



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP400

Usage réservé aux professionnels



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

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

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

Le test Axis-Shield Anti-CCP est un dosage (ELISA) immuno-enzymatique semi-quantitatif/qualitatif lié aux enzymes pratiqué en vue de la détection de la classe IgG d'auto-anticorps spécifiques de la présence de peptides cycliques citrullinés (CCP) dans le sérum humain ou plasma (EDTA, Héparine lithium, tube de séparation du sérum (SST) ou du citrate de sodium). Il est destiné à aider à prononcer le pronostic de polyarthrite rhumatoïde (PR), bien que son résultat ne permette pas à lui seul de poser un tel diagnostic de manière définitive. Les taux d'auto-anticorps représentent un paramètre dans un procédé diagnostique à plusieurs critères, qui englobe des évaluations cliniques ainsi que biologiques.

INTRODUCTION

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une affection auto-immune systémique qui touche de 0,5 à 1,0 % de la population adulte. La PR se caractérise par une inflammation chronique de la membrane synoviale, ce qui peut entraîner une destruction progressive des articulations et, dans de nombreux cas, une incapacité et une diminution de la qualité de vie.¹ Il est généralement accepté qu'une intervention précoce est vitale afin d'empêcher des dommages irréversibles des articulations, et il est donc important de diagnostiquer la PR le plus tôt possible au cours de la maladie.^{2,3} Le diagnostic de PR repose en premier lieu sur les caractéristiques cliniques, radiologiques et immunologiques. Le test sérologique le plus fréquent consiste à mesurer le facteur rhumatoïde (FR). La présence du FR est l'un des critères du Collège de Rhumatologie américain pour la classification de la PR.⁴ Bien que le test de FR ait une bonne sensibilité, il n'est pas spécifique de la PR, car il est souvent présent chez les individus en bonne santé et les patients atteints d'autres affections auto-immunes rhumatismales ou inflammatoires et d'infections chroniques.⁵





Pendant plusieurs années, il a été reconnu que les anticorps dirigés contre le facteur anti-périnucléaire (FAP) et la kératine (AKA) étaient très spécifiques de la PR. Il a donc été ensuite rapporté que ces deux anticorps réagissaient avec la filaggrine native et on les appelle aujourd'hui anticorps anti-filaggrine (AAF).^{6,7,8} Il a récemment été prouvé que tous ces anticorps étaient dirigés contre les épitopes contenant de la citrulline.⁹ La citrulline est un acide aminé hors normes, car elle n'entre pas dans la composition des protéines au cours de la synthèse des protéines. Elle peut cependant être générée par une modification post-transitionnelle des résidus d'arginine par l'enzyme appelée peptidylarginine-désaminase (PAD).¹⁰ En 1998, Schellekens et ses collègues ont rapporté que des auto-anticorps réagissant aux peptides de synthèse linéaires contenant de la citrulline étaient hautement spécifiques de la PR lors d'un dosage basé sur un test ELISA.¹¹ Des études ultérieures ont démontré que des variantes cycliques de ces peptides linéaires, appelées peptides citrullinés cycliques (CCP) étaient tout aussi spécifiques de la PR, mais avaient une sensibilité plus élevée que les peptides linéaires.¹² Dans le but d'améliorer la sensibilité du test de CCP, une banque dédiée de peptides contenant de la citrulline a été criblée avec des sérums de patients atteints de PR et un nouveau jeu de peptides (CCP2) a été découvert, qui a donné des performances supérieures à celles du test CCP1.¹³ Ces dernières années, de nombreuses publications ont confirmé les performances de diagnostic du test CCP2.¹⁴ Il a été découvert que les anticorps anti-CCP étaient présents à un stade très précoce de la maladie, souvent en l'absence de symptômes cliniques, et de nombreux rapports indiquent que des taux élevés d'anticorps anti-CCP présagent le développement d'une maladie érosive.^{15,16,17,18,19,20} Ces découvertes suggèrent l'importance du rôle des peptides citrullinés cycliques dans le diagnostic de la PR à un stade précoce de la maladie.

Le dosage pour anticorps anti-CCP Axis-Shield est un test ELISA ayant pour base la détection d'auto-anticorps dirigés contre le peptide de synthèse cyclique contenant des résidus d'arginine modifiée (peptides CCP2) dans le sérum ou le plasma humain. Le test constitue un outil supplémentaire pour diagnostiquer la PR chez les patients et pour les traiter.

PRINCIPE DU DOSAGE

Les cupules des bandes de microtitrage sont enduites avec un peptide cyclique de synthèse hautement purifié contenant des résidus d'arginine modifiée. Durant la première incubation, les auto-anticorps qui se trouvent dans le sérum ou plasma dilué se fixent à la surface enduite d'antigène. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les constituants non fixés. Durant la seconde incubation, le Conjugué, des anticorps polyclonaux marqués aux enzymes dirigés contre l'IgG humaine, se fixent aux auto-anticorps quelconques liés à la surface. Après un autre lavage, les auto-anticorps spécifiques sont dépistés par incubation avec le Substrat. L'addition de la Solution d'arrêt met fin à la réaction, et on obtient alors un produit final coloré. La quantité de Conjugué fixé est mesurée en unités d'absorption. Dans le protocole qualitatif, la quantité de Conjugué qui a été fixée par l'échantillon est comparée à celle qui a été fixée par le Témoin de référence. Dans le protocole semi-quantitatif, la concentration des auto-anticorps anti-CCP peut être estimée par interpolation à partir d'une courbe dose-effet basée sur les Étalons.

C O N S T I T U A N T S D U N É C E S S A I R E

CONJ	1 x 15 mL	Anticorps polyclonaux de chèvre marqués à la phosphatase alcaline, et dirigés contre l'IgG humaine, Tampon Tris, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à < 0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
SUBS	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , monophosphate de phénolphtaléine (MPP), solution tampon. Prêt à l'emploi. Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation. N.B. IRRITANT.	
SOLN STOP	1 x 15 mL	Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH > 10). Prêt à l'emploi. N.B. IRRITANT.	
BUF WASH 16x	2 x 25 mL	Tampon borate, azoture de sodium à 0,8 % (p/v). Diluer avant l'emploi. N.B. NOCIF.	
MTP 8 x 12	Bandes de microtitrage à 8 x 12 cupules	Enduites de peptide citrulliné de synthèse, dans une poche en aluminium refermable contenant un desséchant.	
DIL 5x	1 x 25 mL	Tampon phosphate, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à 0,5 % (p/v). Diluer avant l'emploi. N.B. NOCIF.	
CAL 1 - CAL 6	6 x 1,0 mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à < 0,1 % (p/v). 0, 2, 8, 30, 100, 200 U/mL. Prêt à l'emploi.	
CONTROL REF	1 x 1,5 mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à < 0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
CONTROL +	1 x 0,3 mL	Plasma humain, azoture de sodium à < 0,1 % (p/v). Diluer à 1 : 100 avec le diluant pour échantillons dilué avant l'usage, comme pour les échantillons.	
CONTROL -	1 x 0,3 mL		

C O N S E R V A T I O N D E S R E A C T I F S

Stabilité du Nécessaire déjà ouvert

Un nécessaire a été ouvert et réutilisé en trois occasions sur une période de trois mois, et cela n'a pas affecté sa performance.

Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2-8°C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les nécessaires.
4. Diluer le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant pour échantillons et les Témoins négatifs et positifs avant l'emploi. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le tampon de lavage dilué et le Diluant dilué pour échantillons restent stables pendant un maximum de 6 mois à 2-8°C si toute contamination microbienne est évitée.
6. Remettre les bandes de microtitrage inutilisées dans la poche en aluminium avec le desséchant et les conserver à 2-8°C jusqu'au moment où on en aura besoin.
7. Ne pas exposer le Substrat à la lumière durant la conservation.
8. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.

Indications d'une détérioration

Le Substrat doit être d'une couleur jaune pâle. Une couleur rose indique qu'il y a eu contamination et le réactif doit alors être jeté. Un trouble ou une précipitation, dans n'importe quel constituant, indique qu'il y a eu détérioration et le constituant doit être jeté.

Prélèvement et conservation des échantillons


Le dosage est recommandé pour des échantillons de sérum ou de plasma (le tube avec séparateur de sérum (SST), à l'EDTA, à l'héparine au lithium, ou l'héparine au citrate de sodium) ; ne pas utiliser d'échantillons très hémolysés ou troubles. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.


Les échantillons peuvent être conservés non dilués à 2-8°C pendant quatre semaines ; pour les garder plus longtemps, les conserver à -20°C. Les échantillons dilués à raison de 1 :100 dans du diluant dilué pour échantillons doivent être utilisés le jour où ils ont été dilués.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS


Réservé à l'usage diagnostique in vitro.

Précautions de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2.  Les Étalons et les Témoins contiennent du plasma humain testé avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'AgHBs, l'ARN VIH-1 ou l'Ag VIH-1 et pour les anticorps anti-VHC et anti-VIH-1/VIH-2, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Étant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si les Étalons et les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance pouvant être biologiquement dangereuse. Les recommandations approuvées du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) intitulées "Protection des agents de laboratoire contre les infections acquises dans le milieu professionnel [Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections] (M29-A3 – Troisième Édition),²¹ décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux États-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toute éruption cutanée, coupure, abrasion et autre lésion cutanée de manière adéquate.
6. Les Étalons, Témoins, Conjugué, Concentré diluant pour échantillons et Concentré tampon de lavage contiennent tous de l'azoture de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.
7. La Solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Disperser tout déversement avec de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, irriguer avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès d'Axis-Shield Diagnostics.

 SOLUTION D'ARRÊT
Irritant


R36/38 : Irritant pour les yeux et la peau.
S23 : Ne pas respirer les vapeurs.
S25 : Éviter le contact avec les yeux.
S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

 TAMPON DE LAVAGE (16X)
Nocif

R22 : Nocif en cas d'ingestion.
R32 : Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
R52/53 : Nocif pour les organismes aquatiques ; peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.
S23 : Ne pas respirer les vapeurs.
S26 :: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
S28 : After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.
S46 : En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.
S60 : Éliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux.
S61 : Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité

 SUBSTRAT
Irritant

R36 : Irritant pour les yeux.
S23 : Ne pas respirer les vapeurs.
S25 : Éviter le contact avec les yeux.
S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant les précaution d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

 CONCENTRE DILUANT POUR ECHANTILLONS (5X)
Nocif

R22 : Nocif en cas d'ingestion.
R32 : Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
R36 : Irritant pour les yeux.
R52/53 : Nocif pour les organismes aquatiques ; peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.
S23 : Ne pas respirer les vapeurs.
S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
S28 : En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout ; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.
S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.
S46 : En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.
S60 : Éliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux.
S61 : Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité.

P R E P A R A T I O N

Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire

1. Lecteur de plaque/bande à 96 cupules, avec filtre de 550 nm (540-565 nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipette automatique pour distribuer 100 µL. Pipette automatique pour distribuer 200 µL pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Epruvettes graduées en verre/matière plastique : 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Récipients contenant 1 mL.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation pour le dosage

Attendre 30 à 60 minutes pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18-25°C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

Ne pas diluer le Témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

Réactif	Volume	Ajouter
Concentré tampon de lavage	1 flacon	375 mL d'eau distillée/désionisée
Concentré de diluant pour échantillons	1 flacon	100 mL d'eau distillée/désionisée
Témoins positifs et négatifs/échantillons	10 µL	1 mL de diluant dilué pour échantillons

Calculer le nombre de bandes de microtitrage requises pour le dosage en cours, et les placer dans le porte-bandes de microtitrage. Remettre les bandes inutilisées dans la poche en aluminium refermable avec le desséchant et conserver à 2-8 °C jusqu'à ce que l'on en ait besoin. S'assurer que toutes les bandes soient bien installées dans le support de bandes de microtitrage. Il se peut que les utilisateurs veuillent numéroter chaque bande le long de la bordure supérieure pour aider à les identifier. Garder le support de bandes de microtitrage pour le réutiliser par la suite.

PROTOCOLE DU DOSAGE

Protocole qualitatif : analyser le Témoin de référence, les Témoins positifs et négatifs et les échantillons.

Protocole semi-quantitatif : analyser les Etalons (1-6), les Témoins positifs et négatifs, et les échantillons.

1. Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
2. Avec une pipette, prélever 100 µL du Témoin de référence/des Etalons, en double exemplaire, des Témoins positifs et négatifs prédilués (1 :100) et des échantillons du patient prédilués (1 :100), puis déposer dans les cupules appropriées. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette pour chaque addition. Cette étape ne doit pas prendre plus de 15 minutes pour n'importe quel groupe d'Etalons/Témoins/échantillons.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25°C.
4. Décanter le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
5. Laver les cupules **trois fois** avec un minimum de 200 µL de Tampon de lavage dilué. **Faire décanter et éponger après chaque étape du lavage.**
6. Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque cupule.
7. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter 100 µL de Substrat dans chaque cupule.
10. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C. **Ne pas faire décanter.**
11. Ajouter 100 µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
12. Lire les résultats indiqués sur les bandes d'ici 24 heures à 550 nm (540-565 nm)

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.

Protocole qualitatif

Calculer le coefficient d'absorption (densité optique) pour les Témoins positifs et négatifs, et pour chaque échantillon.

$$\text{Ratio d'absorbance} = \frac{\text{Échantillon ou Valeur d'Absorbance du Contrôle}}{\text{Valeur d'absorption moyenne du Témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer une valeur seuil entre les échantillons positifs et négatifs qui est spécifique de leurs populations de patients. Les résultats obtenus des populations de patients utilisées dans l'essai clinique Axis-Shield suggèrent la valeur seuil suivante :

Coefficient d'absorption Interprétation des résultats

< 0,95	Négatif
≥ 0,95 à ≤ 1,0	Valeur limite - il est recommandé de refaire le test
> 1,0	Positif

Protocole semi-quantitatif

Sur du papier millimétré, tracer la valeur d'absorption de chaque Etalon en fonction du \log_{10} de la concentration d'Etalon (voir tableau ci-dessous). Les concentrations des Témoins et des échantillons peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage ; à titre de référence, une courbe type est illustrée ci-dessous, mais elle ne doit pas être utilisée pour interpréter les résultats. Des ajustements de courbe par logistique à 4 paramètres (4PL), fonction spline de degré 3, log/logit et point à point sont aussi satisfaisants.

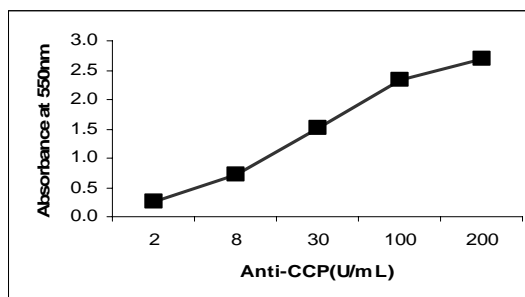
Les échantillons dont l'absorption est supérieure à l'Etalon 6 (200 U/mL) dépassent les limites du dosage, et ils doivent être considérés comme > 200 U/mL, être dilués et re-analysés, en apportant la rectification nécessaire pour cet autre facteur de dilution.

NB: Comme avec tout dosage mesurant des anticorps, ce dosage détermine l'activité de l'anticorps présent dans l'échantillon, et non la concentration. L'activité peut être affectée par plusieurs paramètres, parmi lesquels l'avidité des anticorps.

Concentrations des étalons

Numéro de l'Etalon	Concentration U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	200

Courbe d'étalonnage type



CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte.

Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Section sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre. Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Il est recommandé que les témoins positifs et négatifs pré-dilués soient analysés en double exemplaire dans tous les dosages afin de contrôler la qualité de la méthode de test. Analyser le Témoin de référence prêt à l'emploi en deux exemplaires dans tous les dosages qualitatifs.

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications du coefficient des Témoins indiquées ci-dessous, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température -20°C, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Les agents de conservation tels que l'azoture de sodium à 0,1 % (p/v) n'affecteront pas les résultats obtenus avec les échantillons.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne reflèteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

Spécifications des coefficients des Témoins

Protocole	Spécifications
Qualitatif (coefficients)	$\frac{\text{Absorption du Témoin positif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}} \geq 1,1$
	$\frac{\text{Absorption du Témoin négatif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}} < 0,95$
Semi-Quantitatif	Se référer à l'étiquette du Témoin positif pour les limites attendues acceptables (U/mL)
	Concentration du Témoin négatif < 2 U/mL

VALEURS ATTENDUES

50 des échantillons de donneurs asymptomatiques apparemment en bonne santé comportaient des détails de sexe et d'âge. La tranche d'âge était de 19 à 72 ans, avec un nombre égal d'hommes (n = 25) et de femmes (n =25). Aucune différence n'a été attribuée au sexe ou à l'âge lors de la comparaison de la tranche d'âge des ≤ 40 ans (n=17) et des > 40 ans (n=33). La moyenne générale de la concentration en auto-anticorps anti-CCP chez cette population était de $0,48 \pm 0,51$ U/mL (fourchette de 0,0 à 2,59 U/mL).

<p><i>Limites de référence</i></p> <p>≤ 5 U/mL = Résultat négatif</p> <p>> 5 U/mL = Résultat positif</p>
--

Ces limites de référence sont suggérées à titre de guide seulement, chaque laboratoire devant établir des limites de référence qui sont appropriées à leurs populations de patients et à leur pratique clinique. Veuillez noter que la polyarthrite rhumatoïde est deux fois plus prévalente chez les femmes que chez les hommes.

DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE

Sensibilité clinique dans les cas de PR établie cliniquement

Les résultats relatifs à la sensibilité clinique pour le test ELISA anti-CCP Axis-Shield étaient calculés sous forme de pourcentage des sérums positifs pour PR établie cliniquement dans le dosage anti-CCP. La PR établie cliniquement était diagnostiquée suivant les critères du Collège de rhumatologie américain (ACR).

Site	Confirmé RA (n)	Nécessaire FCCP200 Positif (n)	FCCP200 Sensibilité clinique	Confirmé RA (n)	Nécessaire FCCP400 Positif (n)	FCCP400 Sensibilité clinique
Axis-Shield	412	258	62 %	412	267	64 %

Spécificité clinique dans les états pathologiques sans PR et asymptomatiques

La spécificité clinique du test ELISA Anti-CCP Axis-Shield a été obtenue en calculant le pourcentage de sérums négatifs provenant de patients avec un état pathologique sans PR obtenus avec le dosage anti-CCP.

État pathologique sans PR	n	FCCP200 Négatif aux anticorps	FCCP200 Spécificité clinique	FCCP400 Négatif aux anticorps	FCCP400 Spécificité clinique
Spondylarthrite ankylosante	10	10	100 %	10	100 %
Sinovite précoce	10	7	70%	7	70%
Ostéoarthrite	18	18	100 %	18	100 %
Polymiosite	15	15	100 %	14	93 %
Pseudopolyarthrite rhizomélisque	6	4	67 %	4	67 %
Rhumatisme psoriasique	25	24	96 %	24	96 %
Maladie de Raynaud	3	3	100 %	3	100 %
Arthrite réactive	2	2	100 %	2	100 %
Sarcoïdose	2	2	100 %	2	100 %
Sclérodémie	23	21	91 %	21	91 %
Syndrome de Sjögren	23	21	91 %	21	91 %
lupus érythémateux disséminé	104	93	89 %	93	89 %
Vasculite	10	10	100 %	10	100 %
Viral	5	5	100 %	5	100 %
Arthrite idiopathique juvénile	1	1	100 %	1	100 %
Total	257	236	93,6%	235	93,2%

sans PR	n	FCCP200 Négatif aux anticorps	FCCP200 Spécificité clinique	FCCP400 Négatif aux anticorps	FCCP400 Spécificité clinique
Asymptomatiques	192	192	100%	190	99%

Spécificité clinique Anti-CCP

Tous résultats FCCP200 par rapport aux résultats FCCP400

FCCP400	FCCP200		Grand Total
	Négatif	Positif	
Négatif	570	0	570
Positif	14	277	291
Grand Total	584	277	861

Groupe de maladie	n	% d'accord positif (IC de 95 %)	% d'accord négatif (IC de 95 %)	% d'accord total (IC de 95 %)
Tous échantillons	861	100,0 (98,7 à 100,0)	97,6 (96,0 à 98,7)	98,4 (97,3 à 99,1)

Linéarité de la dilution

Le dosage anti-CCP est conçu pour avoir une récupération moyenne de 100 ± 20 % lors de l'analyse d'échantillons dans un plasma négatif. Trois échantillons ayant une grande quantité d'anticorps anti-CCP ont été dilués avec un plasma négatif conformément au document EP6-A du CLSI. Dans une étude représentative, la concentration d'anti-CCP a été déterminée à l'aide du dosage Anti-CCP, et le pourcentage de récupération moyenne a été calculé. La récupération moyenne générale était de 108,1 % (plage de récupération moyenne observée de 98,3 % à 113,3 %). Les données provenant de cette étude sont récapitulées dans le tableau ci-dessous.

Échantillon	% Recovery per Dilution Factor (Low+High)						% de récupération moyenne
	6 + 1	5 + 2	4 + 3	3 + 4	2 + 5	1 + 6	
1	111,0	120,0	106,0	116,0	114,0	113,0	113,3
2	114,0	111,0	115,0	117,0	112,0	106,0	112,5
3	94,0	105,0	98,0	101,0	95,0	97,0	98,3
% de récupération moyenne générale							108,1

Précision

Le dosage anti-CCP est conçu pour avoir une précision de < 20 % CV.

Les membres du panel basé sur le plasma humain ont été analysés par mesures de deux, à deux moments distincts de la journée, n = 88 pour chaque membre du panel, les tests ont été effectués en utilisant deux lots de nécessaire.

Les données provenant de cette étude sont récapitulées dans les tableaux ci-dessous.

Membre N° 1 du panel

Combinaison	n	Témoin Valeur moyenne (U/mL)	Dans l'analyse		Entre les analyses	
			ET	CV (%)	ET	CV (%)
1	88	5,2	0,82	15,8	0,37	7,2
2	88	3,1	0,52	16,8	0,21	6,7

Membre N° 2 du panel

Combinaison	n	Témoin Valeur moyenne (U/mL)	Dans l'analyse		Entre les analyses	
			ET	CV (%)	ET	CV (%)
1	88	9,7	1,01	10,4	0,65	6,7
2	88	7,6	0,88	11,6	0,37	4,9

Membre N° 3 du panel

Combinaison	n	Témoin Valeur moyenne (U/mL)	Dans l'analyse		Entre les analyses	
			ET	CV (%)	ET	CV (%)
1	88	18,8	2,07	11	1,26	6,7
2	88	16,4	1,57	9,6	0	0

Kit positif

Combinaison	n	Témoin Valeur moyenne (U/mL)	Dans l'analyse		Entre les analyses	
			ET	CV (%)	ET	CV (%)
1	88	27,2	2,57	9,4	0	0
2	88	26,0	2,5	9,6	0,63	2,4

Membre N° 4 du panel

Combinaison	n	Témoin Valeur moyenne (U/mL)	Dans l'analyse		Entre les analyses	
			ET	CV (%)	ET	CV (%)
1	88	55,4	8,07	14,7	1,71	3,1
2	88	47,5	5,7	12	1,44	3

Membre N° 5 du panel

Combinaison	n	Témoin Valeur moyenne (U/mL)	Dans l'analyse		Entre les analyses	
			ET	CV (%)	ET	CV (%)
1	88	129,2	25,47	19,7	0	0
2	88	110,7	18,57	16,8	2,06	1,9

Sensibilité analytique

Le dosage anti-CCP est conçu pour avoir une sensibilité analytique moyenne/limite du blanc de $\leq 1,0$ U/mL.

La sensibilité analytique (selon le document EP17-A du CLSI) représente la valeur la plus élevée attendue pour un échantillon qui ne contient aucun anticorps anti-CCP.

Interférence

Le dosage anti-CCP est conçu pour avoir une interférence potentielle moyenne due à la bilirubine, l'hémoglobine, les intralipides et le facteur rhumatoïde de < 15 % aux niveaux indiqués dans les tableaux ci-dessous.

Substance interférente	Concentration de la substance interférente
Bilirubine	0,2 mg/mL
Hémoglobine	4 mg/mL
Intralipides	15 mg/mL
Facteur rhumatoïde	200 IU/mL

R E S T R I C T I O N S D ' U T I L I S A T I O N

1. Bien que la présence d'anticorps dirigés contre les CCP soit associée à la polyarthrite rhumatoïde, elle ne permet pas à elle seule de prononcer son diagnostic. Les données doivent être considérées en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques.
2. Chez certains individus, il peut y avoir des taux élevés d'anticorps anti-CCP mais peu ou pas de preuves d'une affection clinique. En revanche, il se peut que des patients avec une maladie évolutive aient des taux indétectables de ces anticorps. Actuellement, l'importance clinique de cette information n'est pas évidente.
3. Etant donné que le résultat d'un dosage des anticorps anti-CCP ne peut pas constituer une preuve diagnostique de la présence ou de l'absence d'une affection clinique, ne jamais instaurer un traitement en ne se basant que sur un résultat positif au test de détection des anticorps anti-CCP.
4. L'instauration ou la modification d'un traitement ne doit pas reposer uniquement sur une variation du taux d'auto-anticorps anti-CCP mais plutôt sur l'observation ou les observations clinique(s).
5. L'efficacité clinique du contrôle des taux d'auto-anticorps anti-CCP en tant qu'indication de l'évolution/rémission de la polyarthrite rhumatoïde n'a pas encore été entièrement définie.
6. La valeur du taux d'auto-anticorps anti-CCP dans l'arthrose juvénile n'a pas été déterminée.
7. En raison des caractéristiques spécifiques des interactions antigène/anticorps, ce n'est pas la concentration de l'anticorps qui est déterminée mais son activité. Puisque le sérum des patients contient des populations d'anticorps hétérogènes, il se peut que certains échantillons présentent une non linéarité, surtout à de très fortes dilutions des échantillons.

R E S U M E D U P R O T O C O L E

1. Diluer les échantillons et les Témoins positifs et négatifs à raison de 1:100. Ne pas diluer les Étalons ou le Témoin de référence.
2. Ajouter 100 µL de Témoin de référence/Étalons en double exemplaire, de Témoins positifs et négatifs et d'échantillons prédilués dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25°C.
4. Laver les bandes 3 fois.
5. Ajouter 100 µL de Conjugué dans chaque cupule.
6. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
7. Laver les bandes 3 fois.
8. Ajouter 100 µL de Substrat dans chaque cupule.
9. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
10. Ajouter 100 µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule.
11. Lire la capacité d'absorption à 550 nm.

R É F É R E N C E S

1. Feldmann M, et al. Cell, 1996 ;85 :307-310
2. Landewe RB, Arthritis Rheum 2003; 48(1) :1-15
3. Lard LR et al. Am J Med 2001;111:446-51
4. Arnett FC et al. Arthritis Rheum 1998;31(3):315-24
5. van Venrooij WJ et al. Neth J Med 2002;60(10):383-88.
6. Nienhuis RL et al. Ann Rheum Dis 1964;23:302-05
7. Young BJ et al. Br Med J 1979 ;2 :97-89
8. Hoet RM et al. Ann Rheum Dis 1991 ;50 :611-18
9. Sebbag M et al. J Clin Invest 1995;95:2672-79.
10. Vossenaar ER et al. BioEssays 2003;25:1106-18
11. Schellekens et al. J Clin Invest 1998;101(1):273-81
12. Schellekens et al. Arthritis Rheum 2000;43(1):155-63
13. Vossenaar ER et al. Clin Applied Immunol Rev2004;4:239-62
14. Pruijn GJ et al. Current Rheumatology Reviews 2005;1(1):1-7
15. Rantapaa-Dahlqvist S et al. Arthritis Rheum2003;48(10)2741-49
16. Nielen MM et al. Arthritis Rheum 2004: 50 (2):380-386
17. van Gaalen et al. Arthritis Rheum 2004;50(3):709-15
18. Meyer O et al. Ann Rheum Dis 2003;63:120-26
19. Forslind K et al. Ann Rheum Dis 2003;63:1090-95
20. Kastbom A et al. Ann Rheum Dis 2003;63:1085-89
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.







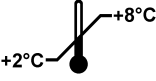

Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

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

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

IVD	Pour diagnostic in vitro
REF	Numéro catalogue
LOT	Lot
	96 determinations
	Avertissez
	Voir les consignes d'utilisation
	Utiliser avant
	Conserver à 2-8°C
	Fabriqué par
CONTROL +	Témoin positif
CONTROL -	Témoin négatif
CONJ	Conjugué
SUBS	Substrat
SOLN STOP	Solution d'arrêt
BUF WASH 16x	Tampon de lavage
MTP 8 x 12	Bandes de microtitrage
DIL 5x	Diluant
CAL 1 - CAL 6	Étalons 1-6
CONTROL REF	Témoin de référence



A x i s - S h i e l d

Anti-CCP

IVD



REF FCCP400

For professional use only



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

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

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

ENGLISH:

INTENDED USE

The Axis-Shield Anti-CCP test is a semi-quantitative/qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of the IgG class of autoantibodies specific to cyclic citrullinated peptide (CCP) in human serum or plasma (EDTA, lithium heparin, serum separator tube (SST) or sodium citrate). It is intended to aid in the diagnosis of Rheumatoid Arthritis (RA) and is not definitive in isolation. Autoantibody levels represent one parameter in a multicriterion diagnostic process, encompassing both clinical and laboratory-based assessments.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a common, systemic autoimmune disease affecting 0.5-1.0% of the adult population. RA is characterised by chronic inflammation of the synovium which can lead to progressive joint destruction and in many cases lead to disability and reduction of quality of life.¹ It is generally accepted that early intervention is vital in preventing irreversible joint damage and it is therefore important to diagnose RA as early in the disease course as possible.^{2,3} The diagnosis of RA is primarily based on clinical, radiological and immunological features. The most frequent serological test is the measurement of rheumatoid factor (RF). The presence of RF is one of the American College of Rheumatology's (ACR) criteria for the classification of RA.⁴ Although the RF test has good sensitivity it is not specific for RA, as it is often present in healthy individuals and patients with other rheumatic or inflammatory diseases, autoimmune diseases and chronic infections.⁵




For several years, it has been recognised that antibodies to anti-perinuclear factor (APF) and keratin (AKA) are highly specific for RA. It was subsequently reported that both these antibodies reacted with native filaggrin and now are referred to as anti-filaggrin antibodies (AFA).^{6,7,8} Recent evidence has shown that all these antibodies are directed to citrulline containing epitopes.⁹ Citrulline is a non-standard amino acid, as it is not incorporated into proteins during protein synthesis. It can however be generated via post-translational modification of arginine residues by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD).¹⁰ In 1998, Schellekens and colleagues reported that autoantibodies reactive with linear synthetic peptides containing citrulline were highly specific for RA in an ELISA based assay.¹¹ Subsequent studies demonstrated that cyclic variants of these linear peptides, termed cyclic citrullinated peptides (CCP) were as specific for RA but with a higher sensitivity than the linear peptides.¹² In an effort to further improve the sensitivity of the CCP test, a dedicated library of citrulline-containing peptides were screened with RA sera and a new set of peptides (CCP2) were discovered which gave superior performance compared to the CCP1 test.¹³ Over the last few years many published reports have confirmed the diagnostic performance of the CCP2 test.¹⁴ Anti-CCP antibodies have been found to be present very early in the disease, often with the absence of clinical symptoms and many reports indicate that elevated levels of anti-CCP antibodies can predict the development of erosive disease.^{15,16,17,18,19,20} These findings suggest an important role for cyclic citrullinated peptides in the diagnosis of RA at an early stage of the disease course.


The Axis-Shield Anti-CCP assay is an ELISA based on the detection of autoantibodies in human serum or plasma towards a synthetic cyclic peptide containing modified arginine residues (CCP2 peptides). The test provides an additional tool in the diagnosis of patients with RA.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with a highly purified synthetic cyclic peptide containing modified arginine residues. During the first incubation, specific autoantibodies in diluted serum or plasma bind to the antigen-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, an enzyme-labelled polyclonal antibody to human IgG, binds any surface-bound autoantibodies. After further washing, specific autoantibodies are traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units. In the qualitative protocol, the amount of Conjugate bound by the sample is compared with that bound by the Reference Control. In the semi-quantitative protocol, the concentration of anti-CCP autoantibody can be estimated by interpolation from a dose-response curve based on Calibrators.

KIT COMPONENTS

CONJ	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.	
SUBS	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage. N.B. IRRITANT.	
SOLN STOP	1 x 15 mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH > 10). Ready-to-use. N.B. IRRITANT.	
BUF WASH 16x	2 x 25 mL	Borate buffer, 0.8% (w/v) sodium azide. Dilute before use. N.B. HARMFUL.	

MTP 8 x 12	8 x 12 well microtitre strips	Coated with synthetic citrullinated peptide, in a resealable foil pack with desiccant.
DIL 5x	1 x 25 mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use. N.B. HARMFUL. 
CAL 1 - CAL 6	6 x 1.0 mL	Human plasma, buffer, < 0.1% (w/v) sodium azide. 0, 2, 8, 30, 100, 200 U/mL. Ready-to-use.
CONTROL REF	1 x 1.5 mL	Human plasma, buffer, < 0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.
CONTROL +	1 x 0.3 mL	Human plasma, < 0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:100 with diluted Sample Diluent before use, as for samples.
CONTROL -	1 x 0.3 mL	

STORAGE OF REAGENTS

Opened Kit Stability

A kit was opened, and reused on three occasions over a three month period with no adverse effect on kit performance.

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, Sample Diluent Concentrate and Positive and Negative Controls 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 strips in the foil pack 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.

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 or plasma (serum separator tube, EDTA, lithium heparin or sodium citrate) samples; do not use grossly haemolysed or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Do not heat-inactivate samples, this may yield false positive results.

Samples may be stored undiluted at 2-8°C for four weeks; for longer storage store at -20°C. Samples diluted at 1:100 in diluted Sample Diluent must be used within the same day of dilution.

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.  Calibrators and Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for HBsAg, HIV-1 RNA or HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, and anti-HCV and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Calibrators and Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) approved guidelines "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections" (M29-A3 –Third Edition),²¹ describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice.
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. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Axis-Shield Diagnostics.

 **STOP SOLUTION**
Irritant

R36/38: Irritating to eyes and skin.
 S23: Do not breathe fumes.
 S25: Avoid contact with eyes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

 **WASH BUFFER CONCENTRATE (16X)**
Harmful

R22: Harmful if swallowed.
 R32: Contact with acids liberates very toxic gas.
 R52/53: Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
 S23: Do not breathe fumes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S28: After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
 S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.
 S60: This material and its container must be disposed of as hazardous waste.
 S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions / safety data sheets.

 **SUBSTRATE**
Irritant

R36: Irritating to eyes.
 S23: Do not breathe fumes.
 S25: Avoid contact with eyes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

 **SAMPLE DILUENT CONCENTRATE (5X)**
Harmful

R22: Harmful if swallowed.
 R32: Contact with acids liberates very toxic gas.
 R36: Irritating to eyes.
 R52/53: Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
 S23: Do not breathe fumes.
 S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S28: After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
 S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.
 S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
 S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.
 S60: This material and its container must be disposed of as hazardous waste.
 S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions / safety data sheets.

P R E P A R A T I O N

Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 550 nm filter (540-565 nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatic pipette to dispense 100 µL. Automatic pipette to dispense 200 µL for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1×100 mL, 1×400 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

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18-25°C for 30-60 minutes before use. Mix reagents by gentle inversion.

Do not dilute the Reference Control.

Dilute the following reagents 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
Positive and Negative Controls/samples	10 µL	1 mL diluted Sample Diluent

Calculate the number of microtitre strips required for the current assay, and retain these in the microtitre strip holder. Return surplus strips to the resealable foil pack with the desiccant and store at 2-8°C until required. Ensure that all strips are securely held within the microtitre strip holder. Users may wish to number each strip along the top edge to aid identification. Retain the microtitre strip holder for further use.

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.

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100 µL Reference Control/Calibrators in duplicate, pre-diluted (1:100) Positive and Negative Controls, and pre-diluted (1:100) 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.
3. Incubate 60 ± 10 minutes at 18-25°C.
4. Decant strip 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 strips well with paper towels.
5. Wash wells **three times** with a minimum of 200 µL diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100 µL Conjugate to each well.
7. Incubate 30 ± 5 minutes at 18-25°C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100 µL Substrate to each well.
10. Incubate 30 ± 5 minutes at 18-25°C. **Do not decant.**
11. Add 100 µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
12. Read strips within 24 hours at 550 nm (540-565 nm).

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 Axis-Shield clinical trial suggest the following cut-off:

<u>Absorbance Ratio</u>	<u>Result 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 \log_{10} Calibrator concentration (see following table) on suitable graph paper. Concentrations of Controls and samples can then be read from the calibration curve; a typical plot is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results. 4-parameter logistic (4PL), cubic spline, log/logit and point-to-point curve fits are also satisfactory.

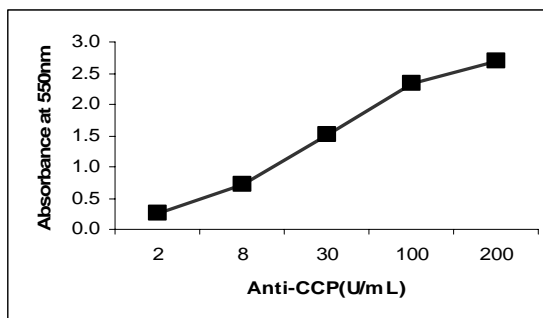
Samples with absorbances above Calibrator 6 (200 U/mL) are outside the range of the assay, and should be reported as > 200 U/mL, diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

NB: 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.

Calibrator Concentrations

Calibrator Number	Concentration U/mL
1	0
2	2
3	8
4	30
5	100
6	200

Typical Calibration 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 their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and 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 to 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)	$\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}} \geq 1.1$
	$\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}} < 0.95$
Semi-Quantitative	See Positive Control label for acceptance expected range (U/mL)
	Negative Control concentration < 2 U/mL

EXPECTED VALUES

50 of the asymptomatic apparently healthy donor samples had gender and age details. The age range was 19-72 years, comprising equal numbers of males (n=25) and females (n=25). No difference could be attributed to gender or age when comparing the age range of ≤ 40 years (n=17) and > 40 years (n=33). The overall mean anti-CCP concentration for this population was 0.48 ± 0.51 U/mL (range 0.0 – 2.59 U/mL).

<i>Reference Range</i> ≤ 5 U/mL = Negative > 5 U/mL = Positive

This reference range is suggested as a guideline only and each laboratory should establish a reference range appropriate to their patient populations and clinical practice. Please note that rheumatoid arthritis is twice as prevalent in females as in males.

PERFORMANCE DATA

Clinical Sensitivity in Clinically Confirmed RA

Clinical sensitivity data for the Axis-Shield Anti-CCP ELISA was calculated as the percentage of clinically confirmed RA sera positive in the anti-CCP assay. Clinically confirmed RA was diagnosed according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria.

Site	Confirmed RA (n)	FCCP200 Positive (n)	FCCP200 Clinical Sensitivity	Confirmed RA (n)	FCCP400 Positive (n)	FCCP400 Clinical Sensitivity
Axis-Shield	412	258	62%	412	267	64%

Clinical Specificity in Non-RA Disease States and Asymptomatics

Clinical specificity for the Axis-Shield Anti-CCP ELISA was obtained by calculating the percentage of non-RA disease state sera negative in the anti-CCP assay.

Non RA Disease State	n	FCCP200 Negative	FCCP200 Clinical Specificity	FCCP400 Negative	FCCP400 Clinical Specificity
Ankylosing spondylitis	10	10	100%	10	100%
Early synovitis	10	7	70%	7	70%
Osteoarthritis	18	18	100%	18	100%
Polymiositis	15	15	100%	14	93%
Polymyalgia rheumatica	6	4	67%	4	67%
Psoriatic arthritis	25	24	96%	24	96%
Raynaud	3	3	100%	3	100%
Reactive arthritis	2	2	100%	2	100%
Sarcoidosis	2	2	100%	2	100%
Scleroderma	23	21	91%	21	91%
Sjogren's Syndrome	23	21	91%	21	91%
SLE	104	93	89%	93	89%
Vasculitis	10	10	100%	10	100%
Viral	5	5	100%	5	100%
JIA	1	1	100%	1	100%
Total	257	236	93.6%	235	93.2%

Non RA	n	FCCP200 Negative	FCCP200 Clinical Specificity	FCCP400 Negative	FCCP400 Clinical Specificity
Asymptomatic	192	192	100%	190	99%

Clinical Specificity of Anti-CCP

All FCCP200 Results Versus FCCP400 Results

FCCP400	FCCP200		Grand Total
	Negative	Positive	
Negative	570	0	570
Positive	14	277	291
Grand Total	584	277	861

Disease Group	n	% Positive Agreement (95% CI)	% Negative Agreement (95% CI)	% Total Agreement (95% CI)
All samples	861	100.0 (98.7 to 100.0)	97.6 (96.0 to 98.7)	98.4 (97.3 to 99.1)

Dilution Linearity

The anti-CCP assay is designed to have a mean recovery of $100 \pm 20\%$ when analysing specimens in negative plasma. Three high anti-CCP specimens were diluted with negative plasma according to the CLSI document EP6-A. In a representative study, the concentration of anti-CCP was determined using the Anti-CCP assay, and the mean percentage recovery was calculated. The overall mean recovery was 108.1% (mean observed recovery range 98.3%-113.3%). Data from this study are summarised in the following table.

Sample	% Recovery per Dilution Factor (Low+High)						Mean % Recovery
	6 + 1	5 + 2	4 + 3	3 + 4	2 + 5	1 + 6	
1	111.0	120.0	106.0	116.0	114.0	113.0	113.3
2	114.0	111.0	115.0	117.0	112.0	106.0	112.5
3	94.0	105.0	98.0	101.0	95.0	97.0	98.3
Overall Mean % Recovery							108.1

Precision

The anti-CCP assay is designed to have within and between precision of < 20% CV.

The human plasma based panel members were assayed in replicates of two at two separate times of the day, n=88 for each panel member, testing was performed using two kit lots.

Data from this study are summarised in the following tables

Panel Member 1						
Combination	n	Mean Conc Value (U/mL)	Within Run		Between Run	
			SD	CV(%)	SD	CV(%)
1	88	5.2	0.82	15.8	0.37	7.2
2	88	3.1	0.52	16.8	0.21	6.7

Panel Member 2						
Combination	n	Mean Conc Value (U/mL)	Within Run		Between Run	
			SD	CV(%)	SD	CV(%)
1	88	9.7	1.01	10.4	0.65	6.7
2	88	7.6	0.88	11.6	0.37	4.9

Panel Member 3						
Combination	n	Mean Conc Value (U/mL)	Within Run		Between Run	
			SD	CV(%)	SD	CV(%)
1	88	18.8	2.07	11	1.26	6.7
2	88	16.4	1.57	9.6	0	0

Kit Positive						
Combination	n	Mean Conc Value (U/mL)	Within Run		Between Run	
			SD	CV(%)	SD	CV(%)
1	88	27.2	2.57	9.4	0	0
2	88	26.0	2.5	9.6	0.63	2.4

Panel Member 4						
Combination	n	Mean Conc Value (U/mL)	Within Run		Between Run	
			SD	CV(%)	SD	CV(%)
1	88	55.4	8.07	14.7	1.71	3.1
2	88	47.5	5.7	12	1.44	3

Panel Member 5						
Combination	n	Mean Conc Value (U/mL)	Within Run		Between Run	
			SD	CV(%)	SD	CV(%)
1	88	129.2	25.47	19.7	0	0
2	88	110.7	18.57	16.8	2.06	1.9

Analytical Sensitivity

The anti-CCP assay is designed to have a mean analytical sensitivity/limit of blank of ≤ 1.0 U/mL.

Analytical sensitivity (according to the CLSI document EP17-A) represents the highest value that is expected for a sample that contains no anti-CCP antibody.

Interference

The anti-CCP assay is designed to have a mean potential interference from bilirubin, haemoglobin, intralipid and rheumatoid factor of < 15% at the levels indicated in the following table.

Interfering Substance	Interfering Substance Concentration
Bilirubin	0.2 mg/mL
Haemoglobin	4 mg/mL
Intralipid	15 mg/mL
Rheumatoid Factor	200 IU/mL

LIMITATIONS OF USE

1. Although the presence of antibodies to CCP is associated with Rheumatoid Arthritis, a positive result is not in itself diagnostic, the data must be considered in light of other clinical and laboratory findings.
2. Some individuals may have high levels of anti-CCP antibodies with little or no evidence of clinical disease. By contrast, some patients with active disease may have undetectable levels of these antibodies. The clinical significance of this information is currently unclear.
3. As the result of an anti-CCP assay is not diagnostic proof of the presence or absence of clinical disease, therapy should not be started on the basis of an anti-CCP positive result alone.
4. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in anti-CCP autoantibody concentration but rather on clinical observation(s).
5. The clinical effectiveness of monitoring CCP autoantibody levels as an indication of progression/remission of Rheumatoid Arthritis has not been defined.
6. The value of anti-CCP in juvenile arthritis has not been determined.
7. Due to the specific characteristics of antigen/antibody interactions, it is not the concentration of antibody which is determined, but the activity. Since patient sera contain heterogeneous antibody populations, some samples may exhibit non-linearity, especially at very high sample dilutions.

SUMMARY OF PROTOCOL

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

REFERENCES

1. Feldmann M, et al. Cell, 1996 ;85 :307-310
2. Landewe RB, Arthritis Rheum 2003; 48(1) :1-15
3. Lard LR et al. Am J Med 2001;111:446-51
4. Arnett FC et al. Arthritis Rheum 1998;31(3):315-24
5. van Venrooij WJ et al. Neth J Med 2002;60(10):383-88.
6. Nienhuis RL et al. Ann Rheum Dis 1964;23:302-05
7. Young BJ et al. Br Med J 1979 ;2 :97-89
8. Moet RM et al. Ann Rheum Dis 1991 ;50 :611-18
9. Sebbag M et al. J Clin Invest 1995;95:2672-79.
10. Vossenaar ER et al. BioEssays 2003;25:1106-18
11. Schellekens et al. J Clin Invest 1998;101(1):273-81
12. Schellekens et al. Arthritis Rheum 2000;43(1):155-63
13. Vossenaar ER et al. Clin Applied Immunol Rev2004;4:239-62
14. Pruijn GJ et al. Current Rheumatology Reviews 2005;1(1):1-7
15. Rantapaa-Dahlqvist S et al. Arthritis Rheum2003;48(10)2741-49
16. Nielen MM et al. Arthritis Rheum 2004 :4 :239-62
17. van Gaalen et al. Arthritis Rheum 2004;50(3):709-15
18. Meyer O et al. Ann Rheum Dis 2003;63:120-26
19. Forslind K et al. Ann Rheum Dis 2003;63:1090-95
20. Kastbom A et al. Ann Rheum Dis 2003;63:1085-89
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.







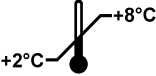

Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, UK.

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

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Web: www.axis-shield.com

IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
REF	Catalogue number
LOT	Lot
	96 tests
	Caution
	Consult instructions for use
	Use by
	Store at 2-8°C
	Manufactured by
CONTROL +	Positive Control
CONTROL -	Negative Control
CONJ	Conjugate
SUBS	Substrate
SOLN STOP	Stop Solution
BUF WASH 16x	Wash Buffer
MTP 8 x 12	Microtitre Strips
DIL 5x	Diluent
CAL 1 - CAL 6	Calibrator 1-6
CONTROL REF	Reference Control