

# Product information



User's Manual



Distribuito in ITALIA da  
**Li StarFish S.r.l.**  
Via Cavour, 35  
20063 Cernusco S/N (MI)  
telefono 02-92150794  
fax 02-92157285  
info@listarfish.it  
www.listarfish.it

## CCP Ab ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against cyclic citrullinated peptides (CCP) in human serum or plasma



**DE7760**



**96 wells**

**CONTENTS / CONTENIDO / CONTENUTI**

1.	NAME AND INTENDED USE .....	3
2.	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3.	SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST .....	3
4.	CONTENTS OF THE KIT .....	4
5.	MATERIALS REQUIRED .....	4
6.	SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING .....	4
7.	STORAGE AND STABILITY .....	4
8.	PROCEDURAL NOTES .....	5
9.	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	5
10.	PREPARATION OF REAGENTS .....	6
11.	TEST PROCEDURE .....	6
12.	VALIDATION .....	6
13.	CALCULATION OF RESULTS .....	6
14.	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	7
15.	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....	8
1.	DESCRIPCIÓN BREVE .....	9
2.	METODOLOGÍA .....	9
3.	CONTENIDO DEL KIT .....	9
4.	EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO .....	9
5.	RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION .....	10
6.	CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD .....	10
7.	NOTAS TECNICAS .....	10
8.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	11
9.	PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	11
10.	PROCEDIMIENTO .....	12
11.	VALIDACIÓN .....	12
12.	INTERPRETACION DE RESULTADOS .....	12
13.	LOS CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO .....	13
14.	LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO .....	14
1.	BREVE DESCRIZIONE .....	15
2.	METODOLOGIA .....	15
3.	CONTENUTO DEL KIT .....	15
4.	MATERIALE NECESSARIO .....	15
5.	RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI .....	16
6.	CONSERVAZIONE E STABILITÀ .....	16
7.	AVVERTENZE OPERATIVE .....	16
8.	INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI .....	17
9.	PREPARAZIONE DEI REAGENTI .....	17
10.	ESECUZIONE DEL TEST .....	18
11.	CONVALIDA .....	18
12.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI .....	18
13.	CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO .....	19
14.	LIMITI DEL PROCEDIMENTO .....	20
	REFERENCES .....	21
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	24

## 1. NAME AND INTENDED USE

CCP Ab is an ELISA test system for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against cyclic citrullinated peptides (CCP) in human serum or plasma. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

Highly purified cyclic citrullinated vimentin peptides (CCP) is bound to microwells.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps: Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue colored product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product. The intensity of the yellow color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

## 3. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune diseases. It is characterized by a progressive inflammation of the joints, leading to gradual damage and loss of their function. Early diagnosis of RA and immediate onset of an appropriate treatment is essential for prevention of complete joint damage. In addition to rheumatoid factors, autoantibodies against citrullinated antigens (ACPA) have proven to be valuable tools for the serological diagnosis of early RA. They have become a critical component of the new 2010 ACR criteria for the classification of RA, and account for three of the six points required to verify a diagnosis of RA [2,3].

It has been demonstrated in numerous studies that antibodies against citrullinated peptides from enolase, fibrinogen and especially vimentin occur in RF-negative patients. Citrullinated vimentin has been detected in the rheumatoid synovial tissue of RA patients and is involved in the initiation of ACPA production [4,5,6].

Autoantibodies against mutated citrullinated vimentin (Anti-MCV) are sensitive and specific markers for RA. They correlate with an erosive course of disease with severe joint damage and extra articular manifestations [7]. A strong correlation between Anti-MCV titres in RA patients and disease activity score (DAS) has been described [8].

CCP Ab combines the many advantages of the detection of autoantibodies against the native autoantigen mutated citrullinated vimentin (MCV), which have been demonstrated in many publications [9-18], with the strengths of modern peptide synthesis. CCP Ab is based on specific optimized peptide epitopes from the body's own MCV protein. This tailored antigen profile gives the test the highest sensitivity (up to 92%) while maintaining high specificity (up to 98%).

CCP Ab detects autoantibodies very early— sometimes even years before symptoms become evident. Persons without symptoms but with an increased Anti-CCP antibody titre are at high risk for future RA development. Furthermore, a positive result is predictive for a severe course of RA. Therefore, CCP Ab is an effective tool for rapid and precise routine diagnosis and favors immediate implementation of treatment.

#### 4. CONTENTS OF THE KIT

Sufficient for 96 determinations

**SORB** **MT** One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.

**6x 1.5 ml CAL** Calibrator A-F (0, 20, 40, 100, 300, 1000 U/ml), containing CCP antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN<sub>3</sub> 0.09%), yellow. Ready to use.

**2x 1,5 ml CONTROL 1 & 2** Control positive (1) & negative (2), containing CCP antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN<sub>3</sub> 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.

**20 ml SAM DIL 5x** Sample Buffer P, containing PBS, BSA, detergent, preservative NaN<sub>3</sub> 0.09%, yellow, concentrate (5x).

**15 ml ENZ CONJ** Enzyme Conjugate containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%, light red. Ready to use.

**15 ml SUB TMB** TMB Substrate; containing 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine, colorless. Ready to use.

**15 ml STOP SOLN** Stop Solution; contains acid. Ready to use.

**20 ml WASH SOLN 50x** Wash Buffer, containing Tris, detergent, preservative NaN<sub>3</sub> 0.09%; 50x conc.

#### 1 Instruction for Use

#### 1 Certificate of Analysis

#### 5. MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

#### 6. SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

#### 7. STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C. We recommend consumption on the same day.

**8. PROCEDURAL NOTES**

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28°C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples & different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

**9. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Controls, calibrators, sample buffer and wash buffer contain sodium azide (NaN<sub>3</sub>) 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.

- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:

Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.

- Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitrile rubber or natural latex.
- Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
- Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
- For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

## 10. PREPARATION OF REAGENTS

### Wash Buffer

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

### Sample Buffer

Sample Buffer P: Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

### Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well.

**Note:** Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

## 11. TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette 100 µl of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µl of wash solution.
4. Dispense 100 µl of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for 15 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µl of wash solution.
7. Dispense 100 µl of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature
9. Add 100 µl of stop solution to each well of the modules
10. Incubate for 5 minutes at room temperature.
11. Read the optical density at 450 nm (reference 600-690nm) and calculate the results.
12. The developed color is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

**Example for a pipetting scheme:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1, ... patient sample    A-F calibrators    C+, C- controls

## 12. VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit. If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

## 13. CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

## 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Calibration

This assay system is calibrated in relative arbitrary units. It is calibrated against an external anti-CCP Assay, since no international reference sera for RA diagnostic are available so far.

### Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 1000 U/ml

### Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay: Cut-off 20 U/ml

### Interpretation of results

Negative: < 20 U/ml

Positive: ≥ 20 U/ml

### Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed U/ml	Expected U/ml	O/E %
1	1:100	1109.2	1109.2	100
	1:200	467.3	550.0	85
	1:400	245.4	275.0	89
	1:800	115.0	137.5	84
	1:1600	57.1	68.9	83
	1:3200	31.4	29.7	106
	1:6400	14.4	14.9	97
	1:12800	7.6	7.4	103
2	1:100	320.4	320.4	100
	1:200	165.0	174.9	94
	1:400	94.8	87.4	108
	1:800	48.4	43.7	111
	1:1600	24.6	21.9	112
3	1:100	122.1	122.1	100
	1:200	61.0	59.3	103
	1:400	31.3	29.7	105
	1:800	14.5	14.8	98
	1:1600	7.5	7.4	101

### Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 1 U/ml

### Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	18.6	7.8
2	83.8	6.0
3	297.5	8.6

Inter-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	26.4	9.9
2	75.9	7.9
3	304.7	9.6

**Interfering substances**

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

**Study results**

Study population	n	n Pos	%
Rheumatoid Arthritis	259	237	91.5
Other Arthritis	22	6	27.3
Other rheumatic disease	37	1	2.7
Healthy controls	118	1	0.8

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
Pos Neg	Pos	237	8	
	Neg	22	169	
		259	177	436

Sensitivity            91.5 %  
 Specificity            95.5 %  
 Overall agreement    93.1 %

**15. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.



**Interferencias**

No se ha observado ninguna interferencia con sueros hemolíticos (hasta 1000 mgr./dL), lipémicos (hasta 3gr./dL triglicéridos) o ictericos (hasta 40 mgr./dL) Ni se han observado efectos de interferencia con anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato).

**Resultados del estudio**

Study population	n	n Pos	%
Rheumatoid Arthritis	259	237	91.5
Other Arthritis	22	6	27.3
Other rheumatic disease	37	1	2.7
Healthy controls	118	1	0.8

		Diagnostico clinico		
		Pos	Neg	
Pos	Pos	237	8	
	Neg	22	169	
		259	177	436

Sensibilidad 91.5 %  
 Especificidad 95.5 %  
 Eficiencia diagnostica 93.1 %

**14. LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO**

Este ensayo es una ayuda diagnóstica. El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una prueba, sino que debe ser realizada por el médico después de todo, los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados respecto a la imagen completa clínica del paciente. También todas las decisiones de tratamiento deben tenerse en cuenta individualmente.

Los rangos de referencia anteriores, deberían considerarse únicamente como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de anticuerpos en muestras de pacientes.

## 1. BREVE DESCRIZIONE

CCP Ab è un test immunometrico ELISA per la misurazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG contro cyclic citrullinated peptides (CCP) in campioni di siero umano o plasma. Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale nella diagnostica in vitro.

## 2. METODOLOGIA

Micropiastra: rivestiti con antigene purificato CCP peptides. La determinazione è basata su una reazione immune indiretta legata a un enzima con le seguenti fasi: gli anticorpi presenti nei campioni positivi legano gli antigeni presenti sulla superficie dei due pozzetti di reazione formando un complesso antigene-anticorpo. Dopo un periodo di incubazione, una prima fase di lavaggio rimuove le molecole non legate e le molecole non specifiche legate. Successivamente l'enzima coniugato aggiunto lega il complesso antigene-anticorpo fissato. Dopo un periodo di incubazione, una seconda fase di lavaggio rimuove l'enzima coniugato non legato. L'aggiunta della soluzione di enzima-substrato provoca idrolisi e la comparsa del colore durante l'incubazione. L'aggiunta di un acido interrompe la reazione formando un giallo prodotto finale. L'intensità del colore giallo è correlata alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo e può essere misurata fotometricamente a 450 nm.

## 3. CONTENUTO DEL KIT

Sufficiente per 96 determinazioni

**SORB** **MT** **Micropiastra a pozzetti separabili** costituita da 12 strisce da 8 pozzetti. Pronto per l'uso.

**6x 1.5 ml CAL** **Calibratore A-F (0, 20, 40, 100, 300, 1000 U/ml)**, contenente anticorpi CCP in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente,  $\text{NaN}_3$  0.09%). Pronto per l'uso.

**2x 1.5 ml CONTROL** **Controllo positivo (1) & negativo (2)**; contiene anticorpi CCP, PBS, BSA, detergente;  $\text{NaN}_3$  0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.

**20 ml SAM** **DIL** **5x** **Tampone del campione P**; giallo; PBS, BSA, detergente  $\text{NaN}_3$  0.09% come conservante, concentrato 5x.

**15 ml ENZ** **CONJ** **Coniugato enzimatico**; rosso chiaro; contiene anticorpi IgG antiumani marcati con perossidasi, PBS, BSA, detergente; 0,05% ProClin 300 come conservante. Pronto per l'uso.

**15 ml SUB** **TMB** **TMB Substrato**. Reagente pronto all'uso.

**15 ml STOP** **SOLN** **Soluzione Stoppante** (contiene acido). Pronto per l'uso.

**20 ml WASH** **SOLN** **50x** **Tampone di lavaggio**; contiene elettroforesi triacetato, detergente,  $\text{NaN}_3$  0,09% come conservante; concentrato 50x.

### 1 Istruzioni per l'uso

### 1 Certificato di analisi

## 4. MATERIALE NECESSARIO

- Lettore di micropiastre con possibilità di misurazione end point, a 450 nm; riferimento 620 nm opzionale
- Software per l'elaborazione dei dati
- Dispensatore multicanale o pipetta sequenziale da 100 ml
- Micropipette con puntali monouso 10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$
- Agitatore di tipo vortex
- Orologio da laboratorio
- Acqua distillata oppure deionizzata
- Cilindro di misura per 1000 ml, 100 ml
- Bottiglie di plastica per la conservazione della soluzione di lavaggio

### Automazione

Questo saggio ELISA può essere utilizzato su processori automatici aperti ELISA. L'applicazione deve essere convalidata sul rispettivo sistema automatizzato. Le informazioni sono fornite su richiesta.

## **5. RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI**

- I campioni di sangue si devono ottenere in conformità alle direttive vigenti.
- Lasciare che il sangue si coaguli e ricavare il siero per centrifugazione.
- L'uso di sieri emolitici, lipemici ed itterici va evitato.
- I campioni di siero e di plasma si possono conservare raffreddati a 2 - 8 °C fino a 5 giorni.
- Se si prevede una conservazione più lunga, i campioni dovrebbero essere aliquotati e surgelati a -20 °C.
- Evitare lo scongelamento ed il congelamento ripetuti! Questo può portare alla perdita variabile dell'attività autoimmune o degli anticorpi.
- L'uso di sieri termoattivati è sconsigliato.

## **6. CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

- Immagazzinamento della confezione di prova a 2-8 °C al buio.
- Durante l'immagazzinamento e l'utilizzo non esporre i reagenti a calore, sole o eccessiva luce.
- Immagazzinare micropiastra nel sacchetto con clip in dotazione, sigillate e con il dissecante.
- I reagenti non aperti sono stabili fino alla scadenza della confezione di prova. Vedere l'etichetta del singolo lotto.
- Il tampone di lavaggio diluito e il tampone del campione diluito sono stabili per almeno 30 giorni a una temperatura di 2-8°C. Consigliamo di consumare in giornata le soluzioni pronte.

## **7. AVVERTENZE OPERATIVE**

- Non usare kit scaduti.
- Non intercambiare componenti di kit con diversi numeri di lotto e prodotti.
- Tutti i materiali devono essere conservati a temperatura ambiente.
- Preparare tutti i reagenti ed i campioni. Una volta avviato il ciclo analitico, eseguito la prova senza interruzioni.
- Determinazioni doppie possono essere fatto. In questo modo errori di pipettamento può diventare evidente.
- Utilizzare la procedura analitica indicata.
- Usare sempre campioni freschi.
- Pipettare reagenti e campioni sul fondo del pozzetto.
- Per evitare di riporto o contaminazione, cambiare la punta della pipetta tra i campioni ed i controlli kit differenti.
- Lavare accuratamente i pozzetti e rimuovere tutte le goccioline di tampone di lavaggio al fine.
- Rispettare accuratamente i tempi di incubazione.
- Non riutilizzare piastre già usate.

## 8. INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI

- Tutti i reagenti di questa confezione di prova sono destinati esclusivamente all'uso da parte di personale specializzato nella diagnostica in vitro.
- I componenti, che contengono siero umano, sono stati testati con metodi riconosciuti dalla FDA per rilevare la presenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2 e sono risultati negativi. Poiché nessun test può garantire l'assenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2, consigliamo di trattare tutti i componenti della confezione di prova contenenti siero come materiale potenzialmente infettivo.
- L'albumina di siero bovino (BSA), contenuta nei componenti, è stata testata per rilevare la presenza di ESB ed è risultata negativa.
- Evitare il contatto con il substrato enzimatico TMB (3,3', 5,5'-tetrametil benzidina).
- Soluzione Stoppante contiene acido. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa. Evitare il contatto con gli occhi.
- Il mezzo di controllo, die calibrator, il Tampone del campione e il tampone di lavaggio contengono 0.09% di azoturo di sodio come conservante. Questa concentrazione non è classificata come pericolosa.
- Il coniugato enzimatico contiene 0.05% di ProClin 300 come conservante. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa.

Durante la manipolazione di reagenti, mezzi di controllo e campioni dei pazienti si devono osservare le normali norme di sicurezza e la buona prassi di laboratorio:

- Misure di pronto soccorso: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e accuratamente con acqua e sapone. Togliersi abiti e scarpe contaminati e lavarli prima di usarli nuovamente. Se il liquido del sistema dovesse entrare in contatto con la cute, lavare accuratamente con acqua. Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare con acqua corrente per almeno 10 minuti con le palpebre ben aperte. In caso di necessità consultare un medico.
- Misure in caso di rilascio involontario: osservare le norme di sicurezza della buona prassi di laboratorio. Evitare il contatto con occhi e cute. Non ingerire. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere, fumare o truccarsi nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni oppure i componenti del prodotto. Raccogliere eventuali versamenti con materiale inerte ed eseguire uno smaltimento adeguato dei rifiuti.
- Dispositivi di protezione individuale: indossare guanti protettivi in lattice o nitrile. Indossare occhiali di protezione.
- In caso di uso conforme non sono note reazioni pericolose.
- Condizioni da evitare: poiché il substrato TMB è fotosensibile, immagazzinare al buio.
- I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni ambientali nazionali e locali.

Osservare le direttive per il controllo di qualità nei laboratori medici riguardanti il trasporto di sieri di riferimento e/o pool di sieri.

## 9. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

### Tampone di lavaggio

Il contenuto di ogni flacone del concentrato del tampone di lavaggio (20 ml) va diluito prima dell'uso fino ad un volume finale di 1000 ml (1 litro), aggiungendo dell'acqua distillata.

### Tampone del campione

Tampone del campione P: Prima dell'uso, diluire il contenuto (20 ml) di ciascun flacone di diluente campioni concentrato 5x con acqua distillata o deionizzata fino a un volume finale di 100 ml.

### Preparazione dei campioni

Prima di utilizzare nel test diluire tutti i campioni dei pazienti 1:100 con il tampone del campione: Mettere 990 µl di tampone campione diluito in un tubo di polistirolo e aggiungere 10 µl di campione. Mescolare bene.

I controlli sono pronti per l'uso e non necessitano di diluizioni.

## 10. ESECUZIONE DEL TEST

Prelevare il numero di strip necessario per l'analisi in funzione del numero di campioni, controlli e calibratori

1. Dispensare nei rispettivi pozzetti 100 µl dei calibratori, controlli e campioni prediluiti.
2. Incubare per 30' a temperatura ambiente (20-28 °C)
3. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio
4. Dispensare 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto
5. Incubare per 15' a temperatura ambiente (20-28 °C)
6. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio
7. Dispensare 100 µl di TMB in ciascun pozzetto
8. Incubare per 15' a temperatura ambiente (20-28 °C)
9. Dispensare 100 µl di Soluzione Stoppante a ciascun pozzetto
10. Incubare per 5' a temperatura ambiente (20-28 °C)
11. Leggere la Densità Ottica a 450 nm (riferimento 600-690 nm) e calcolare il risultato.
12. Il colore è stabile per almeno 30'. Leggere in questo periodo di tempo.

**Esempio di un sistema di dispensazione:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1, ... Campioni    A-F Calibratore    C+, C- Controllo

## 11. CONVALIDA

Il test è valido è valido solo se le densità ottiche a 450 nm dei calibratori / controlli ed i risultati di lettura per i controlli cadono nei limiti indicati sul certificato di analisi allegato a ciascun kit. Se tutti questi criteri non sono riscontrati, i risultati devono essere considerati non validi e il test deve essere ripetuto.

## 12. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per ottenere risultati quantitativi riportare la densità ottica di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione del calibratore per costruire una curva di calibrazione. La concentrazione dei campioni da analizzare è determinata tramite la curva di calibrazione così estrapolata. Software per l'elaborazione dei dati con i 4 parametri curva e lin-log per densità ottica e la concentrazione è il metodo migliore.

### 13. CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

#### Calibrazione

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie, poiché non esiste uno standard internazionale.

#### Campo di misura

Il campo di misura è pari a 0 - 1000 U/ml

#### Valori normali

Nell'ambito di uno studio sul campo di riferimento con campioni di donatori di sangue sani sono stati rilevati i seguenti valori: valore limite 20 U/ml

#### Interpretazione dei risultati

Negativo < 20 U/ml

Positivo ≥ 20 U/ml

#### Linearità

Campioni di pazienti con un'elevata concentrazione di anticorpi specifici sono stati sottoposti a diluizione lineare nel tampone per stabilire il campo dinamico dell'analisi nonché l'estremità inferiore e superiore della linearità. L'attività degli anticorpi di ogni stadio di diluizione è stata calcolata dalla curva di calibrazione con un 4 parametri con assi lin-log coordinate.

Campione	Diluizione	Osservato U/ml	Previsto U/ml	O/P %
1	1:100	1109.2	1109.2	100
	1:200	467.3	550.0	85
	1:400	245.4	275.0	89
	1:800	115.0	137.5	84
	1:1600	57.1	68.9	83
	1:3200	31.4	29.7	106
	1:6400	14.4	14.9	97
	1:12800	7.6	7.4	103
2	1:100	320.4	320.4	100
	1:200	165.0	174.9	94
	1:400	94.8	87.4	108
	1:800	48.4	43.7	111
	1:1600	24.6	21.9	112
3	1:100	122.1	122.1	100
	1:200	61.0	59.3	103
	1:400	31.3	29.7	105
	1:800	14.5	14.8	98
	1:1600	7.5	7.4	101

#### Limite di determinazione

Sensibilità funzionale 1 U/ml

#### Specifiche Tecniche

Precisione intra-assay: il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni ognuno con 24 definizioni in un ciclo. I risultati della precisione nella serie sono riassunti nella tabella.

Precisione intra-assay: il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni rispettivamente da 6 definizioni in 5 cicli. I risultati della precisione da ciclo a ciclo sono riassunti nella tabella.

Intra-Assay		
Campione	Mezzo U/ml	CV %
1	18.6	7.8
2	83.8	6.0
3	297.5	8.6

Inter-Assay		
Campione	Mezzo U/ml	CV %
1	26.4	9.9
2	75.9	7.9
3	304.7	9.6

#### Interferisce

Non si ha osservato ninguna interferencia con emolitico (fino a 1000 mg/dL), lipideo (fino a 3 g/dL di trigliceridi) o bilirubina (fino a 40 mg/dL) contenenti siero. Nessuna osservato efetto di interferencia con anticoagulantes (EDTA, eparina, citrato).

### Risultati dello studio

Study population	n	n Pos	%
Rheumatoid Arthritis	259	237	91.5
Other Arthritis	22	6	27.3
Other rheumatic disease	37	1	2.7
Healthy controls	118	1	0.8

		Diagnosi clinica		
		Pos	Neg	
Pos Neg	Pos	237	8	
	Neg	22	169	
		259	177	436

Sensibilita	91.5 %
Specificita	95.5 %
Efficienza diagnostica	93.1 %

### 14. LIMITI DEL PROCEDIMENTO

Questo test è una ausilio diagnostico. La diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatta dal medico, dopo tutto i risultati clinici e di laboratorio sono state valutate concernente l'intero quadro clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia dovrebbe essere presa individualmente.

Gli intervalli di riferimento sopra patologiche e normale per gli anticorpi nei campioni dei pazienti devono essere considerati come raccomandazioni solo. Ogni laboratorio deve stabilire i propri range secondo la ISO 15189 o ad altre linee guida del laboratorio applicabili.












**REFERENCES**

1. Bang H, Egerer K, Gauliard A, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel auto-antigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56(8):2503, 2007.
2. Aletaha D, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 62 (9):2569-2581, 2010.
3. Pruijn GJ, Wiik A, van Venrooij WJ. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12 (1):203, 2010.
4. Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Toes RE, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 62 (1):44-52, 2009.
5. Van Steendam K, Tilleman K, Deforce D. The relevance of citrullinated vimentin in the production of antibodies against citrullinated proteins and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2011.
6. Van Steendam K, Tilleman K, De Ceuleneer M, De Keyser F, Elewaut D, Deforce D. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res Ther* 12 (4):R132, 2010.
7. Syversen SW, Goll GL, van der Heijde D, Landewe R, Lie BA, Odegard S, Uhlig T, Gaarder PI, Kvien TK. Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a ten-year prospective study. *Ann.Rheum.Dis.* 69 (2):345-351, 2009.
8. Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, Jidell E, Berglin E, Dahlqvist SR. Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides. *J Rheumatol.* 35(6):1002, 2008.
9. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, et al. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum.* 58(1):36, 2008.
10. Soós L, Szekanecz Z, Szabó Z, et al. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 34(8):1658, 2007.
11. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd- and 3rd-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clin Chem.* 53 (8):1527, 2007.
12. Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, Bossuyt X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* 53(3):498, 2007.
13. Dejaco C, Klotz W, Larcher H, Duftner C, Schirmer M, Herold M. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 8(4):R119, 2006.
14. Keskin G, Inal A, Keskin D, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-modified citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis. *Protein Pept Lett.* 15(3):314 2008.
15. Poulosom H, Charles PJ. Antibodies to citrullinated vimentin are a specific and sensitive marker for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 34(1):4 2008.
16. Song JS, Park GB, Park AJ. Comparison of anti-mutated citrullinated vimentin with anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factors for the diagnostic value of rheumatoid arthritis [in Korean]. *J Korean Rheum Assoc.* 14(3):235 2007.
17. Ursum J, Nielsen MM, van Schaardenburg D, et al. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study. *Arthritis Res Ther.* 10(1):R12, 2008.
18. Besada E, Nikolaisen C, Nossent H. Diagnostic value of antibodies against mutated citrullinated vimentin for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 29(1):85 2011.



- 1 Pipet **100 µl** calibrator, control or patient sample
  - Incubate for **30 minutes** at room temperature
  - Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 2 Pipet **100 µl** enzyme conjugate
  - Incubate for **15 minutes** at room temperature
  - Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 3 Pipet **100 µl** substrate solution
  - Incubate for **15 minutes** at room temperature
- 4 Add **100 µl** stop solution
  - Leave untouched for **5 minutes**
  - Read at **450 nm**

## SYMBOLS USED WITH ASSAY

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore



Distribuito in ITALIA da  
**Li StarFish S.r.l.**  
 Via Cavour, 35  
 20063 Cernusco S/N (MI)  
 telefono 02-92150794  
 fax 02-92157285  
 info@listarfish.it  
 www.listarfish.it