



SYSTÈME DE TEST ANCA

Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour l'Usage Professionnel

UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection semi-quantitative des auto-anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) dans le sérum humain. Le système doit être utilisé comme une aide à la détection des anticorps associés à la vascularite auto-immune.

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 nécrosante 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 et 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).

Dans le test d'immunofluorescence pour l'ANCA, 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 (PR3). 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 nécrosante idiopathique et à croissants épithéliaux (4). L'image P-ANCA est un artefact induit par l'utilisation de l'éthanol comme fixateur (4). Si les neutrophiles sont fixés dans le formol, la myéloperoxydase (principal antigène responsable de l'image P-ANCA dans les cellules fixées à l'éthanol) reste associée aux granules (alpha) primaires et présente une répartition cytoplasmique granulaire. La protéinase 3 (PR3) reste associée aux granules (alpha) primaires dans les fixateurs éthanol ou formol.

PRINCIPE DU TEST

Le test des auto-anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) d'Immuno Concepts utilise la technique d'immunofluorescence indirecte (IFA) initialement décrite par Weller et Coons (6). Les échantillons de patient dilués sont mis à incuber avec des neutrophiles humains qui sont fixés sur des lames de microscope en verre pour permettre la liaison spécifique des ANCA. En présence d'ANCA, les auto-anticorps se lient aux antigènes neutrophiles. Après le rinçage destiné à éliminer les anticorps non spécifiques, le substrat est mis à incuber avec de l'IgG anti-humaine conjuguée à de la fluorescéine. Lorsque les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable composé d'un anticorps anti-humain fluorescent lié à un auto-anticorps anti-neutrophile cytoplasmique humain, lui-même lié à un antigène situé dans les cellules. Ce complexe peut être visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les échantillons positifs au C-ANCA présentent une fluorescence cytoplasmique granulaire caractéristique des neutrophiles sur les lames fixées à l'éthanol et au formol.

Dans les échantillons positifs au P-ANCA, on observe une fluorescence nucléaire diffuse ou périphérique des neutrophiles sur les cellules fixées à l'éthanol et on note une fluorescence granulaire du cytoplasme sur les cellules fixées au formol. Si l'échantillon est négatif à l'ANCA, aucune fluorescence spécifique des neutrophiles n'est observée.

COMPOSITION DES SYSTÈMES - MATÉRIELS FOURNIS

Utilisation: Tous les composants sont prêts à l'emploi et ne requièrent ni aliquotage ni reconstitution (sauf pour le tampon PBS qui doit être dissous dans une eau désionisée ou distillée avant utilisation).

Conservation: Tous les composants peuvent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Après reconstitution, le tampon PBS doit être conservé dans des récipients à bouchon à vis, et conserver entre 2 et 25°C. pendant 4 semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent.

Stabilité: Tous les composants sont stables pendant 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Lames de substrat ANCA [SLIDE]: Lames contenant des neutrophiles humains stabilisés et fixés directement sur les puits de test. Le concept unique de la lame recouverte de téflon (Moat) évite toute contamination croisée entre les puits pendant le test. Le sachet de la lame contient un gaz inerte non toxique qui contribue à la stabilité des cellules.

Diluant pour échantillon ANCA [SOLN|DIL]: Référence catalogue 10100 (100 ml). Diluant tamponné propriétaire, utilisé pour diluer les échantillons de patient.

Contrôle positif C-ANCA [CONTROL|+]: Référence catalogue 10021-12. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif C-ANCA. Ce sérum présente une fluorescence granulaire du cytoplasme entre les segments nucléaires des neutrophiles sur les lames fixées à l'éthanol et au formol.

Contrôle positif P-ANCA [CONTROL|+]: Référence catalogue 10021-11. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif P-ANCA. Ce sérum présente une fluorescence nucléaire diffuse ou périphérique des neutrophiles sur les lames fixées à l'éthanol et une fluorescence cytoplasmique granulaire sur les lames fixées au formol.

Contrôle titrable C-ANCA [TC]: Référence catalogue 10026-12. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,25 ml de sérum de contrôle humain positif C-ANCA stable liquide. Ce contrôle doit être traité comme un échantillon de patient non dilué. Voir l'étiquette du flacon pour connaître le titre moyen.

Contrôle titrable P-ANCA [TC]: Référence catalogue 10026-11. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,25 ml de sérum de contrôle humain positif P-ANCA stable liquide. Voir l'étiquette du flacon pour connaître le titre moyen.

Contrôle négatif [CONTROL|-]: Référence catalogue 10031. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain négatif ANCA. Ce sérum présente une fluorescence vert sombre non spécifique peu intense des neutrophiles.

Réactif immunofluorescent - Spécifique à l'IgG [CONJ|FITC]: Référence catalogue 10009 (9 ml). Anti-IgG humaine conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce réactif contient du bleu d'Evans comme contre-colorant. Le réactif est fourni dans des flacons compte-gouttes de précision prêts à l'emploi.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Tampon PBS [PWDR|PBS]: Référence 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 1 litre de solution. Chaque kit de test complet contient un sachet de poudre tampon pour cinq lames.

Préparation: Dissoudre un sachet de poudre tampon dans 1 litre d'eau désionisée ou distillée, couvrir puis conserver entre 2 et 25°C pendant 4 semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent.

Milieu de montage semi-permanent [SOLN|MM]: Référence catalogue 1111. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 5 ml de milieu de montage à base de glycérol.

Lamelles couvre-objet [CVSLP]: Référence catalogue 1042. Chaque paquet contient 10 lamelles couvre-objet en verre n°1 de 24 x 64 mm.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipettes volumétriques permettant de prélever 20 à 25 µl
Jarres Coplin ou cuves à coloration
Pissette en plastique ou pipettes Pasteur
Pipettes sérologiques
Récipients d'un litre (pour tampon PBS)
Eau désionisée ou distillée
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier
Chambre d'incubation
Gants jetables
Chronomètre de laboratoire
Microscope à fluorescence équipé d'un filtre d'excitation de 495 nm et d'un filtre d'émission de 515 nm

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la préparation des contrôles pour 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 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. Aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de vih-1, vih-2, virus de l'hépatite C, virus de l'hépatite C ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les sérums de contrôle 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, comme 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 système 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. Le sérum de contrôle titrable est destiné à être utilisé pour surveiller la reproductibilité inter-lot et inter-analyse. Il n'est pas destiné à mesurer la sensibilité ou la spécificité globale de l'essai.
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.
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, lames et échantillons à température ambiante (18-25°C).
13. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs puis se laver soigneusement les mains en fin de procédure technique.
14. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
15. Ne pas 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.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLIONS

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 (18-25°C). Le sérum doit être séparé du caillot 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 une réduction du titre de l'anticorps peut survenir sur les échantillons positifs. Les échantillons dont les niveaux de lipide sont très élevés peuvent entraîner la formation d'un

film fluorescent non spécifique sur le substrat cellulaire. L'utilisation d'échantillons prélevés à jeun ou d'échantillons clarifiés par ultracentrifugation peut éliminer ce problème. 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 congélateur à dégivrage automatique.

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

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles positif, négatif et PSB doivent être testés une fois par essai. Le contrôle positif C-ANCA doit présenter une fluorescence cytoplasmique granulaire vert pomme intense des neutrophiles, entre les segments nucléaires sur les lames fixées à l'éthanol ou au formol. Le contrôle positif P-ANCA présente une fluorescence nucléaire diffuse ou périphérique vert pomme intense des neutrophiles sur les lames fixées à l'éthanol et une fluorescence cytoplasmique granulaire sur les lames fixées au formol. Le contrôle négatif ne doit pas présenter de fluorescence vert intense. Une fluorescence vert sombre non spécifique peu intense peut être observée dans le contrôle négatif. Le contrôle à blanc est utilisé pour observer la fluorescence non spécifique du réactif anticorps et ne doit pas présenter d'image fluorescente verte. Le contre-colorant fourni dans le conjugué peut donner aux cellules une couleur rouge sombre. Si les contrôles n'apparaissent pas tel que décrit, le test n'est pas valable et doit être recommencé.

CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL

Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient l'échantillon le plus dilué puis poursuivent « à rebours » jusqu'à la dilution 1:20. Le premier puits dans lequel une fluorescence cytoplasmique clairement perceptible est visible, est le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats de titrage.

Le titre moyen et la plage de titrage (\pm une dilution de part et d'autre de la moyenne) déterminés pour chaque numéro de lot ont été établis dans notre laboratoire et sont communiqués à titre indicatif. Ce contrôle est fourni pour permettre à chaque laboratoire d'évaluer la reproductibilité (précision) de son test ANCA. Étant donné que ce contrôle n'est pas destiné à être un indicateur de la précision du titrage, chaque laboratoire doit établir sa propre référence de titrage moyen pour cet échantillon et utiliser cette information pour évaluer la reproductibilité inter-analyse (précision).

Par de multiples dosages de ce contrôle titrable réalisés à l'aide du système de test ANCA fluorescent d'Immuno Concepts, une valeur de titre moyen a été établie pour chaque numéro de lot. Le numéro de lot, le titre moyen et la plage de titrage (\pm une double dilution de part et d'autre de la moyenne) sont indiqués sur l'étiquette du flacon et doivent être utilisés à titre indicatif pour la performance du système.

Les valeurs obtenues dans notre laboratoire peuvent différer de vos propres valeurs. De nombreux facteurs peuvent affecter vos résultats, notamment:

1. Type de source lumineuse: Les sources de lumière au mercure généreront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène. Les sources de lumière au mercure 50 watts, 100 watts et 200 watts diffèrent peu en matière d'énergie d'excitation à 495 nm. Les sources de lumière au quartz/l'halogène 100 watts produiront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène 50 watts.
2. État et durée de vie de la source lumineuse: Cela est particulièrement vrai pour les sources de lumière au mercure qui affichent généralement une réduction progressive de l'énergie d'excitation à 495 nm avant de griller. Cette réduction progressive peut entraîner une perte de sensibilité significative au fil des semaines. Ce problème peut être résolu par la tenue d'un journal. Pour de meilleurs résultats, remplacer les ampoules au mercure de 50 watts toutes les 100 heures et les ampoules au mercure de 100 ou 200 watts toutes les 200 heures. Les sources de lumière au quartz/halogène n'affichent généralement pas de réduction progressive de l'énergie d'excitation avant de griller.
3. Type de filtre d'excitation utilisé: Les filtres d'excitation interférentiels offrent une plus grande sensibilité sur une longueur d'onde beaucoup plus étroite que les filtres d'excitation absorbants. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
4. Alignement correct de l'axe optique du microscope: Pour les instructions, se reporter au manuel du microscope à fluorescence.

5. Ouverture numérique de l'objectif: Grâce à la lumière incidente (Epi), la fluorescence augmente de manière exponentielle à mesure que l'ouverture numérique (ON) de l'objectif augmente. Cela peut conduire un objectif 40X avec une NA de 0,65 à lire une ou plusieurs dilutions inférieures à un objectif 40X avec une ON de 0,85. L'ouverture numérique est indiquée sur le côté de l'objectif. La sensibilité de la microscopie à fluorescence à lumière transmise n'est pas affectée par l'ON.
6. Filtres de suppression: Les filtres de suppression réduisent les longueurs d'onde d'excitation spécifiques et peuvent être utilisés pour réduire la sensibilité. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
7. Précision et exactitude de la technique de dilution, de l'équipement et de la réalisation des procédures de test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

Un grossissement total de 400X est recommandé pour la visualisation des neutrophiles.

Négatifs: Un sérum est considéré comme négatif aux ANCA si, à une dilution à 1:20, la fluorescence verte des cellules est inférieure ou égale à celle observée pour le puits du contrôle négatif. Une fluorescence de fond non spécifique due à des anticorps hétérophiles ou à des auto-anticorps peut être observée dans les neutrophiles.

Positifs: Un sérum est considéré comme positif aux ANCA si, à une dilution à 1:20, les cellules dans chaque champ présentent une fluorescence cytoplasmique granulaire similaire à celle observée avec le contrôle cANCA sur les lames fixées à l'éthanol ou au formol. Sinon, un échantillon de sérum est considéré comme positif aux ANCA si, à une dilution à 1:20, les cellules présentent une fluorescence nucléaire diffuse ou périphérique similaire à celle observée avec le contrôle pANCA sur les lames fixées à l'éthanol.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Test: Les résultats doivent être notés comme étant positifs ou négatifs à la dilution 1:20.

Images fluorescentes: De nombreux auto-anticorps peuvent entraîner une fluorescence du cytoplasme et/ou du noyau des neutrophiles. Il existe deux images principales de fluorescence spécifique:

C-ANCA (fluorescence classique ou cytoplasmique): La fluorescence des granules alpha (primaires) dans le cytoplasme présente une image cytoplasmique mouchetée uniforme, souvent avec une concentration de la fluorescence entre les lobes du noyau. La moucheture cytoplasmique sera observée avec les neutrophiles fixés à l'éthanol ou au formol.

P-ANCA (fluorescence périnucléaire): Fluorescence lisse ou homogène de plusieurs lobes du noyau, souvent marquée par une fluorescence périphérique des lobes nucléaires sur les neutrophiles fixés à l'éthanol. Sur les neutrophiles fixés au formol, ces anticorps présentent une fluorescence cytoplasmique granulaire.

Les auto-anticorps antinucléaires et autres peuvent réagir avec les neutrophiles, tous les échantillons positifs doivent donc être testés pour l'ANA à l'aide d'un substrat de cellules HEp-2 afin de confirmer la présence d'ANCA.

Titrage optionnel: Les résultats doivent être communiqués comme étant l'inverse de dilution du dernier puits dans lequel une réaction positive a été observée.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être réalisé sur la base de la détection des anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques 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-neutrophiles cytoplasmiques. 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 anticorps anti-nucléaires présents dans les échantillons de patient peuvent réagir avec le substrat cellulaire. Si des anticorps anti-nucléaires sont présents, les résultats ANCA peuvent souvent être interprétés en raison du caractère différent de la fluorescence ANCA spécifique, des titres divergents et/ou de l'intensité des réactions. Si la réaction fluorescente des anticorps anti-nucléaires est suffisamment forte pour masquer la fluorescence ANCA, le test doit être rapporté comme étant « non interprétable » et une autre méthode doit être utilisée pour la détermination des ANCA du patient.
4. En raison des nombreuses options disponibles sur les microscopes à fluorescence, il est recommandé que les sources de lumière, les filtres et les optiques soient normalisés lors de la comparaison des titres de patient entre plusieurs laboratoires.
5. Les résultats de ce test doivent être utilisés conjointement aux informations disponibles provenant de l'évaluation clinique et d'autres procédures de diagnostic afin de déterminer l'état clinique du patient.

VALEURS ESCOMPTÉES

La valeur escomptée dans la population saine est négative à une dilution de test de 1:20. Chez les patients présentant une maladie, on a relevé des valeurs de titre élevées, pouvant atteindre 1:640 (7).

PERFORMANCES

ÉCHANTILLONS NORMAUX

Les échantillons de sérum de 497 donneurs de sang (247 hommes et 250 femmes) ont été testés en parallèle à l'aide du kit ANCA d'Immuno Concepts et d'un autre kit disponible sur le marché. Tous les échantillons positifs sur les lames fixées à l'éthanol de cette population ont également été testés pour les anticorps anti-nucléaires (ANA) à l'aide du système de test ANA HEp-2 d'Immuno Concepts.

Parmi les échantillons normaux, 22 étaient positifs à l'ANA et ont été considérés comme non interprétables pour l'ANCA. Les échantillons discordants restants ont été testés pour les anticorps anti-MPO et PR3 à l'aide des tests ELISA afin de déterminer le niveau des anticorps.

SÉRUMS PRÉCÉDEMMENT DÉTERMINÉS COMME POSITIFS À L'ANCA PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

On s'est procuré auprès de laboratoires de référence aux États-Unis, au Royaume-Uni et en Australie des échantillons de sérum jugés positifs à l'ANCA à l'aide de dosages IFA internes. Un total de 383 sérums, dont on suspectait la positivité à l'ANCA, ont été examinés dans le cadre de cette étude. Ces échantillons ont été testés en parallèle à l'aide du kit ANCA d'Immuno Concepts et d'un autre kit disponible sur le marché. Les échantillons discordants ont été testés pour l'ANA à l'aide du système de test ANA HEp-2 d'Immuno Concepts et pour les anticorps anti-MPO et PR3 à l'aide des tests ELISA.

En combinant les résultats de la population saine et de la population malade, nous avons obtenu les données suivantes dans la comparaison initiale du système de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés à l'éthanol (tableau 1):

		Méthode de comparaison	
		Positif	Négatif
Éthanol IC ANCA	Positif	324	94
	Négatif	124	316

Ces données induisent les statistiques de comparaison suivantes:

Sensibilité relative: 72,3%

Spécificité relative: 77,1%

Agrément total: 74,6%

Dans la comparaison initiale du système de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés au formol, nous avons obtenu les données suivantes (tableau 2):

		Méthode de comparaison	
		Positif	Négatif
Formol IC ANCA	Positif	255	52
	Négatif	45	528

Ces données induisent les statistiques de comparaison suivantes:

Sensibilité relative: 85,0%

Spécificité relative: 91,0%

Agrément total: 89,0%

De nombreux auto-anticorps, autres que ceux associés à la vascularite auto-immune, peuvent réagir avec des neutrophiles humains (8). Afin de confirmer que les anticorps détectés par un test ANCA immunofluorescent sont significatifs d'un point de vue clinique, il est fortement conseillé de réaliser des tests de confirmation pour la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3) à l'aide de dosages ELISA (9).

L'ensemble des échantillons discordants des tableaux ci-dessus ont été testés pour les anticorps anti-nucléaires et les anticorps anti-MPO et PR3. Si l'on prend les résultats de ces tests en compte, les résultats globaux pour le système de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés à l'éthanol sont présentés dans le tableau 3:

		Méthode de comparaison	
		Positif	Négatif
Éthanol IC ANCA	Positif	380	32
	Négatif	6	434

Ces données induisent les statistiques de comparaison suivantes:

Sensibilité relative: 98,4%

Spécificité relative: 93,1%

Agrément total: 95,5%

Les résultats globaux pour le système de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés au formol sont présentés dans le tableau 4:

		Méthode de comparaison	
		Positif	Négatif
Formol IC ANCA	Positif	292	13
	Négatif	5	548

Ces données induisent les statistiques de comparaison suivantes:

Sensibilité relative: 98,3%

Spécificité relative: 97,7%

Agrément total: 98,6%

ÉCHANTILLONS DE SÉRUM DE PATIENTS AYANT UNE VASCULARITE CONNUE

Les échantillons de 102 patients souffrant de vascularite caractérisée d'un point de vue clinique ont été testés à l'aide des neutrophiles fixés à l'éthanol et des neutrophiles fixés au formol d'Immuno Concepts. Les résultats de cette comparaison sont présentés dans le tableau 5:

TABLEAU 5

Diagnostic Clinique	Nombre	Positif	Image fluorescente (fixation à l'éthanol)
Granulomatose avec polyangéite	30	26 (86,7%)	tous C-ANCA
Périartérite noueuse	12	8 (66,7%)	tous P-ANCA
Périartérite microscopique	20	18 (90,0%)	tous P-ANCA
Éosinophiles granulomatose avec polyangéite	3	2 (66,7%)	un P-ANCA; un à la fois P-ANCA et C-ANCA
Glomérulonéphrite à croissants épithéliaux du complexe immun	15	10 (66,7%)	tous P-ANCA
Maladie intestinale inflammatoire	22	17 (77,3%)	tous P-ANCA atypiques

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Les échantillons de sérum de 57 patients souffrant de divers troubles auto-immuns ont été testés sur le système de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés à l'éthanol et sur le système de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés au formol. Trois de ces échantillons ont présenté une fluorescence nucléaire atypique, qui ressemblait à l'aspect pANCA, sur les neutrophiles fixés à l'éthanol. L'ensemble de ces trois échantillons provenait de patients atteints de LED, étaient positifs aux anticorps anti-ADN et ANA avec un aspect homogène. Un échantillon supplémentaire présentait une moucheture cytoplasmique sur les neutrophiles fixés à l'éthanol mais était négatif sur les neutrophiles fixés au formol et sur le test ANA. Cet échantillon a été jugé comme n'étant pas une réaction spécifique. Tous les autres sérums de cette population étaient négatifs sur les neutrophiles fixés à la fois à l'éthanol et au formol. Étant donné que beaucoup d'auto-anticorps peuvent réagir de manière non spécifique avec les neutrophiles humains (8), les tests positifs par immunofluorescence doivent systématiquement être confirmés à l'aide de dosages spécifiques pour les anticorps associés aux ANCA.

REPRODUCTIBILITÉ

Des études intra-analyse, d'un jour sur l'autre et inter-lot ont été menées pour démontrer la reproductibilité des systèmes de test ANCA d'Immuno Concepts avec neutrophiles humains fixés à l'éthanol et neutrophiles humains fixés au formol. Les sérums utilisés dans cette étude comprenaient trois échantillons positifs pANCA (respectivement à forte fluorescence, fluorescence modérée et faible fluorescence) et trois échantillons positifs

cANCA (présentant respectivement une fluorescence forte, modérée ou faible). Six échantillons négatifs à l'ANCA étaient également utilisés. Dans l'étude intra-analyse, ces 12 sérums ont été testés en double sur six puits chacun. Pour la reproductibilité d'un jour sur l'autre et inter-lot, ces 12 sérums ont été chacun traités sur trois numéros de lot de kits à trois occasions différentes. Les six échantillons négatifs se sont révélés négatifs sur toutes les lames testées et les échantillons positifs étaient positifs, avec des intensités de fluorescence uniformes, sur toutes les lames testées.

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. Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
7. 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.
8. Stroncek, D.F., 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.
9. Proceedings of the ANCA & Vasculitis Symposium, Satellite Conference to the XIV International Congress of Nephrology, 30 May - 1 June 1997, Melbourne, Australia.

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



Constructeur



Représentant autorisé dans le Communauté européen



Limitation de la Température



Contient suffisamment pour <n> essais



Consultez les instructions pour l'usage



Dispositif Médical Diagnostique In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



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
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 10070-11-I,

4.11.02.003.103-Fr

Rev 3.1 © Copyright 2020

PROCÉDURE DE TEST ANCA

REMARQUE: Si le laboratoire utilise un système d'échantillonnage automatisé, il est recommandé de suivre la procédure et les recommandations du fabricant. Les dilutions, le volume des échantillons déposés sur les lames et les temps d'incubation sont les suivants.

- 1. RECONSTITUTION DU TAMPON (PBS)**
Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Couvrir et conserver entre 2 et 25°C pendant 4 semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent.
 - 2. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS**
Test: Diluer les échantillons des patients à 1:20 en ajoutant 0,05 ml (50 µl) de sérum à 0,95 ml (950 µl) de diluant pour échantillon.
Titration semi-quantitative: Pour procéder à des dilutions doubles successives des échantillons de dépistage (ex.: 1:40, 1:80, 1:160...1:640), retirer 0,5 ml de la dilution à 1:20 et la mélanger à 0,5 ml de diluant pour échantillon afin d'obtenir une dilution à 1:40 puis poursuivre de la même manière.
 - 3. DILUTION DU CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL**
Traiter le contrôle titrable optionnel comme un échantillon de patient non dilué. Diluer le contrôle à 1:20 en ajoutant 0,05 ml (50 µl) de sérum de contrôle à 0,95 ml de diluant pour échantillon. Procéder aux dilutions doubles successives du contrôle titrable comme décrit ci-dessus.
 - 4. PRÉPARATION DES LAMES DE SUBSTRAT (20-25 µl/puits)**
Sortir les lames des sachets et placer les sérums de contrôle sur les puits de contrôle comme suit: Retourner le flacon compte-gouttes du contrôle et le presser légèrement jusqu'à ce qu'une goutte apparaisse à l'extrémité de l'embout. Mettre soigneusement la goutte en contact avec le puits de contrôle approprié en évitant tout contact direct de l'embout du compte-gouttes avec la surface de la lame. Ajouter 1 goutte (20-25 µl) d'échantillon du patient dilué dans les puits numérotés.
ATTENTION: LE CONTACT DIRECT DE L'EMBOÛT DU COMPTE-GOUTTES AVEC LA SURFACE DE LA LAME PEUT ALTÉRER LE SUBSTRAT ANTIGÉNIQUE.
 - 5. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Placer les lames dans une chambre humide couverte (une boîte de Pétri avec des serviettes en papier humidifiées conviendra). Mettre à incuber, couvercle fermé, pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-25°C).
 - 6. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau de l'incubateur et les rincer rapidement avec le tampon PBS à l'aide d'un flacon gicleur ou d'une pipette Pasteur ou sérologique. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
REMARQUE: Afin d'éviter toute contamination croisée sur les lames à 10 puits, diriger le jet du tampon PBS le long de la ligne médiane de la lame, en l'inclinant d'abord vers les puits 1 à 3 puis vers les puits 4 à 6.
 - 7. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Ce lavage peut être prolongé jusqu'à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés. Jeter la solution de lavage PBS après utilisation.
 - 8. RÉACTIF IMMUNOFLOUORESCENT (couvrir les puits avec 10 à 12 gouttes)**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau. Remettre immédiatement la lame dans la chambre d'incubation et recouvrir complètement les puits de réactif immunofluorescent. Commencer par placer une goutte sur chaque puits. Recommencer l'opération pour chaque lame. Le réactif immunofluorescent a été titré de façon à compenser l'eau désionisée ou distillée résiduelle restant sur la lame après le rinçage.
REMARQUE: Il est important que les puits de la lame ne se dessèchent pas pendant cette procédure sous peine d'altérer le substrat.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIR DE RÉACTIF IMMUNOFLOUORESCENT PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
 - 9. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Placer le couvercle sur la chambre d'incubation puis, si la chambre n'est pas opaque, la couvrir d'une serviette en papier pour l'abriter de la lumière. Laisser la ou les lames incuber pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-25°C).
 - 10. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau d'incubation et les rincer rapidement avec du PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
 - 11. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Ce lavage peut être prolongé jusqu'à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés.
 - 12. MONTAGE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée (Optionnel). Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIR DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
Ajouter 4 à 5 gouttes de milieu de montage semi-permanent sur la ligne médiane de chaque lame. Mettre soigneusement la lamelle couvre-objet en place en évitant la formation de bulles d'air; pour cela, abaisser doucement la lamelle d'un côté de la lame vers l'autre.
REMARQUE: Un excès de milieu de montage sur la lame peut entraîner une forte fluorescence de fond en raison de l'accumulation de lumière ou d'un manque de résolution nette des cellules (image floue). Afin d'éliminer l'excès de milieu de montage sur la lame, essuyer soigneusement la lamelle couvre-objet avec du papier absorbant ou un nettoyant optique tout en évitant de déplacer la lamelle.
- POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE:** +1-916-363-2649
ou messagerie électronique : technicalsupport@immunoconcepts.com