	1.024	1.019	1.022	103

8. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio realizado en pacientes sanos se han determinado los siguientes valores normales:

Anti CCP (U/mL)	
Normal	< 30
Elevado	≥ 30

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

Los resultados positivos deberían compararse con el estado clínico del paciente, además cada decisión relativa a la terapia debería tomarse de forma individualmente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus valores normales y patológicos de Anti CCP.

8.1. Sensibilidad y Especificidad

Los resultados obtenidos demuestran una sensibilidad clínica del 79% y una especificidad del 97% para la diagnosis de la diagnosis de la AR.

8.2. Limite de detección

La menor concentración de Anti CCP detectable y diferenciable del Calibrador 0 es 1.12 U/mL con un límite de confianza del 98%.

8.3. Intra-Inter Ensayo

8.3.1. Intraensayo

La variabilidad del test ha sido determinada replicado 12 veces dos diferentes sueros con valores dentro de los límites de detectabilidad del test. La variabilidad intra-ensayo se calculó como $\leq 5.5\%$

8.3.2. Interensayo

La variabilidad entre kits distintos se determinó replicando los valores de un suero control con kits de diferentes lotes y se calculó como $\leq 6.8\%$

9. MANEJO DE LOS PRODUCTOS RESIDUALES

Los reactivos deben ser desechados según las leyes locales.

BIBLIOGRAFIA

1. Bizzaro N. et al. Diagnostic Accuracy of the anticitrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem 47:6, 1089-1093, 2001
2. Schellekens G. et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 43:155-163 (2000)
3. Baeten D. et al. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum 44:2255-2262 (2001)
4. del Val del Amo N, Ibanez Bosch R, Fito Manteca C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: relation with disease aggressiveness. Clin Exp Rheumatol. 2006;24(3):281-6
5. Samanci N, Ozdem S, Akbas H, et al. Diagnostic value and clinical significance of Anti CCP in patients with advanced rheumatoid arthritis. J Natl Med Assoc. 2005;97(8):1120-6
6. Matsui T, Shimada K, Ozawa N, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2006;33(12):2390-7
7. Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, et al. Validazione del primo standard internazionale WHO per gli anticorpi anti-Peptidi Citrullinati RiMEL/IJLaM 2008; 4(suppl): F23 – 203
8. Kroot EJ, De Jong BA, Van Leeuwen MA, Swinkels H, Van den Hoogen FH, Van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinate peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43: 1831-5.

Ed. 03/2012

DCM117-2

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.













Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000
-----------------	------------------------------------	--------------------

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos GB Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção,consultar os documentos de acompanhamento FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs