

AUTOMATIZOVANÉ STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI CYKlickÉMU CITRULINOVANÉMU PEPTIDU NA ANALYZÁTORU AxSYM

RICHARD PIKNER^a, DAVID SUCHÝ^b, JANA
ZÍTKOVÁ^a, HANA BRABCOVÁ^b, MARIE
BERANOVÁ^a a STANISLAV KORMUNDA^c

^a Oddělení klinických laboratoří, Klatovská nemocnice
a.s., Plzeňská 569, 339 38 Klatovy, ^b Oddělení klinické
farmakologie, LF UK a FN Plzeň, Plzeň, ^c Ústav
sociálního lékařství, LF UK Plzeň
pikner@nemkt.cz

Došlo 6.2.08, přijato 6.5.08.

Klíčová slova: anti-CCP, revmatoidní artritida, referenční
meze, diagnostická senzitivita, diagnostická specifita

Úvod

Revmatoidní artritida je časté systémové autoimunitní onemocnění s frekvencí v populaci 1,0–2,0 %. Jde o chronický zánět kloubní výstelky (synovie), který vede k progresivní destrukci kloubů, a tím ke snížení lokální hybnosti a kvality života jedince. Při tomto procesu se do séra uvolňuje cyklický peptid s vysokým obsahem argininových zbytků, které jsou následně pomocí enzymu peptidylargininndeaminasy (PAD) přeměněny na citrulin. Následně vznikají protilátky specifické proti epitopům obsahující tento citrulin, a proto mluvíme o protilátkách proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP)¹. Druhá generace testů měřících specificky anti-CCP2 se jeví jako slibný marker revmatoidní artritidy s diagnostickou senzitivou průměrně 68 % a diagnostickou specifitou 95 %. Na rozdíl od běžně užívaného revmatoidního faktoru poskytuje výsledky s vyšší diagnostickou specifitou při stejné či vyšší diagnostické senzitivě (vysvětlení viz metodologie – statistická analýza)². Přítomnost anti-CCP protilátek je také prognostickým markerem vzniku revmatoidní artritidy³, či jako predikátor více agresivního průběhu choroby⁴.

Autoři představují analytické vlastnosti a klinické zhodnocení nové automatizované metody na stanovení anti-CCP protilátek, která provádí měření po jednotlivých patientských vzorcích a umožňuje získat výsledek za 20 až 30 minut.

Metodika

Opakovatelnost stanovení

Opakovatelnost stanovení metody vyjadřuje míru variability testovaných vzorků. Byl testován pozitivní kontrolní vzorek dodaný výrobcem a pozitivní pacient, výsledné hodnoty variability byly vyjádřeny jako průměrné hodnoty, SD a CV%. Míra variability byla testována v rámci jedné výrobní šarže po dobu 5 dnů, každý den byla provedena dvě stanovení anti-CCP s prodlevou 2 hodin mezi stanoveními, a to u pozitivní kontroly ze soupravy a pozitivního vzorku pacienta (celkem 20 stanovení jednoho vzorku). Stanovení byla prováděna vždy v duplikátu. Každý den se vždy používala čerstvá kontrola a samostatně rozmražený alikvot vzorku pozitivního pacienta.

Mez detekce

Mez detekce byla vypočtena jako koncentrace z průměrné hodnoty slepého pokusu + 2 směrodatné odchylky (SD). Stanovení byla opakována 10× pro standard A (0 U ml⁻¹) a 2× pro standard B (5 U ml⁻¹). Tato procedura byla provedena celkem 4× a u každé série byla následně vyhodnocena mez detekce (průměr + 2SD) a CV%. Výsledné hodnoty meze detekce jsou dány průměrem těchto čtyř měření.

Kontrolní soubor (kontroly)

K určení referenční meze anti-CCP protilátek byly použity vzorky sér od 105 dárců krve (51 žen a 54 mužů), kteří měli negativní rodinnou i osobní anamnézu revmatoidního onemocnění či jiného autoimunitního onemocnění (systémový lupus erytematodes tyreoiditida, coeliakie, diabetes mellitus I. typu). U této skupiny byl testován vliv pohlaví a věku na hodnoty anti-CCP.

Soubor pacientů

Ve srovnání se skupinou zdravých jedinců jsme provedli zhodnocení pacientů s již prokázanou revmatoidní artritidou, kteří splňovali diagnostická kritéria dle American College of Rheumatology⁵ (skupina označená jako „RA“ – celkem 95 vzorků sér), u těchto vzorků jsme vyhodnotili diagnostickou senzitivitu a specifitu pomocí operační charakteristiky modelu (Receiver Operating Characteristics plot – ROC křivka). Dále jsme vyšetřili sérové vzorky skupiny nemocných se systémovými onemocněními pojiva či kloubů (skupina „NONRA“, která zahrnovala pacienty s diagnózami: systémový lupus erytematodes, spondylartritidy, lumbalgie, M. Bechtěrev, osteoartróza, postinfekční artritidy apod. – celkem 71 sérových vzorků). Procentuální zastoupení jednotlivých chorob je sumarizováno v tab. I. Mezi soubory jsme analyzovali rozdíly distribucí hodnot anti-CCP.

Tabulka I

Procentuelní zastoupení diagnóz ve skupině pacientů NONRA^a

Klinická diagnóza	Počet	Výskyt [%]
Systémový lupus erythematoses	11	15,4
Časově omezená artritida	3	4,2
Spondylartritida	14	19,7
Chronické artralgie	7	9,9
Reaktivní artritida	4	5,6
Polymyalgia reumatica	2	2,8
Osteoartróza	12	16,9
Dnavá artritida	2	2,8
Lumbalgie	3	4,2
Ostatní	13	18,4

^a NONRA – pacienti s diagnózou systémového onemocnění pojiva či kloubů, při těchto onemocněních se mohou vyskytnout i protilátky proti CCP (anti-CCP)

Klinická senzitivita metody je definována jako % správně pozitivních nálezů ze skupiny pacientů s ověřenou diagnózou revmatoidní artritidy. Specifita je naopak % správně negativních výsledků ze skupiny kontroly. Referenční mez (cut off) byla definována jako hodnota 95. a 99. kvantilu hodnot anti-CCP ve skupině kontroly.

Metodika stanovení

Vzorky séra byly získány centrifugací při 10 000 g po dobu 10 min a zamraženy při 20 °C do doby analýzy, a to ne déle než 6 měsíců od odběru krve.

Hodnoty anti-CCP2 byly stanoveny na analyzátoru AxSYM v souladu s instrukcemi přístroje, výrobce metody ABBOTT Laboratories, USA, která byla vyvinuta v kooperaci s Axis-Shield Diagnostics. Metoda AxSYM[®] Xtra Anti-CCP je nekompetitivní enzymová imunoanalýza na mikročásticích (Microparticle Enzyme Immunoassay: MEIA) ke kvantitativnímu stanovení protilátek IgG třídy specifických k cyklickému citrulinovanému peptidu (CCP) v lidském séru a plazmě. Výše signálu je přímo úměrná koncentraci anti-CCP protilátek přítomných v séru či plazmě. První nenulový kalibrátor (kalibrátor B) má hodnotu 5 U ml⁻¹, což je také doporučená referenční mez výrobcem.

Statistická analýza

Byla provedena s užitím software CRAN 2.4.0 a Statistica 98 Edition.

Pro měření parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, roz-

ptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum a vybrané kvantily. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot diagramů a diagramu rozptylu hodnot. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto proměnných, byl použit neparametrický Mediánový test a to dvouvýběrová varianta. Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků, vzhledem k negaussovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Pomocí určení diagnostických specifit a diagnostických senzitivit dané metody jsme stanovovali rozhodovací meze (cut off) mezi skupinami a podskupinami pro danou metodu a tyto výsledky byly graficky zpracovány v operační charakteristice modelu (ROC křivka), která popisuje diskriminační schopnost testu, vztah mezi diagnostickou senzitivitou a nespecifitou.

Plocha pod křivkou (Area under the curve – AUC) vztahená k maximu, tj. 1,000, udává míru diagnostické kvality testu.

Diagnostická senzitivita je definována jako % správně pozitivních výsledků ze všech výsledků skupiny pacientů majících hledanou chorobu (RA).

Diagnostická specifita je definována jako % správně negativních výsledků ze všech výsledků skupiny pacientů nemajících chorobu (kontroly)⁶.

Výsledky

Opakovatelnost stanovení v rámci jedné výrobní šarže

V následující tabulce II jsou sumarizovány výsledky testování opakovatelnosti stanovení dle protokolu popsáném v metodice.

Jak kontrola dodaná výrobcem, tak pozitivní pacientský vzorek vykazují velmi dobrou „day-to-day“ opakovatelnost, a to s průměrným CV 5,0 % (pozitivní kontrolní vzorek výrobce) a 5,3 % (pozitivní vzorek pacienta).

Tabulka II

Opakovatelnost stanovení v rámci jedné výrobní šarže

	Opakovatelnost měření		
	počet měření	pozitivní kontrola soupravy ^a [U ml ⁻¹]	pozitivní pacient ^b [U ml ⁻¹]
Průměr	20	23,5	68,4
SD	1,3	1,3	3,4
CV %	5,3	5,3	5,0

^a Pozitivní kontrola soupravy dodaná výrobcem – umělá matrice vzorku, ^b pozitivní pacient – přirozená matrice (sérum)

Mez detekce

Mez detekce byla stanovena podle protokolu uvedeného v metodice. Tabulka III sumarizuje výsledky čtyř nezávislých měření. Zjištěná průměrná mez detekce činí $0,84 \text{ U ml}^{-1}$.

Stanovení referenčních mezí

Ke stanovení referenčních mezí pro zdravou populaci bylo užito 105 vzorků od dárců krve (kontroly) z Transfúzního oddělení Klatovské nemocnice a.s., kteří měli negativní rodinnou i osobní anamnézu ve smyslu revmatoidní artritidy, systémových autoimunitních onemocnění (systémový lupus erytematoses, tyreoiditida, coeliakie, diabetes mellitus I. typu). Základní statistický popis je sumarizován v tab. IV.

Ve vyšetřeném souboru jsme nenalezli rozdíl v hodnotách anti-CCP protilátek dle pohlaví (neparametrický ANOVA test) ani dle věku (Spearman rank correlation).

Rozhodovací mez má při 95% kvantilu hodnotu $2,0 \text{ U ml}^{-1}$ a při 99% kvantilu hodnotu $3,4 \text{ U ml}^{-1}$ (obr. 1).

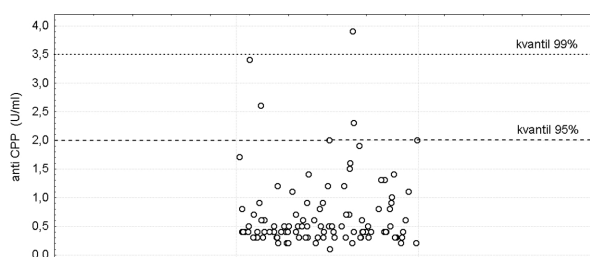
Soubor pacientů

Základní statistický popis všech porovnávaných skupin (RA – revmatoidní artritida, NONRA – smíšená onemocnění pojiva, artritidy, lumbalgie atd. a Kontroly – skupina zdravých dárců krve, viz výše) je shrnuta v tab. V.

Tabulka III
Mez detekce

	Průměrný signál	SD	%CV	Mez detekce [U ml^{-1}]
<i>Měření 1</i>				
Kalibrátor A	14,94	4,21	28,2	1,04
Kalibrátor B	55,4	0,13	0,2	1,04
<i>Měření 2</i>				
Kalibrátor A	12,43	3,81	30,6	0,92
Kalibrátor B	53,6	2,35	4,4	0,92
<i>Měření 3</i>				
Kalibrátor A	14,24	2,99	21,0	0,75
Kalibrátor B	54,15	0,45	0,8	0,75
<i>Měření 4</i>				
Kalibrátor A	14,5	2,85	19,6	0,66
Kalibrátor B	55,77	6,7	11,6	0,66

Pozn.: Tabulka III udává variabilitu stanovení prvních dvou kalibrátorů a odečtenou mez detekce z kalibrační křivky



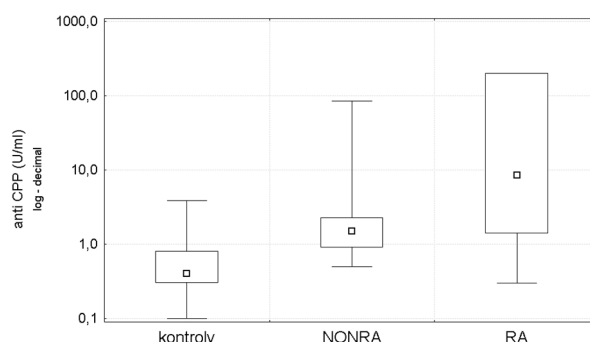
Obr. 1. Diagram rozptylu distribuce hodnot anti-CCP u skupiny kontroly; jsou vymezeny 95. a 99. kvantily hodnot

Nejvyšších výsledků anti-CCP dosahuje skupina RA. Mezi všemi skupinami existují statisticky významné rozdíly v distribucích hodnot anti-CCP protilátek s $P < 0,0001$ (mediánový neparametrický test), (viz obr. 2) v logaritmicke rozložení osy Y.

Ke zhodnocení klinické výpovědní hodnoty testu byla provedena analýza pomocí ROC křivky. Jako kontrolní skupina byla užita skupina dárců krve (kontroly). Na ose X je vynesena diagnostická nespecifita (1-Specifita) a na ose Y se nalézají příslušné hodnoty diagnostické senzitivity (obr. 3).

Hodnota AUC odečtená z ROC křivky pro anti-CCP je 0,926, což svědčí o velmi dobré klinické výpovědní hodnotě. Z naší sestavy mělo 8 pacientů diagnózu časné revmatoidní artritidy (tj. do 3 let trvání příznaků), ale pouze 2 z nich měli hodnotu vyšší než $2,0 \text{ U ml}^{-1}$, ale nepřekročili hodnotu $3,4 \text{ U ml}^{-1}$ (99. percentil referenční skupiny).

V tabulce VI jsou shrnuty rozhodovací meze a senzitivity při různé hladině specifity mezi skupinou pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a kontrolní (kontroly).



Obr. 2. Krabicové diagramy distribucí anti-CCP hodnot dle sledovaných skupin; logaritmicke znárodněné box ploty mediánu, 25. a 75. kvantilu a minimální a maximální naměřené hodnoty v jednotlivých skupinách. Rozdíly mezi skupinami jsou statisticky významné s $P < 0,0001$ (neparametrický mediánový test); \lceil max min, \square 75 % 25 %, \square median

Tabulka IV
Základní statistický popis skupiny kontroly dle pohlaví

		Počet	Průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
Muži	anti-CCP, U ml ⁻¹	54	0,64	0,52	0,5	0,2	2,6
Muži	věk, roky	54	41,4	11,5	42,5	24	62
Ženy	anti-CCP, U ml ⁻¹	51	0,74	0,74	0,4	0,1	3,9
Ženy	věk, roky	51	40,9	11,5	41	19	64

Tabulka V
Statistický popis sledovaných skupin pacientů

Skupina pacientů	Anti-CCP [U ml ⁻¹]					
	počet	průměr	SD	medián	minimum	maximum
RA	95	66,67	85,2	8,6	0,3	200,0
NONRA	71	3,75	11,2	0,5	1,5	84,8
Kontroly	105	0,69	0,64	0,4	0,1	3,9

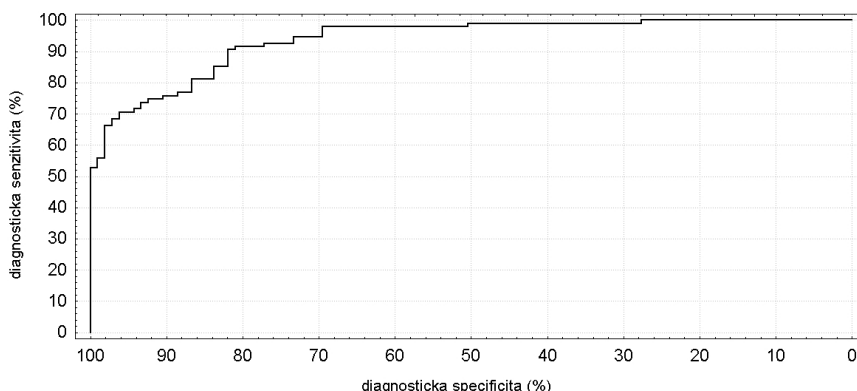
Pozn.: Průměrné hodnoty, medián, SD, %CV, minimální a maximální hodnoty anti-CCP zjištěné v jednotlivých skupinách sledovaných pacientů RA (revmatoidní artritida), NONRA (systémové onemocnění pojiva či kloubů) a kontrolní skupině (kontroly)

Při nejnižší rozhodovací mezi jsme dosáhli uspokojivé diagnostické senzitivity 71 % při diagnostické specifitě 95 %. Při hodnotě referenční meze 5,0 U ml⁻¹ doporučené výrobcem je dosaženo významně nižší diagnostické senzitivity 53 %, ale 100% diagnostické specifity.

Tabulka VII naopak ukazuje procento pozitivních výsledků nad rozhodovací mez ve skupině se systémovými onemocněními pojiva a kloubů (NONRA). Při nejnižší rozhodovací mezi je tato pozitivita 34 %, při rozhodovací mezi 5,0 U ml⁻¹ 4,2 % (pouze 3 pacienti). Jednalo se o pacienty s diagnózami systémová vaskulitida (anti-CCP = 40,9 U ml⁻¹),

spondylartritida (anti-CCP = 24,4 U ml⁻¹) a osteoartróza (anti-CCP = 84,8 U ml⁻¹). U posledně jmenované diagnózy s hodnotou anti-CCP 84,8 U ml⁻¹ došlo k následnému překlasifikování diagnózy a to na revmatoidní artritidu a také k úpravě léčby, tím pak klesá procento falešné pozitivivity na 2,9 %.

Podrobněji jsme proto analyzovali pacienty s hodnotami anti-CCP protilátek v rozmezí 2,0–4,9 U ml⁻¹. Ve skupině se vyskytlo 21 pacientů ze skupiny NONRA, 17 ze skupiny RA a 6 z kontrolní skupiny, tj. výsledky v tomto rozmezí zahrnují zhruba v 50 % pacienty bez rev-



Obr. 3. Operační charakteristika (křivka ROC) zjištěná metodou AxSYM® Xtra Anti-CCP pro skupinu pacientů s revmatoidní artritidou

Tabulka VI

Diagnostická senzitivita metody anti-CCP u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) při různé diagnostické specifitě

Diagnostická specifita [%]	Rozhodovací mez ^a [U ml ⁻¹]	Diagnostická senzitivita [%]
95	2,0	70,5
99	3,4	55,8
100	5,0	52,6

^a Hodnota rozhodovací meze byla určena na hladinách 95., 99. a 100. kvantilu skupiny Kontroly

Tabulka VII

Procentuelní (falešná) pozitivita u skupiny NONRA při různých hodnotách specifity a tomu odpovídajících rozhodovacích mezích. Referenční skupinu tvoří dobrovolní dárce krve (Kontroly)

Diagnostická specifita [%]	Rozhodovací mez [U ml ⁻¹]	% pozitivních hodnot nad rozhodovací mez
95	2,0	33,8
99	3,4	14,1
100	5,0	4,2

matoidní artritidy, 40 % tvoří pacienti s revmatoidní artritidou a zbývajících 10 % zdravé osoby. Hodnotu nad 5,0 neměli žádní dobrovolníci z kontrolní skupiny a pouze 3 pacienti ze skupiny NONRA.

Pokud tedy zvolíme rozhodovací mez na úrovni 5,0 U ml⁻¹, tj. doporučenou výrobcem a odpovídající hodnotě prvního nenulového kalibrátoru, klesá diagnostická senzitivita pro skupinu RA na 53 % při 100% diagnostické specifitě vůči zdravým, ale při 97% diagnostické specifitě vůči skupině NONRA.

Diskuse

Metoda vykazuje a splňuje požadavky jak na dobrou opakovatelnost, tak na dostatečnou mez detekce. Mez detekce je sice nezbytným sledovaným znakem, ale v tomto případě nemá žádný zásadní klinicko-diagnostický význam, rozhodovací meze pro klinickou interpretaci jsou pět až sedmkrát vyšší.

Zjištěné diagnostické sensitivity a specifity jsou odpovídající nálezům některých autorů. Autoři Fernández a spol.⁷ dosáhli diagnostické sensitivity na úrovni 52,8 % při diagnostické specifitě 100 % na ELISA soupravě Axis-Shield Diagnostics, Ltd, UK. Jednalo se však o paci-

enty s časnou revmatoidní artritidou, referenční mez byla 7,2 U ml⁻¹. V celé řadě dalších publikací jsou uváděny diagnostické sensitivity v rozmezí 39–94 %, medián 68,5 % při diagnostické specifitě udávané v rozmezí 81 až 100 %, medián 97 % (cit.²). Rozhodujícím faktem, který toto ovlivňuje, je tedy volba referenční meze, či hladiny diagnostické specifity. Lze však říci, že metoda AxSYM[®] Xtra Anti-CCP poskytuje srovnatelné výsledky diagnostické sensitivity, tak specifity s ostatními detekčními systémy⁷, při 95% diagnostické specifitě dosahuje diagnostická senzitivita hodnoty 70,5 %.

Významným faktem je však vysoká diagnostická specifita testu jak vzhledem k souboru kontroly, tak i vůči souboru RA – pacientům se systémovými onemocněními pojiva či polyartritidami, což je rovněž v souladu s již publikovanými pracemi^{2,7-9}. Falešná pozitivita ve skupině NONRA vedla v jednom případě k překlasifikování choroby na revmatoidní artritidu a nejednalo se tedy o falešnou pozitivitu, zbývajících 2 případy však odpovídají publikovaným pracím ostatních autorů, kdy se nalézá minimální četnost pozitivních výsledků u ostatních chorob pojiva jako jsou vaskulitidy, systémový lupus erytematoses, polyartriditidy^{2,8,9}.

Určení hladiny diagnostické specifity a té odpovídající referenční meze je rozhodujícím faktorem ovlivňujícím diagnostickou senzitivitu. Pokud porovnáme výsledky různých metod o stejné diagnostické specifitě a kontrolní skupině, získáme prakticky shodné výsledky. U metody anti-CCP je zřejmé, že při 95% diagnostické specifitě budeme mít dobrou diagnostickou senzitivitu cca 70 %, ale stále 30 % pacientů bude mít negativní výsledek anti-CCP i přes jasné klinické známky revmatoidní artritidy. Důvod této negativity není jasný. Některé práce naznačují, že kloubní infiltráty se liší v zastoupení lymfocytů a typu autoimunitní odpovědi v infiltrátu¹⁰ a také je popsána větší aktivita onemocnění u anti-CCP pozitivních pacientů¹¹ či větší tendence k progresi¹².

Závěr

Metoda AxSYM[®] Xtra Anti-CCP splňuje běžné analytické parametry a poskytuje automatizované stanovení anti-CCP protilátek po jednotlivých vzorcích.

Má vysokou diagnostickou specifitu a senzitivitu, která se neliší od literárních údajů jiných výrobců.

Na základě námi zjištěných výsledků navrhuje použít jako základní rozhodovací mez pro metodu AxSYM[®] Xtra Anti-CCP hodnotu 5,0 U ml⁻¹, čímž máme zaručenou vysokou diagnostickou specifitu (100 % kontrolní skupina a 97 % ostatní onemocnění pojiva a kloubů) a diagnostickou senzitivitu 53 %. Na druhé straně hodnoty AxSYM[®] Xtra Anti-CCP mezi 2,0–5,0 představují zhruba 40% riziko přítomnosti revmatoidní artritidy a představují určitou šedou zónu, kdy je vhodné výsledek opakovat s časovým odstupem několika týdnů.

Použité zkratky

Anti-CCP	protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu
%CV	variační koeficient v %
Kontroly	skupina zdravých dobrovolníků – dárce krve
NONRA	skupina pacientů systémovými onemocněními pojiva či kloubů
RA	skupina pacientů s potvrzenou diagnózou revmatoidní artritidy
SD	směrodatná odchylka

Práce vznikla za podpory firmy Abbott Laboratories, která poskytla diagnostické soupravy k testování vzorků.

LITERATURA

- Schellekens G. A., de Jong B. A., van den Hoogen F. H., van de Putte L. B., van Venrooij W. J.: *J. Clin. Invest.* 101, 273 (1998).
- Avouac J., Gossec L., Dougados M.: *Ann. Rheum. Dis.* 65, 845 (2006).
- van Gaalen F. A., Linn-Rasker S. P., van Venrooij W. J., de Jong B. A., Breedveld F. C., Verweij C. L.: *Arthritis & Rheumatism* 50, 709 (2004).
- Kastbom A., Strandberg G., Lindroos A., Skogh T.: *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085 (2004).
- Arnett F. C., Edworthy S. M., Bloch D. A., McShane D. J., Fries J. F., Cooper N. S., Healey L. A., Kaplan S. R., Liang M. H., Luthra H. S.: *Arthritis Rheum.* 31, 315 (1988).
- Racek J.: *Klinická biochemie*, kap. 4. Galén, Praha 2006.
- Fernandez-Suarez A., Reneses S., Wichmann I., Criado R., Núñez A.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 1234 (2005).
- Schur P. H.: *Int. J. Adv. Rheumatol.* 3, 77 (2005).
- Lee D. M., Schul P. H.: *Ann. Rheum. Dis.* 62, 70 (2003).
- van Oosterhout M., Bajema I., Levarht E. W., Toes R. E., Huizinga T. W., van Laar J. M.: *Arthritis Rheum.* 58, 53 (2007).
- del Val del Amo N., Ibanez Bosch R., Fito Manteca C., Gutierrez Polo R., Loza Cortina E.: *Clin. Exp. Rheumatol.* 24, 281 (2006).
- Meyer O., Nicaise-Roland P., Santos M. D., Labarre C., Dougados M., Goupille P., Cantagrel A., Sibilia J., Combe B.: *Arthritis Res. Ther.* 8, 1186 (2006).

R. Pikner^a, D. Suchý^b, J. Zítková^a, H. Brabcová^b, M. Beranová^a, and S. Kormunda^c (^aDepartment of Clinical Laboratories, Hospital, Klatovy, ^bDepartment of Clinical Pharmacology, University Hospital, Plzeň, ^cDepartment of Social Medicine, Faculty of Medicine, Charles University, Plzeň): **Automated Determination of Citrullinated Cyclic Peptide Antibodies on AxSYM Analyser**

The aim of the study was to verify reproducibility, limit of detection, reference limits and diagnostic value of a new antiCCP2 method – AxSYM[®] Xtra Anti-CCP as a marker of rheumatoid arthritis. Reference limits were verified on a group of 105 volunteers. Diagnostic performance was assessed in a group of 95 patients with rheumatoid arthritis and 75 patients with systemic connective tissue diseases or polyarthritis. The AxSYM[®] Xtra Anti-CCP assay achieved the day-to-day reproducibility 5.0–5.3 %, the detection limit was 0.8 U ml⁻¹. The assay reached 71 % and 53 % diagnostic sensitivity at 95 % and 100 % diagnostic specificity with cut-off 2.0 U/ml and 5.0 U ml⁻¹, respectively. We found also 4.2 % of positive values in systemic connective tissue diseases above the cut-off 5.0 U ml⁻¹. The AxSYM[®] Xtra Anti-CCP assay provides automated random access measurement of anti-CCP antibodies with good analytical performance and diagnostic sensitivity and specificity comparable with other methods.