

REF708290, 708296, 708298, 708299
508290.10, 508296.20, 508298.20, 508299.10
508290, 508296, 508298, 508299**Rx Only**

Application

Un système de test par immunofluorescence indirecte utilisant des lames de substrat de neutrophile humain fixé à l'éthanol pour la détection des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) dans du sérum humain. La détection d'ANCA peut être utilisée conjointement à d'autres résultats laboratoires et cliniques pour faciliter le diagnostic de diverses vascularites systémiques.

Informations concernant le test

Les tests de détection des anticorps anti-neutrophile cytoplasmique (ANCA) ont révolutionné les domaines du diagnostic et du traitement de diverses vasculitides auto-immunes médiatisées.¹⁻⁴ Les anticorps anti-périnucléaires ou pANCA et anti-cytoplasmiques ou cANCA se sont avérés utiles pour la détection de maladies telles que la granulomatose de Wegener et la glomérulonéphrite maligne.

Au moins six antigènes ANCA ont été identifiés et bon nombre n'ont pas encore été identifiés.^{1,5} La plupart de ces antigènes semblent être des enzymes qui résident dans les granules primaires neutrophiles. Ces enzymes comprennent la myéloperoxydase (MPO), la sérine protéase 3 (PR3), l'élastase, la lactoferrine, la cathepsine G et la protéine cationique 57 (CAP-57). Des tests ELISA ont été développés pour la détection de plusieurs des anticorps anti-neutrophile importants toutefois la plupart des experts dans le domaine de la vasculite auto-immune recommandent toujours la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFA) pour le dépistage initial.

Deux motifs ANCA peuvent être détectés en utilisant la procédure ANCA IFA standard. Le motif classique ANCA ressemble à une fluorescence granulaire et cytoplasmique. Ce motif, indicatif de la granulomatose de Wegener et dans une moindre mesure de la périartérite noueuse microscopique, a été appelée cANCA.⁶ Un deuxième motif ANCA a également été décrit^{7,8} et colore la zone périnucléaire de neutrophiles fixés par l'alcool. Ce motif a été appelé pANCA. Le motif pANCA a été associé à une vasculite plus limitée d'organes, en particulier, la glomérulonéphrite maligne ou rapidement progressive.⁹ La corrélation entre cANCA et la granulomatose de Wegener est bien établie.^{3,10} La granulomatose de Wegener est caractérisée par un processus inflammatoire nécrosant avec formation de granulome et de vasculite qui implique surtout les voies respiratoires supérieures et inférieures et les reins. Cette triade d'implication clinique est considérée comme étant la caractéristique de la granulomatose de Wegener.

Le cANCA est présent chez une proportion pouvant atteindre 96 % des patients atteints de granulomatose de Wegener où la maladie est généralisée et active, mais baisse à 65 % dans les cas où la maladie est active et limitée et est présent chez 30 à 40 % des patients en rémission. Le titre de cANCA suivra également l'évolution de la maladie avec des titres réduits dans les cas de rémission et des titres en croissance dans les cas de rechutes.^{4,12}

Contrairement au cANCA et son association à la maladie principalement systémique de la granulomatose de Wegener, pANCA a souvent été associé à la glomérulonéphrite nécrosante. Le pANCA est rarement présent dans les cas de syndromes systémiques. L'antigène cible le plus commun associé au pANCA est la myéloperoxydase, mais une réactivité à l'élastase et la lactoferrine est également détectée. Près de 90 % des sérums pANCA positifs de patients atteints de glomérulonéphrite ont une réaction à la myéloperoxydase ; toutefois, chez les patients atteints de maladies autres que la glomérulonéphrite et ayant également un pANCA, un pourcentage moins élevé réagit au myéloperoxydase.^{11,13} Ceci indiquerait que plusieurs antigènes peuvent être détectés comme apportant une coloration périnucléaire aux neutrophiles fixés par l'éthanol, y compris les sérums qui contiennent des anticorps antinucléaires. On peut confirmer les motifs périnucléaires détectés avec des neutrophiles fixés à l'éthanol comme pANCA en effectuant l'IFA sur des neutrophiles fixés au formol. L'antigène cible principal du pANCA, la myéloperoxydase, reste dans le cytoplasme des cellules fixées au formol alors que dans les cellules fixées à l'éthanol, l'antigène migre vers le noyau créant ainsi le motif périnucléaire.

Principe du test

Dans la technique par immunofluorescence indirecte, les échantillons sont incubés avec l'antigène fixé sur la lame et les anticorps non liés sont éliminés au lavage. Le substrat est incubé avec un conjugué fluorescéine spécifique et le réactif non lié est ensuite éliminé au lavage. Lorsqu'ils sont vus à l'aide d'un microscope fluorescent, les échantillons ayant une réaction positive aux autoanticorps afficheront une fluorescence vert pomme qui correspond aux zones de la cellule ou des noyaux où l'autoanticorps s'est lié.

Contenu du coffret

1. ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slides ; 6 ou 12 puits/lame, avec dessiccateur

Les coffrets contiennent

1. FITC IgG Conjugate (chèvre), fluorescéine marquée dans du tampon contenant du bleu Evans et 0,09 % d'azide de sodium
2. cANCA Positive, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué contenant des auto-anticorps anti-cANCA, prédilués

3. pANCA Positive, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué contenant des auto-anticorps anti-pANCA, prédilués
4. IFA System Negative Control, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué ne contenant aucun auto-anticorps anti-ANCA
5. PBS II Concentrate (40x)
6. Mounting Medium, 0,09 % d'azide de sodium
7. Coverslips

Avertissements

1. Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.¹⁴
2. L'azide de sodium (NaN_3) est utilisé comme conservateur. NaN_3 est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Eviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.
3. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.
4. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce test est destiné à un usage diagnostique in vitro.
2. Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.
3. Un lavage incomplet ou insuffisant du liquide dans les puits des lames entraînent des imprécisions et un bruit de fond élevé.
4. L'adaptation totale ou partielle de ce test aux automates de traitement d'échantillons ou de distribution de réactifs pourrait fournir des résultats différents de ceux obtenus par une méthode manuelle. Chaque laboratoire a la responsabilité de valider les limites raisonnables dans lesquels les résultats seront acceptés.
5. La variation des facteurs suivants influence la performance du test : la température des réactifs au démarrage du test, la puissance de la lampe du microscope, la précision et la reproductibilité du pipetage, le degré du lavage et la durée de l'incubation. Une grande attention est requise pour obtenir des résultats précis et reproductibles.
6. Au cours du temps, le conjugué anti-IgG humain pourrait changer de couleur à cause de son exposition à la lumière. Toutefois, ce changement de couleur n'affecte pas la performance du test.
7. Il est recommandé de suivre strictement le protocole. Chaque modification est au risque de l'utilisateur.

Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. La solution de tampon diluée reste stable quatre semaines à 2-8°C.

Echantillons

Ce test doit être réalisé avec du sérum comme échantillon. L'addition d'azide ou d'autres conservateurs aux échantillons peut affecter le bon déroulement de la procédure. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter. Après prélèvement, le sérum doit être séparé du culot. Le document H18-A3 du CLSI (autrefois NCCLS) recommande les conditions suivantes de conservation: 1) Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. 2) Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. 3) Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Bien agiter les échantillons décongelés.

Procédure

Matériel fourni (coffret)

708290

- | | |
|----|--|
| 10 | 6-puit ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide |
| 1 | 4 ml FITC IgG Conjugate |
| 1 | 0,5 ml cANCA Positive |
| 1 | 0,5 ml pANCA Positive |
| 1 | 0,5 ml IFA System Negative Control |
| 1 | 25 ml PBS II Concentrate (40x) |
| 1 | 7 ml Mounting Medium |
| 1 | 10 Coverslips |

708296

- 20 12-puit ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide
- 1 15 ml FITC IgG Conjugate
- 1 0,5 ml cANCA Positive
- 1 0,5 ml pANCA Positive
- 1 0,5 ml IFA System Negative Control
- 2 25 ml PBS II Concentrate (40x)
- 1 7 ml Mounting Medium
- 1 20 Coverslips

708298

- 20 12-puit ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide
- 1 15 ml FITC IgG Conjugate
- 1 0,5 ml cANCA Positive
- 1 0,5 ml pANCA Positive
- 1 0,5 ml IFA System Negative Control
- 2 25 ml PBS II Concentrate (40x)
- 1 7 ml Mounting Medium
- 1 10 Coverslips

708299

- 10 6-puit ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide
- 1 4 ml FITC IgG Conjugate
- 1 0,5 ml cANCA Positive
- 1 0,5 ml pANCA Positive
- 1 0,5 ml IFA System Negative Control
- 1 25 ml PBS II Concentrate (40x)
- 1 7 ml Mounting Medium
- 1 10 Coverslips

Matériel fourni (Lames seules)

- 508290.10** 10 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (6 puits)
- 508296.20** 20 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (12 puits)
- 508298.20** 20 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (12 puits)
- 508299.10** 10 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (6 puits)
- 508290** 1 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (6 puits)
- 508296** 1 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (12 puits)
- 508298** 1 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (12 puits)
- 508299** 1 x ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (6 puits)

Autre matériel nécessaire non fourni

- Micropipettes pouvant distribuer un volume de 15 à 1000 µl
- Eau distillée ou déionisée
- Pisettes ou pipettes Pasteur
- Chambre humide
- Récipient de 1 l (pour diluer le PBS II)
- Bocal Coplin
- Microscope à fluorescence avec excitatrice de 495 nm et filtre interférentiel de 515 nm

Matériel supplémentaire disponible séparément

- ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (6 puits), Numéro de catalogue Inova 508295
- ANCA (Ethanol Fixed Human Neutrophil) Slide (12 puits), Numéro de catalogue Inova 508297

Méthode

Préparation du test

- 1. Amener tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
- 2. **Diluer le concentré PBS II :** IMPORTANT : diluer le concentré PBS II 1:40 en ajoutant le contenu de la bouteille de concentré PBS II à 975 ml d’eau distillée ou déionisée et bien mélanger. Le tampon PBS II est utilisé pour diluer les échantillons des patients et comme tampon de lavage. Le tampon dilué peut être conservé jusqu’à 4 semaines à une température comprise entre 2 et 8° C.
- 3. **Diluer les échantillons des patients :**
 - a. Dépistage initial : diluer les échantillons des patients 1:20 avec la solution tampon PBS II diluée (c’est-à-dire, ajouter 50 µl de sérum à 950 µl de solution tampon PBS II).
 - b. Titrage : diluer en série en double à partir de la dilution de dépistage initiale pour tous les échantillons positifs en utilisant la solution tampon PBS II (c’est-à-dire 1:40, 1:80, ... 1:1280).

Exécution du test

1. **Préparation de la lame substrat** : laisser la lame atteindre la température ambiante avant de la retirer de sa pochette. Étiqueter la lame à l'aide d'un crayon et la placer dans une chambre humide adéquate. Ajouter une goutte (20 à 25 µl) du Contrôle positif non dilué et du Contrôle négatif respectivement sur les puits 1 et 2. Ajouter une goutte (20 à 25 µl) de l'échantillon du patient sur les puits restants.
2. **Incubation de la lame substrat** : incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes dans une chambre humide (un essuie-tout humide placé à plat au fond d'un récipient de plastique ou de verre fermé permet de maintenir les conditions d'humidité appropriées). **Ne pas laisser le substrat se dessécher pendant la procédure d'analyse.**
3. **Lavage de la lame substrat** : après l'incubation, utiliser une pissette de plastique ou une pipette pour éliminer le sérum en rinçant délicatement avec la solution tampon PBS II diluée. Orienter la lame et le flot de solution tampon PBS II de façon à minimiser le débordement des échantillons entre les puits. **Ne pas diriger le flot directement dans les puits sous peine d'abîmer le substrat.** Si désiré, placez les lame dans une fiole de Coplin d'amortisseur dilué de PBS II pendant jusqu'à 5 minutes.
4. **Addition du conjugué fluorescent** : éliminer l'excès de la solution tampon PBS II en secouant la lame. Replacer la lame dans la chambre humide et recouvrir **immédiatement** chaque puits d'une goutte de conjugué fluorescent. Incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes.
5. **Lavage de la lame substrat** : répéter l'étape 3.
6. **Montage de la lame substrat** : les procédures pour le montage d'une lame à l'aide de lamelles couvre-objet varient d'un laboratoire à un autre ; toutefois, la procédure suivante est recommandée :
 - a. Placer une lamelle couvre-objet sur un essuie-tout.
 - b. Appliquer le milieu de montage en une ligne continue sur le bord inférieur de la lamelle couvre-objet.
 - c. Éliminer l'excès de la solution tampon PBS II et placer le bord inférieur de la lame contre le bord de la lamelle couvre-objet. Abaisser avec précaution la lame sur la lamelle couvre-objet de façon à ce que le milieu de montage coule vers le bord supérieur de la lame sans former de bulles d'air.

Contrôle de qualité

Le cANCA positif et le contrôle négatif du système IFA devraient être testés sur chaque lame afin d'être certain que tous les réactifs et toutes les procédures ont été exécutées de façon appropriée. Un contrôle supplémentaire adéquat peut être préparé en utilisant des portions aliquotées d'échantillon de sérum humain provenant d'un groupe de personnes et en les conservant à $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Pour que les résultats des tests soient valides, tous les critères cités ci-dessous doivent être remplis. Si certains critères ne sont pas remplis, les résultats du test devraient être considérés comme invalides et l'analyse doit être répétée.

1. Le cANCA positif d'extrémité doit être $\geq 3+$.
2. Le contrôle négatif du système IFA doit être négatif.

Interprétation des résultats

Réaction négative. Un échantillon est considéré négatif si une coloration nucléaire ou cytoplasmique spécifique est égale ou inférieure au contrôle négatif du système IFA. Les échantillons peuvent afficher différents degrés de coloration de fond en raison des anticorps hétérophiles ou du faible niveau d'autoanticorps aux composants cytoplasmiques tels que les protéines contractiles.

Réaction positive. Un échantillon est considéré positif si une coloration nucléaire ou cytoplasmique spécifique telle que décrite ci-dessous est observée et est plus forte que celle du contrôle négatif et que l'intensité de la coloration est de 1+ ou plus.

Déterminer le grade ou l'intensité de la fluorescence à l'aide des critères suivants :

- | | |
|----|---|
| 4+ | Fluorescence éclatante vert pomme |
| 3+ | Fluorescence vive vert pomme |
| 2+ | Fluorescence positive bien visible |
| 1+ | Fluorescence spécifique la plus basse possible qui permettra à la coloration nucléaire ou cytoplasmique d'être bien différenciée de la fluorescence de fond |

Interprétation de l'aspect. Différents marquages nucléaire ou cytoplasmique peuvent apparaître en fonction des types et quantités relatives d'autoanticorps présents dans l'échantillon. On peut voir les types d'image suivants :

cANCA ou coloration cytoplasmique : en général, ce motif présente une fluorescence cytoplasmique rugueuse et tachetée, souvent accompagnée d'une fluorescence accentuée dans les lobes nucléaires et autour de ceux-ci. En général, ce motif est produit par des anticorps réagissant avec l'enzyme granulaire primaire Sérine Protéase 3 (PR3).

pANCA ou coloration périnucléaire : en général, ce motif apparaît sous la forme d'une coloration homogène des lobes nucléaires, souvent avec une accentuation périnucléaire. Étant donné que certains anticorps antinucléaires (ANA) peuvent également réagir avec des noyaux de neutrophiles humains fixés à l'éthanol, il est recommandé de tester ces échantillons afin de détecter la présence d'ANA. En outre, ces échantillons peuvent être testés sur des neutrophiles humains fixés à la formaline au lieu de l'éthanol. La formaline, étant un fixateur de réticulation, détruit la plupart des antigènes nucléaires et fait passer le motif de coloration de l'état périnucléaire à l'état cytoplasmique si l'échantillon contient du pANCA. À ces fins, des lames fixées à la formaline sont vendues séparément.

Limites du test

- 1. Les échantillons inactivés par la chaleur, hémolysés, contaminés par voie microbienne ou partiellement défibrinés peuvent donner lieu à une haute coloration de fond et rendre l'interprétation difficile à établir. Il faut obtenir un nouvel échantillon et réeffectuer le test. L'ajout de 2 % de sérum d'albumine ou de bovin à la solution tampon PBS Il utilisé pour diluer les échantillons risque de réduire la coloration de fond des échantillons à problèmes.
- 2. Les échantillons ANA positifs peuvent réagir aux neutrophiles fixées à l'éthanol. Les spécimens ayant une réaction nucléaire positive devraient être testés pour déterminer la présence d'ANA et/ou testés sur des lames de neutrophiles fixées au formol.
- 3. Comme on sait que les neutrophiles humaines fixées à l'éthanol contiennent plusieurs antigènes granulaires primaires tels que l'élastase, la lactoferrine, le cathepsine G, la protéine cationique 57 et peut-être encore d'autres antigènes neutrophiles non-identifiés, les échantillons qui semblent être p ou cANCA positifs pourraient ne pas avoir une réaction positive aux anticorps anti-myéloperoxydase spécifique (MPO) ou anti-sérine protéase 3 (PR3).
- 4. En plus des ANA, certains autres autoanticorps réagissent également aux neutrophiles humaines fixées à l'éthanol. Ces anticorps comprennent l'anti-muscle lisse (actine) et certains alloanticorps tels que Mart ou NB1.¹⁵ Les anticorps anti-actine ou anti-muscle lisse réagissent avec le cytoplasme neutrophile, toutefois avec un motif homogène plutôt que tacheté gros grains, et avec un cANCA typique. Les alloanticorps apparaissent également sous forme d'un motif cytoplasmique, mais avec des taches beaucoup plus fines par rapport au cANCA et uniquement un faible pourcentage de cellules (souvent 40 % ou moins) seront fluorescentes.
- 5. De temps à autre on rencontrera des échantillons ayant plus d'un autoanticorps. Par exemple, c et p ANCA ou ANCA plus ANA.
- 6. Des anticorps qui réagissent à la neutrophile sont présents chez certains patients atteints d'une maladie intestinale inflammatoire ou de recto-colite hémorragique.¹⁶ Ces échantillons se présentent sous forme d'un motif pANCA sur des neutrophiles fixées à l'éthanol avec une coloration périnucléaire très accentuée. Habituellement ces échantillons semblent être négatifs ou ayant une fluorescence homogène, cytoplasmique faible sur des lames de neutrophiles fixées au formol.
- 7. Une manipulation inadéquate des lames lors de la procédure de coloration, surtout le fait de laisser les lames sécher entre les étapes, risque de donner un motif à l'aspect « délavé » et une forte coloration de fond.
- 8. L'utilisation de réactifs provenant d'autres kits d'anticorps fluorescents (surtout conjugué) risque d'avoir un effet adverse sur la sensibilité et la spécificité des lames de substrat de neutrophiles fixées à l'éthanol.
- 9. Une gamme de facteurs externes influencent la sensibilité du test y compris le type de microscope à fluorescence utilisé, la puissance et le nombre d'heures d'utilisation de l'ampoule, le grossissement utilisé, le système de filtration et l'observateur.
- 10. Si un filtre passe bande est utilisé au lieu d'un filtre interférentiel 515, on observera une coloration artéfactuelle accrue.
- 11. Utiliser uniquement un crayon pour étiqueter les lames. L'utilisation d'un instrument autre qu'un crayon risque de causer une coloration artéfactuelle.
- 12. Tous les bouchons Coplin utilisés pour laver les lames doivent être exempts de résidus de colorants. L'utilisation de bouchons de Coplin contenant des résidus de colorants risque de causer une coloration artéfactuelle.
- 13. Les résultats obtenus à l'aide de ce test devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autres tests sérologiques.
- 14. Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérums n'ont pas été établies.
- 15. Les lames vendues séparément sont classées comme « réactifs spécifiques d'analyte ». Les caractéristiques analytiques et de performances ne sont pas établies, sauf comme élément de la trousse NOVA Lite ANCA.

Performances

Cent quinze échantillons normaux choisis au hasard ont été testés sur des lames de NOVA Lite ANCA fixé à l'éthanol. Ces échantillons ont été soumis lors d'examens médicaux d'embauchage ou d'examens physiques des employés et ne proviennent probablement pas de personnes âgées ou d'enfants. Ces échantillons provenaient d'un groupe d'hommes et de femmes choisis au hasard. Les 115 échantillons étaient négatifs à la dilution 1:20 du dépistage.

45 patients atteints de la maladie de Wegener, 39 atteints de périartérite noueuse microscopique et 20 atteints de glomérulonéphrite maligne ainsi que des patients atteints de diverses maladies des tissus conjonctifs ont également été testés. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Groupe de patients	Nombre de patients	% Positifs
Normaux au hasard	115	0
Wegener	45	89 (tous cANCA)
Périartérite noueuse microscopique	39	100 (tous pANCA)
Glomérulonéphrite maligne	20	100 (tous pANCA)
SLE	27	7 (pANCA et cANCA)
Syndrome de Sjögren	21	0
Sclérodermie	15	0
Polymyosite	6	0

Les lames NOVA Lite ANCA ont été comparées en vis-à-vis aux présentations neutrophiles cytocentrifugées utilisés régulièrement dans un centre de référence ANCA universitaire. Cinquante-cinq sérums positifs (23 cANCA, 28 pANCA, 4 Atypiques) et 14 échantillons ANCA négatifs furent testés. Des 55 échantillons positifs, 54 ont produit un motif de coloration identique sur les lames NOVA Lite ANCA. Un échantillon cANCA à titre faible a produit un résultat négatif sur la lame Inova. Les 14 échantillons ANCA négatifs étaient également négatifs sur les lames NOVA Lite ANCA. Les titrages des 55 échantillons positifs ont produit le même résultat sur les deux substrats ou une différence de dilution double avec 53 échantillons étant testés. Les 2 autres échantillons étaient différents par 2 dilutions doubles.

Quarante-huit échantillons de sérum choisis au hasard ont été soumis à un des principaux laboratoires de référence américains pour la détection d'ANCA afin d'y être testés simultanément pour déterminer la présence d'ANCA en utilisant les lames NOVA Lite ANCA et également pour déterminer la présence d'anticorps spécifiques anti-MPO et anti-PR3 en utilisant les kits Inova QUANTA Lite ELISA. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Résultat IFA	No. Échantillons	% ELISA Positifs	
		MPO	PR3
Négatif	8	0	0
pANCA	13	84	0
cANCA	21	0	95
c et pANCA	5	80	0
Atypiques	1	0	0

Huit échantillons étaient ANCA négatifs par immunofluorescence. Les huit échantillons étaient négatifs lors de la détection du MPO et de la PR-3 par ELISA. Les résultats des MPO et PR-3 allaient de 1 à 5 unités, bien en dessous de la limite positive de 20 unités. Treize échantillons ont été déterminés comme étant pANCA positive par IFA. Onze de ces échantillons étaient MPO positifs et aucun n'était PR-3 positif. Vingt et un échantillons étaient cANCA positifs par immunofluorescence. Aucun de ces échantillons n'était MPO positif, alors que 20 des 21 échantillons étaient PR-3 positifs. Cinq échantillons semblaient avoir des motifs de type p et c ANCA par IFA. Quatre de ces échantillons étaient MPO positifs et aucun n'était PR3 positif. Un échantillon était considéré comme un pANCA atypique. Cet échantillon pANCA atypique était négatif dans les deux kits MPO et PR3.

Uniformité des résultats ANCA – ELISA c. IFA

Alors que MPO et PR3 sont les principaux antigènes formant ce que nous pouvons identifier comme p et c ANCA, l'utilisateur doit être conscient du fait que les anticorps de plusieurs autres enzymes granulaires primaires neutrophiles peuvent également produire des motifs c et p ANCA par immunofluorescence sur des neutrophiles fixées à l'éthanol. C'est surtout le cas pour les anticorps anti-pANCA où au moins 3 autres autoanticorps aux antigènes autres que le MPO peuvent produire un motif IFA de type pANCA. Pour illustrer ce point, des échantillons des groupes sus-mentionnés, Wegener, périartérite noueuse microscopique et glomérulonéphrite maligne, ainsi que 48 échantillons soumis à un test sérologique courant pour la détection de la vasculite furent regroupés. Les résultats de l'immunofluorescence de neutrophiles humaines fixées à l'éthanol et les résultats ELISA sont tous deux fournis ci-dessous.

		QUANTA Lite PR-3			
		+	-		
cANCA IFA	+	60	6	Sensibilité relative	90,9%
				Spécificité relative	98,8%
	-	1	85	Accord	95,4%
		QUANTA Lite MPO			
		+	-		
pANCA IFA	+	47	30	Sensibilité relative	61,0%
				Spécificité relative	100%
	-	0	75	Accord	80,3%

Des 66 échantillons cANCA IFA positifs, 6 étaient PR3 négatifs et 1 échantillon était ELISA positif mais IFA négatif. Des 77 échantillons pANCA IFA positifs, 30 étaient négatifs selon MPO ELISA spécifique. Aucun échantillon pANCA, IFA négatif n'a été considéré positif par MPO ELISA.

Symboles utilises

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour <n> Tests
	Consulter les instructions d'utilisation.

References

1. Goeken JA, Antineutrophil cytoplasmic antibody - a useful serological marker for vasculitis. J Clin Immunol 11:161-174, 1991.
2. Specks U, et. al., Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis. May Clin Proc 64:28-36, 1989.
3. van der Woude FJ, et. al., Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tools for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet 423-429, 1985.
4. Cohen-Tervaert JW, et. al., Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. Arch Intern Med 149:2461-2465, 1989.
5. Cambridge, et. al., Antineutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. Gut 33:668-679, 1992.
6. Nolle B, et. al., Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. Ann Int Med 111:28-40, 1988.
7. Charles LA, Falk RJ, Jennette JC, Clin Immunol Immunopathol 53:243-253, 1989.
8. Falk RJ, Jennette JC, Anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N Engl J Med 318:1651-1657, 1988.
9. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ, Am J Path 135:921-930, 1989.
10. Gross WL, Ludemann G, et. al., Lancet 1:806, 1986.
11. Cohen-Tervaert JW, et. al., Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. Arth and Rheum 33(8):1264-1272, 1990.
12. Cohen-Tervaert JW, et. al., Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. Kidney Int 37:799-806, 1990.
13. Cohen-Tervaert JW, et. al., Detection of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: a useful adjunct to classification of patients with biopsy proven necrotizing arteritis. Am J Med 91:59-66, 1991.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2009/21 CFR660.28(b)(15)
15. Stroncek DF, et. al., Neutrophil alloantibodies react with cytoplasmic antigens: a possible cause of false-positive indirect immunofluorescence assays for antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. Am J Kidney Dis 21:368-373, 1993.
16. Hardarson S, et. al., Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. Clinical Microbiology and Immunology 99: No. 3, 1992.

Fabricant:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America
Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Australian Sponsor :

Werfen Australia Pty Ltd
59-61 Dickson Avenue
Artarmon NSW 2064 Australia
Tel. +61 2 9098 0200 / 1300 369 132
<http://au.werfen.com/>

Représentant Autorisé:

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

628290FR

Septembre 2019
Révision 23

