



SYSTÈME DE TEST D'ANTICORPS ANTI-PR3-ANCA RELISA®

Pour utilisation diagnostique in vitro

À usage professionnel

Référence catalogue : 7096-16

UTILISATION PRÉVUE : il s'agit d'un système de test par immunodosage enzymatique pour la détection des anticorps anti-protéinase 3 (PR3) dans le sérum humain. Ce système de test doit être utilisé comme une aide à la détection des anticorps associés à la granulomatose avec polyangéite, ainsi que d'autres vascularites.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les auto-anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) sont un groupe d'anticorps qui réagissent avec les antigènes cytoplasmiques dans les neutrophiles humains. Bien que ces anticorps aient été initialement signalés en 1964 (1), le premier rapport associant ces anticorps à la maladie date de 1982, lorsque Davies et al. les ont observés chez huit patients atteints de glomérulonéphrite nécrasante segmentaire (2). En 1984, quatre autres patients souffrant de vascularite et de glomérulonéphrite ont été signalés. En 1985, van der Woude et al ont montré que l'ANCA était fortement associé à la granulomatose avec polyangéite que le titre de l'anticorps était corrélé à l'activité de la maladie (3). En 1988, Falk et Jennette ont rapporté que l'ANCA avait plusieurs spécificités antigéniques (4). Une étude ultérieure a démontré que la spécificité de l'ANCA était corrélée aux caractéristiques pathologiques des vascularites (5).

Le dépistage de l'ANCA est habituellement effectué par le test d'immunofluorescence indirect. Dans ce test, plusieurs images de fluorescence cellulaire peuvent être observées. Deux images majeures ont été décrites et bien caractérisées lorsque les neutrophiles fixés à l'éthanol sont utilisés dans le test ANCA immunofluorescent. Les auto-anticorps qui présentent une image cytoplasmique granulaire fine, appelés C-ANCA, sont généralement dirigés contre une sérine protéase, la protéinase 3 (PR-3). Il a été démontré que ces auto-anticorps sont fortement corrélés à la granulomatose avec polyangéite. L'autre image majeure, l'image périnucléaire ou P-ANCA, généralement attribuée à des anticorps dirigés contre la myéloperoxydase (MPO), a été associée à la vascularite systémique et à la glomérulonéphrite nécrasante idiopathique et à croissants épithéliaux (4). Tous les échantillons qui sont positifs au test d'immunofluorescence indirect doivent être confirmés comme MPO-ANCA ou PR3-ANCA par un immunodosage enzymatique (EIA). Selon certains auteurs, tous les échantillons prélevés de patients cliniquement suspects doivent être testés par EIA, étant donné que 5 % des échantillons sont positifs uniquement par EIA (6). Bien que PR3-ANCA soient le plus souvent observés chez les patients atteints de granulomatose avec polyangéite (jusqu'à 85 % des patients), ils ne sont pas spécifiques à cette maladie puisqu'ils sont également signalés dans un plus petit pourcentage de patients atteints de glomérulonéphrite nécrasante idiopathique et à croissants épithéliaux. De manière similaire, MPO-ANCA sont associés à la glomérulonéphrite nécrasante idiopathique et à croissants épithéliaux chez jusqu'à 65 % des patients, mais on peut également les observer dans un plus petit pourcentage de patients atteints de granulomatose avec polyangéite. MPO-ANCA ou PR3-ANCA peuvent être observés dans la polyangéite microscopique, chacun dans approximativement 45 % des patients (7, 8, 9).

PRINCIPE DU TEST



Ce test est un immunodosage enzymatique indirect semi-quantitatif. Des antigènes PR3 humains stabilisés ont été déposés à la surface des micropuits pour servir de substrat antigénique dans ce système. Les dilutions des échantillons de patient sont placées dans les micropuits et mises à incuber, ce qui permet aux anticorps spécifiques de l'échantillon de réagir avec l'antigène sur la phase solide. Après le lavage visant à éliminer les anticorps non liés et d'autres protéines sériques, les puits sont mis à incuber avec des anticorps antihumains de chèvre marqués par de la peroxydase de raifort. La préparation d'anticorps conjugués à de la peroxydase de raifort incluse dans le système de test est spécifique aux chaînes gamma de l'IgG humain.

Après incubation avec le conjugué de peroxydase de raifort, un complexe tripartite stable se forme si les résultats sont positifs. Ce complexe se compose d'un anticorps antihumain conjugué à de la peroxydase de raifort lié à des anticorps humains anti-PR3, eux-mêmes liés à l'antigène stabilisé sur la surface en plastique.

Après un deuxième lavage, ce complexe est détecté par ajout d'une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) et de H₂O₂ servant de substrat chromogène. Le degré de développement de la couleur dans chaque puits est proportionnel à la concentration d'anticorps anti-PR3 dans chaque échantillon de sérum. Chaque micropuits est lu à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

COMPOSANTS DU SYSTEME - MATERIELS FOURNIS

Conservation : tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Ne pas congeler.

Stabilité : tous les composants restent stables au moins 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Bandelettes de micropuits recouvertes de PR3 RELISA® [PLATE]: réf. catalogue 7008-16. Structure de micropuits contenant douze bandelettes pour huit puits revêtues de PR3 humain. Le code couleur de ces bandelettes est vert. Si moins de 8 puits sont nécessaires pour le test, les puits peuvent être détachés. Les bandelettes non utilisées peuvent être remises dans le sachet métallisé avec l'emballage déshydratant, fermées hermétiquement par la glissière et réfrigérées pendant 45 jours maximum.

Diluant pour échantillon RELISA® [SOLN|DIL]: référence catalogue 7100 (100 mL). Diluant tamponné propriétaire, utilisé pour diluer les échantillons de patient.

Réactif immuno-enzymatique RELISA® – spécifique aux chaînes gamma d'IgG humain [CONJ|HRP]: référence catalogue 7009-16 (14 mL). Anti-IgG humaine (spécifique aux chaînes gamma) conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP). Le réactif est prêt à l'emploi.

Solution de substrat RELISA® [SOLN|SUB]: référence catalogue 7035 (14 mL). Solution de substrat enzymatique spécifique à la HRP, contenant de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) stabilisés. Le réactif est prêt à l'emploi.

Réactif d'arrêt RELISA® [SOLN|STOP]: Référence catalogue 7033 (14 ml). Réactif d'arrêt propriétaire pour les systèmes de test EIA d'Immuno Concepts. Le réactif est prêt à l'emploi. **ATTENTION** : Corrosif. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3 % chacun par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

Sérums étalons PR3 RELISA® [CAL]: références catalogue 7261-16, 7262-16, 7263-16, 7264-16, 7265-16 (2 mL chacun). Sérum humain qui contient des anticorps anti-PR3. La valeur de dosage pour chacun de ces sérums est indiquée sur l'étiquette du flacon. Ces sérums sont pré-dilués et prêts à l'emploi.

Contrôle positif PR3 RELISA® [CONTROL|+]: référence catalogue 7021-16 (2 mL). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps anti-PR3. Ce sérum est pré-dilué et prêt à l'emploi.

Contrôle négatif RELISA® [CONTROL|-]: référence catalogue 7031 (2 mL). Sérum de contrôle négatif humain qui ne contient pas d'anticorps anti-PR3. Ce sérum est pré-dilué et prêt à l'emploi.

Contrôle positif dosé non dilué PR3 optionnel RELISA® OPT+: référence catalogue 7022-16 (0,25 mL). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps anti-PR3. Traiter ce contrôle positif comme un sérum non dilué. La valeur de dosage de ce sérum est indiquée sur l'étiquette du flacon.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Support pour micropuits

Solution tampon de lavage :

Tampon PBS PWDR|PBS: réf. catalogue 1011. Solution saline en poudre tamponnée au phosphate (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer un litre de solution. (Chaque kit de test complet contient deux sachets de poudre tampon pour chaque plateau de 96 micropuits.)

Concentré tampon de lavage SOLN|WASH: réf. catalogue 1031 (10 mL). Solution Tween 20 à 5 % à utiliser dans le tampon de lavage. (Chaque kit de test complet contient deux flacons de concentré tampon pour chaque plateau de 96 micropuits.)

Préparation : dissoudre un sachet de poudre tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter tout le contenu d'une bouteille de concentré tampon de lavage au tampon PBS dissous. Bien mélanger et conserver au entre 2 et 25°C pendant 4 semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent. La solution tampon de lavage doit être à température ambiante (18 à 25°C) avant utilisation.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipeteurs volumétriques de précision permettant de prélever de 25 à 1000 µl
Pissette en plastique pour distribuer la solution tampon de lavage dans les micropuits ou système de lavage des micropuits, automatisé ou semi-automatisé
Récipient d'un litre pour la solution tampon de lavage PBS
Eau désionisée ou distillée
Spectrophotomètre lecteur de microplaques capable de lire la densité optique à 450 nm
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier
Pipeteur multicanal capable de remplir 8 puits
Gants jetables
Chronomètre de laboratoire

PRECAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la composition de ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et VIH 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) selon les méthodes approuvées par la FDA. Néanmoins, aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de VIH 1, VIH 2, HCV, HBV ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériels du kit doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. Tous les échantillons de patient doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2 pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health : *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce kit peut donner lieu à des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,09 %) est utilisé comme conservateur. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
5. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
6. Ne jamais pipeter avec la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de l'eau.
7. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
8. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
9. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.

10. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats. Pendant le test, les échantillons doivent rester confinés dans les micropuits.
11. Avant utilisation, la verrerie réutilisable doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
12. Avant utilisation, porter les réactifs, micropuits et échantillons à température ambiante (18 à 25°C).
13. Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons et réactifs puis se laver soigneusement les mains par la suite.
14. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
15. Le réactif d'arrêt est corrosif et peut provoquer des brûlures. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3 % chacun par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

PRELEVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélèvement : le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 mL de sang entier doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18 à 25°C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse.

Substances interférentes : les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés, car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation : les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C pendant une semaine maximum. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20°C minimum. Le sérum ne doit pas être conservé dans un réfrigérateur ou un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION : les congélations et décongélations successives des échantillons de patient peuvent induire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

REMARQUES GENERALES RELATIVES A LA PROCEDURE

1. Il est extrêmement important que tous les composants du kit et les échantillons de sérum soient à température ambiante (18 à 25°C) avant utilisation. Il faut à un litre de tampon de lavage plusieurs heures pour atteindre 20°C à sa sortie du réfrigérateur. Les températures d'incubation au-dessus ou en dessous de la plage indiquée peuvent donner des résultats inexacts. Remettre les échantillons et les réactifs non utilisés au réfrigérateur après utilisation.
2. Avant utilisation, bien mélanger les réactifs en retournant doucement les flacons. Ne pas créer de tourbillon dans les réactifs ou les secouer. Éviter la formation de mousse.
3. Lors de la préparation des dilutions d'échantillon, essuyer les embouts des pipettes avant de déposer le sérum dans le diluant pour échantillon. Si un excès d'échantillon adhère à l'embout de la pipette, les résultats s'en trouveront affectés.
4. L'utilisation d'un pipeteur multicanal est recommandée, car il permet d'uniformiser la répartition du réactif ainsi que les durées d'incubation et de réaction.
5. **Un lavage adéquat des puits est extrêmement important.** Des puits mal lavés afficheront des valeurs de bruit de fond élevées, ainsi que des valeurs faussement positives. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes (remplissage/élimination) jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage. Pour un lavage homogène des puits, il est recommandé d'utiliser un système automatisé.
REMARQUE : en raison des divers types de techniques de lavage et de systèmes automatisés, le nombre de lavages peut être adapté pour obtenir des résultats optimaux. Chaque laboratoire doit déterminer le nombre de lavages le plus efficace pour son système de lavage.
6. Une élimination inadaptée des résidus de tampon de lavage peut conduire à un développement non homogène de la couleur. Sécher les bandelettes de micropuits sur du papier ou des serviettes absorbants afin d'éliminer au maximum les résidus de tampon de lavage.

- Le respect du minutage de toutes les étapes est essentiel. Tous les échantillons de sérum doivent être dilués avant le début de la procédure et déposés dans les micropuits aussi rapidement que possible (moins de cinq minutes). La taille des lots doit être définie de manière à ce que la manipulation des échantillons puisse être accomplie sans précipitation dans ce laps de temps. Il est recommandé d'utiliser un pipeteur multicanal qui facilite la manipulation des échantillons et des réactifs.
- À l'exception de la dernière incubation (solution de substrat), chaque période d'incubation commence dès que l'échantillon ou le réactif est déposé. L'incubation de la solution de substrat doit durer exactement 15 minutes pour chaque puits. Tous les échantillons et réactifs doivent être déposés dans le même ordre et à un rythme constant.

INTERPRETATION DES RESULTATS

CALCULS

- Soustraire la valeur de densité optique du blanc de réactif des valeurs de densité optique obtenues dans les puits d'échantillonnage, de contrôle et d'échantillon de patient. Calculer les valeurs de densité optique moyennes pour les doubles de puits.
- Tracer la valeur de densité optique moyenne de chaque étalon sur le formulaire RELISA® PR3 Standard Set. Dessiner la ligne la mieux adaptée entre les points d'étalonnage. Si le lecteur de microplaques est programmable, la courbe standard peut être calculée avec un ajustement optimal en utilisant la fonction lin-lin.
- Obtenir la valeur unitaire de chaque échantillon de patient par interpolation à partir de la ligne d'étalonnage.

MÉTHODE D'ÉTALONNAGE À POINT UNIQUE OPTIONNEL

- Soustraire la valeur de densité optique du blanc de réactif des valeurs de densité optique obtenues dans les puits d'étalonnage, de contrôle et d'échantillon de patient. Calculer les valeurs de densité optique moyennes pour les doubles de puits.
- Diviser la concentration en anticorps spécifique du sérum étalon n°3 (indiquée sur l'étiquette) par la valeur de densité optique moyenne des puits d'échantillonnage pour obtenir le facteur de conversion.
- Multiplier les valeurs de densité optique de chacun des échantillons par le facteur de conversion afin d'obtenir la concentration en anticorps spécifique en unités.
- La forme simplifiée de ces calculs peut être exprimée comme suit :

$$\frac{\text{Valeur étalon n°3 (unités)}}{\text{Densité optique de l'étalon n°3}} \times \text{Densité optique de l'échantillon}^* = \text{Valeur unitaire pour l'échantillon}$$

*Si les étalons et les échantillons sont analysés en double, utiliser la densité optique moyenne des doubles de puits.

CONTRÔLE QUALITÉ

- La valeur de densité optique moyenne de l'étalon n°3 doit être d'au moins 0,400. Les valeurs de densité optique inférieures à 0,400 indiquent un développement de la couleur inadéquat et une analyse non valide. Un développement inadéquat de la couleur est généralement dû à l'utilisation de réactifs froids ou au non-respect du minutage d'une ou plusieurs étapes de dosage. Porter tous les réactifs à température ambiante (18 à 25°C) et recommencer l'analyse en veillant à respecter le minutage de toutes les étapes.
- Le puits de contrôle à blanc doit avoir une valeur de densité optique inférieure à 0,150. Les valeurs de densité optique à blanc supérieures à 0,150 indiquent un lavage inadéquat ou une contamination des réactifs, ainsi qu'une analyse non valide.
- Les échantillons dont les valeurs d'anticorps spécifiques sont supérieures à la limite maximale de l'étalon n°5 doivent être signalés comme étant supérieurs à la valeur unitaire de l'étalon n°5.
- La ligne d'étalonnage doit être tracée pour chaque analyse (ou le facteur de conversion doit être calculé si l'étalonnage à point unique optionnel est utilisé). L'utilisation d'une ligne d'étalonnage ou d'un facteur de conversion d'une autre analyse invalidera les résultats.
- Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients étudiée et d'autres facteurs locaux.
- Le sérum de contrôle positif est un sérum humain qui contient des anticorps anti-PR3. Il s'agit d'un contrôle qualitatif qui doit donner une valeur supérieure à 35 unités PR3.
- Le sérum de contrôle négatif est un pool de sérum humain qui ne contient pas d'anticorps anti-PR3. Ce contrôle doit donner des valeurs inférieures à 35 unités PR3.
- Le sérum de contrôle positif dosé non dilué est un sérum humain qui contient des anticorps anti-PR3. La valeur de dosage de ce contrôle est indiquée en unités PR3 sur l'étiquette. Cette plage a été établie pour englober 99 % des valeurs escomptées dues à une variation statistiquement normale. De faibles écarts peuvent occasionnellement être observés hors des plages. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères d'acceptation/de rejet en se basant sur son expérience de ce dosage.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

Il s'agit d'un dosage semi-quantitatif. Les niveaux d'anticorps anti-PR3 ont augmenté et baissé au cours de la maladie, mais la signification clinique d'un niveau d'anticorps unique est encore à l'étude (9). Les valeurs unitaires obtenues dans ce dosage sont conçues uniquement pour répartir les patients dans les grands groupes suivants. Les puits d'échantillon de patient dont les valeurs sont supérieures ou égales à 35 unités PR3 sont considérés comme positifs. Les puits d'échantillon de patient dont les valeurs sont inférieures à 35 unités sont considérés comme négatifs. Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de référence (limite et plage) en fonction de la population de patients faisant l'objet de tests. Les valeurs unitaires sont affectées par des facteurs liés aux patients, des considérations mécaniques (précision et exactitude du pipetage, etc.) et les conditions de dosage (température et minutage des étapes, etc.). Les déterminations en série de niveaux d'anticorps sur un patient peuvent indiquer l'augmentation ou la diminution des niveaux d'anticorps.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être notés positifs ou négatifs aux anticorps anti-PR3, avec la valeur unitaire. Les niveaux d'anticorps détectés dans un échantillon unique ont une signification clinique limitée. Les déterminations en série de niveaux d'anticorps sur un patient peuvent indiquer l'augmentation ou la diminution des niveaux d'anticorps, qui se sont avérés suivre la progression de la maladie.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut être réalisé sur la base de la détection des anticorps anti-PR3-ANCA seuls. Le médecin doit interpréter ces résultats au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et d'autres procédures de diagnostic.
2. Le traitement ne doit pas débuter sur la seule base d'un test positif aux anticorps anti-PR3. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en compte avant de commencer tout traitement.
3. Les résultats de ce test doivent être utilisés au regard des informations disponibles à partir de l'évaluation clinique et d'autres procédures de diagnostic pour déterminer l'état clinique du patient.

VALEURS ESCOMPTÉES

Dans une population normale, la valeur escomptée est inférieure à 35 unités PR3 (négative). PR3-ANCA ont été observés chez jusqu'à 85 % des patients atteints de granulomatose avec polyangéite, 45 % des patients atteints de polyangéite microscopique et chez un plus petit pourcentage de patients atteints de glomérulonéphrite nécrisante et à croissants épithéliaux (9).

PLAGE DE REFERENCE

La plage de référence a été établie en testant des sérums de 500 donneurs de sang en bonne santé, 239 femmes et 261 hommes, aucun d'entre eux n'ayant d'antécédents de maladies rhumatismales. En se basant sur une courbe ROC (Receiver Operator Curve) produite à partir de ces données, la valeur de limite normale a été établie comme inférieure à 35 unités PR3.

En raison de la variabilité inhérente des dosages ELISA, les valeurs unitaires dans cinq unités au-dessus ou en dessous de la valeur de limite normale positive/négative (à savoir, entre 30 et 40 unités) doivent être soigneusement interprétées. Les analyses cliniques, les signes, les symptômes, le diagnostic clinique du médecin et d'autres résultats de laboratoire doivent être évalués dans l'interprétation des résultats de ce dosage.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Le système de test PR3 RELISA® d'Immuno Concepts a été comparé à un autre système de test PR3 ELISA disponible sur le marché. La population étudiée comprenait 173 échantillons soumis à des laboratoires cliniques pour les tests ANCA, MPO et PR3, mais sans diagnostic spécifique, 10 échantillons provenaient de patients pour lesquels on a diagnostiqué une polyangéite microscopique, 15 échantillons provenaient de patients pour lesquels on a diagnostiqué une glomérulonéphrite nécrisante et à croissants épithéliaux, 12 échantillons provenaient de patients pour lesquels on a diagnostiqué une périartérite noueuse, 7 échantillons provenaient de patients pour lesquels on a diagnostiqué une éosinophilie granulomateuse avec polyangéite, 12 patients pour lesquels on a diagnostiqué une vascularite, 25 patients pour lesquels on a diagnostiqué la granulomatose avec polyangéite, 261 échantillons de donneurs de sang du sexe masculin et 239 échantillons de donneurs de sang du sexe féminin. Tous les échantillons ont été testés en parallèle sur le dispositif équivalent et sur le dispositif étudié. En se basant sur ces comparaisons, les données suivantes ont été obtenues en utilisant la courbe d'étalonnage à cinq points :

Test d'anticorps anti-PR3 RELISA® Immuno Concepts	Test anti-PR3 équivalent		
		Positif	Négatif
	Positif	179	8
Négatif	4	563	

Ces données produisent les statistiques suivantes : sensibilité relative, 97,8 % ; spécificité relative, 98,6 % ; et agrément total, 98,4 %.

Parmi les 8 échantillons « faussement positifs », 2 présentaient une image P-ANCA par immunofluorescence, 4 montraient une image C-ANCA par immunofluorescence et 2 ne présentaient pas d'image immunofluorescence. Deux des échantillons qui présentaient une image C-ANCA par immunofluorescence et un PR3 RELISA® positif provenaient de patients pour lesquels on a diagnostiqué la granulomatose avec polyangéite, et un des échantillons qui montraient une image P-ANCA par immunofluorescence et un PR3 RELISA® positif provenait d'un patient pour lequel on a diagnostiqué le éosinophiles granulomatose avec polyangéite. Ces échantillons peuvent en fait représenter des résultats « faussement négatifs » sur le dispositif équivalent.

Les données suivantes ont été obtenues en utilisant la méthode d'étalonnage à point unique optionnel :

Test d'anticorps anti-PR3 RELISA® Immuno Concepts	Test anti-PR3 équivalent		
		Positif	Négatif
	Positif	176	4
Négatif	7	567	

Ces données produisent les statistiques suivantes : sensibilité relative, 96,2 % ; spécificité relative, 99,3 % ; et agrément total, 98,5 %.

REPRODUCTIBILITÉ

La précision du dosage a été mesurée en utilisant sept échantillons qui avaient des valeurs PR3-ANCA dans la plage de la courbe d'étalonnage. Ces échantillons ont été analysés en double sur trois numéros de lot différents de bandelettes de micropuits enduites d'antigènes, à trois occasions différentes, par trois techniciens différents. L'intradosage et la précision de l'intradosage sont présentés dans les tableaux suivants :

PRÉCISION INTRADOSAGE

n=21	Concentration (unités)	S.D.	% C.V.
Échantillon 1	125	7	5
Échantillon 2	97	8	8
Échantillon 3	74	3	4
Échantillon 4	65	4	6
Échantillon 5	59	4	7
Échantillon 6	117	6	5
Échantillon 7	240	11	5

PRÉCISION INTRADOSAGE

n=3	Concentration (unités)	S.D.	% C.V.
Échantillon 1	125	9	7
Échantillon 2	97	7	8
Échantillon 3	74	6	9
Échantillon 4	65	10	15
Échantillon 5	59	8	14
Échantillon 6	117	16	14
Échantillon 7	240	12	5

LINÉARITÉ

Dans la plage de la courbe d'étalonnage, le dosage est linéaire, comme le montrent les méthodes présentées dans les directives NCCLS, *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods* (10).

VALIDATION DE L'ÉTALONNAGE À POINT UNIQUE

L'utilisation d'un étalonneur à point unique a été validée avec le même panel de 754 sérums utilisés à des fins de comparaison avec le dispositif équivalent. L'analyse de régression de cette comparaison a révélé un coefficient de régression (r^2) de 99,2 % et l'analyse de la variance (ANOVA) des données a montré l'absence de différence statistiquement significative entre les deux méthodes. D'un point de vue pratique, dans cette comparaison, on a observé que seulement trois échantillons (0,4 %) ont présenté des écarts de diagnostic entre le système d'étalonnage à cinq points et le système d'étalonnage à point unique optionnel. Tous ces échantillons avaient des valeurs unitaires PR3 proches de la limite de 35 unités, allant de 31 à 40 unités (10). Ce type d'échantillon représente un problème de diagnostic dans tout système de dosage et doit être attentivement pris en compte par les professionnels de laboratoire qui analysent les échantillons et interprètent les données.

ÉTUDES SUR LA RÉACTIVITÉ CROISÉE

Un total de 40 sérums qui contenaient des anticorps autres qu'anti-PR3-ANCA ont fait l'objet de tests avec le système de test PR3 RELISA® d'Immuno Concepts. Ces échantillons comportaient les images d'anticorps antinucléaires courantes, à savoir homogènes, mouchetées et nucléolaires, de même que des anticorps dirigés contre des composants cytoplasmiques tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi et le cytosquelette. Des facteurs rhumatoïdes étaient présents dans vingt échantillons. Aucun de ces échantillons n'a produit de résultat positif dans le système de test PR3 RELISA® d'Immuno Concepts.

BIBLIOGRAPHIE

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et al. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. *Lancet* 2:344-345, 1964.
2. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F., et al. Segmental Necrotising Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? *Br. Med. J.* 285:606, 1982.
3. van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et al. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1:425-429, 1985.
4. Falk, R.J., Jennette, J.C. Antineutrophil 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.
5. Jennette, J.C., Wilkman, A.S., Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-associated Glomerulonephritis and Vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135:921-930, 1989.
6. Savige, J., Gillis, D., Benson, E., et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am. J. Clin. Pathol.* 111:507-513, 1999.
7. Kallenberg, C.G.M. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase. In: Peter, J.B. and Shoenfeld, Y., eds. *Autoantibodies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V. 1996: 53-60.
8. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M.S., DeRemee, R.A., and Gross, W.L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Int. Med.* 111:28-40, 1989.
9. Falk, R.J., Jennette, J.C. ANCA Small-Vessel Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:314-322, 1997.
10. Data on file, Immuno Concepts, N.A., Ltd.

Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.



Constructeur



Représentant autorisé dans la Communauté Européenne



Limitation de la température



Contient suffisamment pour <n> tests



Consultez les instructions pour l'usage



Dispositif medical diagnostic in vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Allemagne



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
E-mail : technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCEDURE DE TEST ANCA-PR3 RELISA®

Tous les échantillons, réactifs (y compris solution tampon de lavage) et micropuits doivent être à température ambiante avant utilisation.

- 1. PREPARATION DU FORMULAIRE**
Étiqueter le formulaire inclus dans le kit afin d'indiquer l'emplacement des échantillons dans les micropuits. Procéder au dosage des étalons en double. Pour utiliser la courbe à point multiple, la totalité des cinq sérums étalons doit être analysée. Pour la méthode d'étalonnage à point unique optionnel, analyser uniquement l'étalon n°3 en double. Un puits est utilisé pour un blanc de réactif. Nous recommandons que chaque contrôle et échantillon de patient soient dosés en double jusqu'à ce que vous ayez établi une précision acceptable pour le dosage dans votre laboratoire.
- 2. PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON DE LAVAGE (PBS-Tween)**
Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon PBS dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter tout le contenu d'une bouteille de concentré tampon de lavage au récipient d'un litre de PBS dissous. Bien mélanger. La solution tampon de lavage peut être couverte et conservée entre 2 et 25°C pendant quatre semaines maximum.
- 3. DILUTION DES ECHANTILLONS DES PATIENTS**
Diluer les échantillons des patients à 1:40 en ajoutant 25 µl de sérum à 975 µl de diluant pour échantillon. Si vous utilisez le contrôle positif dosé non dilué PR3 optionnel, le diluer de la même manière que les échantillons des patients. Bien mélanger. L'étalon, le contrôle positif et le contrôle négatif sont pré-dilués et ne doivent pas être dilués de nouveau.
- 4. PREPARATION DES MICROPUITS**
Sortir du sachet le nombre de barrettes nécessaires à la manipulation et les positionner sur le support. Les micropuits doivent être clipsés fermement sur le support. Pour ce faire, appuyer sur les deux extrémités des barrettes jusqu'à l'enclenchement sur le support. Si le test requiert moins de huit puits, ils peuvent être séparés par simple rupture. Si vous utilisez des puits isolés ou une barrette incomplète, veiller à ce que chaque puits soit correctement placé afin qu'il ne tombe pas lors du retournement du support. Conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet absorbant d'humidité, fermer hermétiquement, puis réfrigérer pendant 45 jours maximum.
- 5. DISTRIBUTION DES DILUTIONS SERIQUES**
Déposer 100 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon de patient dilué dans les puits appropriés comme décrit sur le formulaire. Déposer 100 µl de diluant pour échantillon dans le puits du blanc de réactif.
- 6. INCUBATION DES BANDELETTES (30 minutes à température ambiante, soit 18 à 25°C)**
Mettre à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les bandelettes doivent être protégées des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation. Recouvrir, le cas échéant, les bandelettes d'un film transparent ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.
- 7. LAVAGE DES BANDELETTES (voir Remarques générales relatives à la procédure 5 et 6)**
Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage PBS-Tween. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits, puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes (remplissage/élimination) jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.
- 8. DISTRIBUTION DU REACTIF IMMUNO-ENZYMATIQUE**
Déposer 100 µl de réactif immuno-enzymatique dans chacun des puits.
- 9. INCUBATION DES BANDELETTES (30 minutes à température ambiante, soit 18 à 25°C)**
Incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les bandelettes doivent être protégées des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation. Recouvrir, le cas échéant, les bandelettes d'un film transparent ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.
- 10. LAVAGE DES BANDELETTES**
Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage PBS-Tween. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes (remplissage/élimination) jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.
- 11. DISTRIBUTION DE LA SOLUTION DE SUBSTRAT**
Utiliser un chronomètre pour respecter le minutage et déposer 100 µl de solution de substrat dans chacun des puits. La solution de substrat doit être ajoutée aux puits à un rythme constant, de manière à ce que l'incubation de chaque puits ait la même durée (15 minutes). La solution de substrat mise à incuber avec des échantillons positifs se colore en bleu et celle mise à incuber avec des échantillons négatifs variera d'incolore à bleu très pale.
- 12. INCUBATION DES BANDELETTES (exactement 15 minutes à température ambiante, soit 18 à 25°C)**
Incuber à température ambiante pendant exactement 15 minutes. Les bandelettes doivent être protégées des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation.
- 13. DISTRIBUTION DU REACTIF D'ARRÊT**
Après incubation du premier puits pendant exactement 15 minutes, ajouter 100 µl de réactif d'arrêt dans chaque puits, dans le même ordre et au même rythme que pour l'ajout de solution de substrat dans les puits. Dès l'ajout de réactif d'arrêt, la solution de substrat bleue devient jaune et la solution incolore demeure incolore.
- 14. LECTURE DE LA DENSITE OPTIQUE DES PUIITS**
Dans les 30 minutes suivant l'ajout de réactif d'arrêt, les puits doivent être lus à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques. Les puits sont lus à 450 nm par rapport au puits de contrôle à blanc. Si un spectrophotomètre à double longueur d'onde est disponible, la longueur d'onde pour le filtre de référence doit être réglée sur 600 à 650 nm. La lecture des micropuits à 450 nm sans filtre de référence entraînera des valeurs de densité optique supérieures.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649
ou messagerie électronique: technicalsupport@immunoconcepts.com