

QUANTA Lite™ CCP 3.1 IgG/IgA ELISA 704550

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

Verwendungszweck

Der QUANTA Lite™ CCP3.1 IgG/IgA ELISA ist ein semiquantitativer Enzymimmunoassay (ELISA) für den Nachweis von IgG- und IgA-Anti-CCP3 (cyclisches citrulliniertes Peptid 3)-Antikörpern in Patientenserum oder Citrat- oder EDTA-Plasma. Der Nachweis dieser Antikörper dient in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden als Hilfe bei der Diagnose von rheumatoider Arthritis (RA), einschliesslich RA die innerhalb von 2 Jahren nach Auftreten der Symptome diagnostiziert wurde.

Informationen zum Test

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten systemischen Autoimmun-Erkrankungen, die ca. 0,5 % der Weltbevölkerung befällt.¹ Die Diagnose hängt in erster Linie von klinischen Manifestationen der Krankheit ab. Bis vor kurzem war der einzige in der Routine verwendete serologische Test die Bestimmung des Rheumafaktors (RF), der bei ca. 50-90 % dieser Patienten nachgewiesen wird.^{1,2} Der RF wird allerdings auch bei Personen mit Infektionen, anderen Autoimmunerkrankungen und bei einigen gesunden Personen gefunden.^{1,2}

Für die Therapie ist es wichtig, Personen mit RA so früh wie möglich zu diagnostizieren und zu behandeln.³ Es ist seit vielen Jahre bekannt, dass Anti-perinukleäre Autoantikörper (auch als Anti-Keratin Autoantikörper bezeichnet) bei Personen mit RA gefunden werden. Erst kürzlich hat man entdeckt, dass die Antikörper ein Epitop erkennen, das die deimidierte Form von Arginin, Citrullin, enthält.^{4,5} Man stellte fest, dass ein ringförmiges Peptid, das Citrullin enthält, CCP (Cyclisches Citrullin-Peptid), die RA-Patienten besser als der perinukleäre Antikörper-Test oder Rheumafaktor-Tests von anderen Patienten unterscheidet.^{6,7} In einer Besprechung der veröffentlichten Literatur⁸ waren 68% der Patienten mit RA positiv für Anti-CCP, während ca. 5% der nicht RA positiven Testpersonen positiv waren.

Ein ELISA mit der ursprünglich beschriebenen CCP-Sequenz⁵ wurde nicht breit vermarktet. Die 2. Generation der Anti-CCP-Tests (von einigen Firmen als CCP2 bezeichnet) ist allerdings weit verbreitet und zeigt verglichen mit dem Originalpeptid erstklassige Testleistung.⁹ Bei INOVA heißt die 2. Testgeneration CCP IgG-ELISA. Wichtig ist, dass Anti-CCP in Patienten mit früher RA⁸ nachgewiesen wird, und manchmal die Entwicklung besser vorhersagt als RF.^{4,7} Antikörper von einigen RA-Patienten, die Anti-CCP2 negativ waren, reagierten mit anderen Citrullin-Proteinen,^{6,7} was darauf hinweist, dass es zusätzliche Epitope gibt, die in der CCP-Antigen-Sequenz der 2. Generation nicht vorhanden sind. 2005 wurden Kits mit einem Antigen der dritten Generation (CCP3) zur Verfügung gestellt. Diese 3.Generation Peptid tests waren im Vergleich zu CCP2 Antigen Tests um circa 5% mehr sensitive und gleich spezifisch.¹⁰ Dieses Kit verwendet ein Konjugat, das neben den üblichen IgG-Antikörpern auch IgA-Antikörper nachweist. Die Sensitivität des CCP3-Kits erhöht sich aufgrund einiger RA-Patienten mit IgA-Antikörpern gegen CCP3 ohne Vorhandensein von IgG.¹¹ Zu den weiteren Verbesserungen, die der CCP 3.1 ELISA aufweist, zählen farbcodierte abreißbare Vertiefungen sowie die Möglichkeit, Serum- oder Plasmaproben zu verwenden.

Testprinzip

Das im QUANTA Lite™ CCP 3.1 IgG/IgA ELISA verwendete Antigen ist ein synthetisch, citrulliniertes Peptid. Antikörper gegen dieses Antigen weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von RA auf. Das Antigen wurde an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Die vorverdünnten Kontrollen und die verdünnten Patientenproben werden in separate Mulden gegeben, um vorhandenen CCP IgG/IgA- Antikörpern die Möglichkeit zu geben, an das immobilisierte Antigen zu binden. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humanes IgG/IgA wird in die Kavitäten pipettiert und bindet während einer zweiten Inkubation an den Patienten-Antikörper. Nachdem in einem weiteren Waschschrift das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein Chromogen-Substrat zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgt durch einen Vergleich der Extinktionswerte der Patienten mit dem Wert eines Kalibrators oder einer Standardkurve.

Inhalt der Testpackung

1. Mikrotiter-ELISA-Platte beschichtet mit hochgereinigtem CCP 3.1 Antigen (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter in Folienverpackung und Trockenmittel
2. ELISA Negative Kontrolle, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum ohne humane Antikörper gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
3. CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive (Kalibrator), 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
4. CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive (Kalibrator A), 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
5. CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator B, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL

6. CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator C, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
7. CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator D, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
8. CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator E, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen CCP, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
9. HRP Probenverdünner, 1 Flasche – rosa gefärbt mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung, Tween 20, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 50 mL
10. Hohes Specificity Waschkonzentrat, 1 Flasche mit 10fachem Konzentrat – rot gefärbt mit gepufferter Kochsalzlösung und Tween 20, 100 mL. Zur Verdünnung bitte das entsprechende Kapitel in der Anleitung beachten.
11. HRP CCP 3.1 IgG/IgA Konjugat, (Ziege), anti-humanes IgG, 1 Flasche – gelb gefärbt mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 10 mL
12. TMB Chromogen, 1 Flasche mit Stabilisatoren, 10 mL
13. HRP Stopplösung, 0,344 M Schwefelsäure, 1 Flasche – farblos, 10 mL

Hinweise

1. VORSICHT: Probenverdünner, Kontrollen und Konjugat enthalten 0,02% Chloramphenicol. Es ist im US-Bundesstaat Kalifornien und allgemein bekannt, dass dieser Stoff Krebs verursachen kann.
2. Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.¹²
3. NaN_3 wird als Stabilisator verwendet. NaN_3 ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.
4. Das HRP Konjugat enthält eine verdünnte Chemikalie, die bei Einnahme toxisch wirken kann. Daher den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
5. Das TMB Chromogen enthält ein Reizmittel, das bei Inhalation, Einnahme oder Absorption durch die Haut gesundheitliche Schäden verursachen kann. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
6. Die HRP Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Den Kontakt mit Basen, Metallen und anderen Stoffen, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Schwefelsäure ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen hervorrufen. Den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
7. Die vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung während der Arbeit mit Reagenzien tragen.
8. Verschüttete Reagenzien sofort beseitigen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle Umweltvorschriften beachten.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Dieser Test ist für "In-Vitro Diagnostik".
2. Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
3. Unvollständiges Waschen und ungenügendes Entfernen der Flüssigkeiten aus den ELISA Kavitäten führt zu einer schlechten Präzision und zu hohen Hintergrund-Extinktionen.
4. Die Adaptation dieses Testsystems auf automatische Probenverarbeitung und andere Instrumentierung, ganz oder teilweise, kann unterschiedliche Ergebnisse zur manuellen Durchführung ergeben. Es liegt in der Verantwortung eines jeden Labors, die automatische Bearbeitung so zu überprüfen, dass Testergebnisse innerhalb akzeptabler Bereiche erzielt werden.
5. Eine Reihe von Faktoren beeinflusst das Testergebnis. Hierzu zählen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Pipettierung, der Typ des verwendeten Photometers, die Temperatur der Reagenzien, die Umgebungs-Temperatur, die Gründlichkeit des Waschens und der Entfernung der Flüssigkeiten aus den Vertiefungen der ELISA-Streifen, und die Einhaltung der Inkubationszeiten. Es ist deshalb sehr wichtig, für gleichbleibende Bedingungen zu sorgen.
6. Die strikte Einhaltung der Testprozedur wird empfohlen. Jede Änderung im Protokoll erfolgt auf Risiko des Anwenders.
7. Das unvollständige Verschließen der Mikrotiterkavitäten und des Trockenmittels führt zu Antigenabbau und schlechter Präzision.
8. Eine unakzeptabel niedrige Absorption kann beobachtet werden, wenn eine Flasche HRP Konjugat bei zwei- oder mehrfachem Gebrauch über einen längeren Zeitraum benutzt wird. Daher ist es wichtig, die Hinweise zum Umgang mit dem HRP Konjugat genau zu beachten.
9. Chemische Kontamination des HRP Konjugates kann durch unzureichendes Reinigen oder Spülen der Ausrüstung oder der Instrumente verursacht werden. Rückstände gebräuchlicher Laborchemikalien wie z.B. Formalin, Bleichmittel, Ethanol oder Spülmittel führen zum Abbau des HRP Konjugates im Verlauf der Zeit. Das gründliche Spülen der gesamten Ausrüstung und Instrumentierung nach Verwendung chemischer Reinigungsmittel ist daher unbedingt erforderlich.

Lagerung

1. Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.
2. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen.
3. Der verdünnte Waschlösungspuffer ist bei 2-8°C eine Woche stabil.

Proben

Diesen Vorgang entweder mit Serum oder Citrat- bzw. EDTA-Plasma durchführen, da diese Proben identische Ergebnisse ergaben. Kein Lithium- und Heparinplasma verwenden, da diese Ergebnisse von denen des Serums abweichen können. Zusatz von Azid oder anderen Konservierungsmitteln zu den Testproben kann eventuell die Ergebnisse in nicht erwünschter Weise beeinträchtigen. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Nach der Blutentnahme ist das Serum vom Blut zu trennen. Das NCCLS Dokument H18-A3 empfiehlt die folgenden Lagerungsbedingungen für Patientenproben: 1) Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. 2) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. 3) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen und vor der Testung gut geschüttelt werden.

Testdurchführung

In der Testpackung vorhandenes Material

- 1 CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Mikrotiterplatte (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter
- 1 1,2 mL vorverdünnte ELISA Negative Kontrolle
- 1 1,2 mL vorverdünnte CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle
- 1 1,2 mL vorverdünnte CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle (Kalibrator A)
- 1 1,2 mL vorverdünnte CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator B
- 1 1,2 mL vorverdünnte CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator C
- 1 1,2 mL vorverdünnte CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator D
- 1 1,2 mL vorverdünnte CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrator E
- 1 50 mL HRP Probenverdünner
- 1 100 mL Hohes Specificity Waschkonzentrat, 10faches Konzentrat
- 1 10 mL HRP CCP 3.1 IgG/IgA Konjugat (von der Ziege), anti-humanes IgG/IgA
- 1 10 mL TMB Chromogen
- 1 10 mL HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure

Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5, 100, 200-300 und 500 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 1 L Gefäß für verdünntes Hohes Specificity Waschkonzentrat
- Reader für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (und 620 nm für eine bichromatische Messung)

Methode

Testvorbereitung

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) und gründlich mischen.
2. Den gesamten Inhalt (100 mL) des Waschkonzentrats mit 900 mL Aqua dest. mischen (1:10 Verdünnung). Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8°C eine Woche stabil. Soll nicht die gesamte Mikrotiterplatte auf einmal verwendet werden, so können für einen Ansatz von 16 Kavitäten 10 mL Konzentrat mit 90 mL Aqua dest. gemischt werden.
3. Serumproben 1:101 verdünnen, indem 5 µL Serum mit 500 µL gebrauchsfertigem Probenverdünner gemischt werden. Verdünnte Proben sollen innerhalb von 8 Stunden getestet werden. Die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle, die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle **nicht verdünnen**.
4. Jeder Test benötigt zwei Kavitäten für jede der drei Kontrollen sowie eine oder zwei Kavitäten für die Patientenprobe (Es wird empfohlen, alle Proben in Doppelbestimmung anzusetzen, bis die erforderliche Präzision und Reproduzierbarkeit erreicht sind).
5. Falls sie ein quantitatives Ergebnis möchten, kann dies mit einer 5-Punkte Standardkurve errechnet werden. Für die Punkte A bis E der 5-Punkt-Standardkurve **VORVERDÜNNTE** CCP 3.1 IgG/IgA-Kalibratoren A bis E direkt aus dem Fläschchen zugeben. Die 5-Punkt-Standardkurve hat folgende Werte:

Punkt		Einheiten
A	Vorverdünnter CCP 3.1 IgG/IgA-Kalibrator A	250,0
B	Vorverdünnter CCP 3.1 IgG/IgA-Kalibrator B	125,0
C	Vorverdünnter CCP 3.1 IgG/IgA-Kalibrator C	62,5
D	Vorverdünnter CCP 3.1 IgG/IgA-Kalibrator D	31,25
E	Vorverdünnter CCP 3.1 IgG/IgA-Kalibrator E	15,62

Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.** Die entsprechende Anzahl Mikrotiterkavitäten abbrechen. Die Kavitäten im Rahmen befestigen. **Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
2. Je 100 µL der **gebrauchsfertigen** CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle, der CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle (Kalibrator A), des CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Kalibrators B bis E (falls gewünscht), der ELISA Negative Kontrolle und der verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Streifen abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren. Die Inkubationszeit beginnt nach Zugabe der letzten Probe.
3. Waschen: Den Inhalt aller Kavitäten absaugen. Die Kavitäten vollständig (200-300 µL) mit **verdünntem** HRP Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschritt noch zweimal wiederholen (Insgesamt: Drei Waschschritte). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Die Waschschritte sind in der selben Reihenfolge wie die Pipettierschritte durchzuführen.
4. 100 µL des HRP CCP 3.1 IgG/IgA Konjugates in jede Kavität geben. Sterile Pipetten verwenden! Nur das benötigte Volumen an Konjugat aus der Flasche entnehmen. **UNBENUTZTES KONJUGAT NICHT IN DIE FLASCHE ZURÜCKPIPETTIEREN. KONTAMINATIONSGEFAHR!!** Abgedeckte Streifen bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren, wie in 2. beschrieben.
5. Waschen: Schritt Nr. 3 wiederholen.
6. 100 µL TMB Chromogen in jede Kavität geben. 30 Minuten **im Dunkeln** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 100 µL HRP Stopplösung in jede Kavität pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des TMB Chromogens einhalten. Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln.
8. Die optische Dichte (OD) jeder Kavität bei 450 nm innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen. Es wird eine bichromatische Messung mit 620 nm als Referenzwellenlänge empfohlen.

Qualitätskontrolle

1. Die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle, die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden, um sicher zu stellen, dass alle Reagenzien und der Testansatz insgesamt ordnungsgemäß funktionieren.
2. Da die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle, die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle vorverdünnt sind, entfällt eine Vorverdünnung.
3. Zusätzliche Kontrollen zur Qualitätssicherung können gemäß den Richtlinien nationaler oder internationaler Regulierungs- oder Akkreditierungsbehörden eingesetzt werden. Geeignete Kontrollen können aus Humanserum gewonnen und bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.
4. Um sicher zu sein, dass alle Patientenwerte korrekt sind, müssen die nachfolgenden Kriterien erfüllt werden (Würden ein oder mehrere Kriterien nicht erfüllt, so ist das Ergebnis als ungültig zu betrachten und der Testansatz ist zu wiederholen).
 - a. Die Absorption der vorverdünnten CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle muss größer sein als die Absorption der vorverdünnten CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle. Die Absorption der Low Positive Kontrolle wiederum muss größer sein als die der vorverdünnten ELISA Negativkontrolle.
 - b. Die Absorption der vorverdünnten CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle muss größer als 1,0 sein, die Absorption der vorverdünnten Negative Kontrolle darf nicht größer als 0,2 sein.
 - c. Die Absorption der CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle muss mehr als doppelt so hoch sein wie die der ELISA Negative Kontrolle sein oder über 0,25.
 - d. Die ELISA Negative Kontrolle und die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle dienen der Sicherstellung der ordnungsgemäßen Funktionsweise des Testansatzes. Die CCP 3.1 IgG/IgA ELISA High Positive Kontrolle stellt die Präzision am Cut-off des Tests nicht sicher.
 - e. Der Anwender sollte unter anderem das CLSI (NCCLS) Dokument Nr. C24-A3 für zusätzliche Hinweise zur zeitgemäßen Qualitätskontrolle beachten.

Kalkulation von semi-quantitativen Ergebnissen – Berechnung mit der Ratio Methode

Zunächst sind die Mittelwerte der OD für die Doppelbestimmungen zu berechnen. Alle weiteren Berechnungen werden mit den entsprechenden Mittelwerten durchgeführt. Die Reaktivität jeder Patientenprobe wird bestimmt durch die Division des Mittelwertes der Proben-OD durch den Mittelwert der Low Positive Kontrolle und der Multiplikation dieses Ergebnisses mit dem chargenspezifischen Wert der CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle. Die chargenspezifischen Werte sind auf dem Fläschchenetikett aufgedruckt.

$$\text{Probenwert (Units)} = \frac{\text{OD der Probe}}{\text{CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrolle OD Wert}} \times \text{CCP 3.1 IgG/IgA ELISA Low Positive Kontrollwert (Units)}$$

Die Reaktivität verhält sich zur Konzentration der vorhandenen Antikörper nicht linear. Zunahme und Abnahme der Antikörperkonzentrationen von Patienten werden durch einen entsprechenden Anstieg oder Abfall der Reaktivität angezeigt, diese Änderungen sind jedoch nicht proportional (d.h. eine Verdoppelung der Antikörperkonzentration führt nicht zu einer Verdoppelung der Reaktivität).

Optionale Methode der Berechnung: Semi-quantitative Ergebnisse mit einer Standardkurve

Berechnung der Ergebnisse mit einer Standardkurve

1. Bestimmen Sie den Mittelwert für alle Doppelwerte.
2. Tragen Sie die Mittelwerte der Extinktionen (OD) von allen Proben in der Standardkurve gegen ihre Werte in Units auf. Benutzen Sie zur Auswertung eine lineare/linearer „Cubic Spline“ (dritter Ordnung oder polynomial) oder eine „Punkt-zu-Punkt“ Berechnung.
3. Bestimmen Sie die unbekannte anti-CCP 3.1 Konzentration, indem Sie die Units auf der „Y“-Achse auftragen und die dazugehörige Absorption auf der „X“- Achse. Berechnen Sie die unbekanntes Units.
4. Bemerkung: Die Werte, die mit der Ratio Methode errechnet wurden, werden sich von denen mit der Standardkurve errechneten Werten unterscheiden, besonders die hohen Werte. Die CCP 3.1 IgG/IgA High Positive Kontrolle wird nicht 250 Units mit der Ratio Methode erreichen.

Interpretation der Ergebnisse

Dieser ELISA-Test ist sehr sensitiv und in der Lage, sogar kleine Unterschiede in Patientenpopulationen zu messen. Die folgenden Werte dienen als Beispiel für die Interpretation der Testergebnisse. Es wird empfohlen, dass sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

Die Patientenprobe kann anschließend als negativ, schwach, deutlich positiv bis stark positiv klassifiziert werden.

	Units
Negativ	<20
Schwach positiv	20 - 39
Deutlich positiv	40 - 59
Stark positiv	≥60

1. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein von CCP 3.1 IgG/IgA Antikörpern an und gibt einen deutlichen Hinweis auf Rheumatoide Arthritis.
2. Ein negatives Ergebnis deutet auf das Nichtvorhandensein von CCP 3.1 IgG/IgA Antikörpern hin oder auf Konzentrationen unterhalb der Erfassungsgrenze des Testsystems.
3. Wir schlagen vor, die Laborergebnisse mit folgendem Hinweis zu versehen: „Die folgenden Ergebnisse wurden mit dem INOVA QUANTA Lite™ CCP 3.1 IgG/IgA ELISA erzielt. CCP 3.1 IgG/IgA Werte, die mit Testsystemen anderer Hersteller ermittelt wurden, können nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Höhe des gefundenen Titers kann nicht mit einem Endpunkttiter in Korrelation gebracht werden.“

Grenzen des Verfahrens

1. Immunkomplexe oder andere Immunglobulin-Aggregate im Patientenserum können nicht-spezifische Bindungen und falsch positive Ergebnisse hervorrufen.
2. Nicht alle RA Patienten haben CCP-Antikörper.
3. Ergebnisse dieses Testes müssen im Zusammenhang mit klinischen Ergebnissen und anderen serologischen Tests verwendet werden.
4. Die Testcharakteristika für andere Untersuchungsmaterialien als Serum oder Citrat- bzw. EDTA-Plasma wurden nicht bestimmt.
5. Der diagnostische Nutzen von Anti-CCP 3.1-Antikörpern bei Juveniler Rheumatoiden Arthritis wurde nicht untersucht.
6. Störfaktoren: Hohe Hämoglobin-, Bilirubin-, Cholesterin- oder Triglyzeridwerte bewirken keine falsch negativen oder falsch positiven Ergebnisse.

Erwartete Werte von klinischen Proben

Die Fähigkeit des QUANTA Lite™ CCP 3.1 IgG/IgA ELISA, IgG/IgA CCP 3.1-Antikörper nachzuweisen, wurde durch Vergleich von 924 Proben mit einem ELISA, das IgG Anti-CCP2 misst, evaluiert. 495 Patienten mit klinisch diagnostizierter RA wurden mit eingeschlossen von den internen (186) und externen (309) Studien. Es wurde ebenfalls Serum von 275 zufällig ausgewählten Blutspendern getestet. Von 272 Spendern waren Alter und Geschlecht bekannt: 72 waren weiblich, das Durchschnittsalter betrug 42,4 Jahre. Krankheitsbezogene Kontrollen umfassten in einer große internen Studie 74 Personen mit anderen rheumatischen Erkrankungen (ORD) wie systemischem Lupus erythematodes (34), Sjögren Syndrom (16) und Sklerodermie (24) sowie weitere 98 Proben mit Antikörpern gegen Infektionskrankheiten (ID) wie Hepatitis C (58), Herpes simplex-Virus (15), Zytomegalievirus (14), Toxoplasmose (6) und Röteln (5).

Klinische Sensitivität und Spezifität

Die folgende Tabelle fasst die Befunde aller unserer klinischen Studien zusammen.

Proben N=942	CCP 3.1 ELISA		CCP ELISA	
	+	-	+	-
RA (Gesamtmenge N=495)	348	147	320	175
RA – die innerhalb von 2 Jahren (N=86)	55	31	47	39
Gesamtkontrollen (N=447)	10	437	8	439
Blutspender (N=275)	2	273	3	272
Andere rheumatische Erkrankungen (N=74)	6	68	4	70
Infektionskrankheiten (N=98)	2	96	1	97

Klinische Sensitivität [(95% Konfidenzintervall (CI))] = CCP 3.1 = 70,3% (66-74%)

CCP = 64,6% (60-69%)

RA die innerhalb von 2 Jahren = CCP 3.1 = 64,0% (52-74%)

CCP = 54,7% (43-65%)

Klinische Spezifität (95% CI) =

CCP 3.1 = 97,8% (96-99%)

Positiv prozente vereinbarung

CCP = 98,2% (97-99%)

Methodenvergleich

N=942		CCP IgG ELISA		Gesamtmenge	% Vereinbargun (95% CI)
		Positiv	Negativ		
CCP3.1 IgG/IgA ELISA	Positiv	320	38*	358	Pos. % Vereinbargun=97,6% (95,3-98,9%)
	Negativ	8**	576	584	Neg. % Vereinbargun=93,8% (91,6-95,6%)
	Gesamtmenge	328	614	942	Gesamtmenge % Vereinbargun=95,1%

*33 dieser proben wurden mit RA diagnostiziert.

**5 dieser proben wurden mit RA diagnostiziert.

Kreuzreaktivität

Der QUANTA Lite™ CCP 3.1-ELISA wurde, um eventuelle Kreuzreaktionen des CCP 3.1-Antigens mit anderen Autoantikörpern zu bewerten, mit 16 Proben, alle mit hohen Titern anderer Autoantikörpern, evaluiert. In diese Gruppe wurden je 2 Proben eingeschlossen, die mit SS-A, SS-B, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1, Ribo-P und dsDNA reagierten. Alle Proben waren Anti-CCP 3.1 negativ. Die oben genannte Studie zeigt mit einer Vielzahl anderer Autoantikörper keine signifikante Kreuzreaktion des CCP 3.1-Antigens.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Unterschiede zwischen den Assays wurden mittels Testläufen im Doppelansatz von negativen, schwach positiven und stark positiven Proben in 6 separaten Assays an 5 verschiedenen Tagen gemessen. Die Unterschiede innerhalb des Assays wurden gemessen, indem 9 Proben je 9 oder 10-mal auf derselben ELISA-Mikrotiterplatte getestet wurden. Repräsentative Ergebnisse siehe unten.

Unterschiede zwischen

	Negativ 1		Schwach 1		Schwach 2		Stark 1	
	1 pt.*	5 pt.**	1 pt.	5 pt.	1 pt.	5 pt.	1 pt.	5 pt.
Durchschnittseinheiten	6 U	4 U	22 U	23 U	28 U	30 U	69 U	85 U
Standardabweichung	0,4	0,5	0,7	0,6	0,8	1,2	1,7	1,2
Variationskoeffizient %	8%	11%	3%	3%	3%	4%	2%	1%

Unterschiede innerhalb

	Negativ 1		Schwach 1		Schwach 2		Stark 1	
	1 pt.	5 pt.	1 pt.	5 pt.	1 pt.	5 pt.	1 pt.	5 pt.
Durchschnittseinheiten	4 U	2 U	22 U	24 U	26 U	30 U	68 U	81 U
Standardabweichung	0,2	0,2	0,9	1,1	0,9	1,0	1,9	3,2
Variationskoeffizient %	4%	13%	4%	5%	3%	3%	3%	4%

*Testergebnisse, Verhältnismethode

**Testergebnisse, Standardkurve

Referenzen

1. Wener MH: Rheumatoid Factors. Manual of Clinical Laboratory Immunology, NR Rose et al., eds, American Society for Microbiology Press, 961-972 (2002).
2. Borretzen M et al.: Rheumatoid Factors. Autoantibodies, Peter JB and Shoenfeld Y, eds, Elsevier Science B.V., 706-715 (1996).
3. Kim JK and Weisman MH: When does rheumatoid arthritis begin and why do we need to know? Arthritis Rheum 43: 473-484 (2000).
4. Vossenaar ER and Van Venrooij WJ: Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis. Clin Applied Immunol Rev 4: 239-262 (2004).
5. Schellekens GA et al.: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest. 101: 273-281 (1998).
6. Vittecoq O et al.: Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 135: 173-180 (2004).
7. Saraux A et al.: Value of antibodies to citrulline-containing peptides for diagnosing early rheumatoid arthritis. J Rheumatol 30: 2550-2539 (2003).
8. Avovac J et al: Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. Ann Rheum Dis 65: 845-851 (2006).
9. van Gaalen FA et al.: A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first- and second anti-cyclic citrullinated peptide autoantibody (CCP1 and CCP2) tests for rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 64: 1510-1512 (2005)
10. Mittermayer S et al.: A comparison of the frequency of autoantibodies to cyclic citrullinated peptides using a third generation CCP assay (CCP3) in systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis and rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol June 15, e-pub ahead of print (2007).
11. Vieira LEA et al: Rheumatoid arthritis diagnosis: a comparative study of second and third generation anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) ELISAs. Arthritis Rheum 56: S724 (2007).
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
624550DEU

888-545-9495
October 2009
Revision 2

