



# Screen ANCA ELISA

IVD

## ENCART DU PRODUIT

REF 38083 ANCA Screen ELISA 96 Tests

Menarini™ anti-MPO est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection des anticorps de la myéloperoxidase (MPO) et de la protéinase 3 (PR3) dans le sérum humain.

### GENERALITES

La présence d'anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) chez des patients présentant des angéites a été observée pour la première fois par Davies en 1982<sup>1</sup>. Les ANCA sont un groupe d'anticorps dirigés contre les protéines des granules de neutrophiles et des lysosomes positifs à la peroxydase des monocytes de la circulation périphérique. Ces anticorps peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte sur des neutrophiles fixés à l'éthanol en produisant une conformation de coloration périnucléaire caractéristique<sup>2,3</sup>. Les p-ANCA se retrouvent dans les cas d'angéites, de néphrites glomérulaires, de syndrome de Churg-Strauss, de polyartérite noueuse, de lupus érythémateux endémique et d'arthrite rhumatoïde<sup>4,5</sup>. L'antigène majeur des p-ANCA est la myéloperoxidase (MPO), qui constitue un puissant système microbicide parmi les granulocytes neutrophiliaires. D'autres antigènes cibles tels que le leucocyte humain élastase et la lactoferrine ont également été associés à une conformation de fluorescence p-ANCA<sup>6,7</sup>. Les anticorps aux MPO peuvent également être induits par des drogues telles l'hydralazine, la clozapine, et le L-tryptophane<sup>8</sup>. L'exposition occasionnelle à certains facteurs environnementaux tels que la poussière de silice peut provoquer une néphrite glomérulaire progressive anti-MPO<sup>8</sup>. La mesure de ces anticorps ANCA spécifiques aux MPO est une aide précieuse pour la recherche clinique dans l'évaluation des sous-types cliniques des diverses angéites.

Les c-ANCA sont dirigés contre plusieurs protéines telles la cathepsine G, l'élastase et la protéinase 3 (PR3). La PR3 est une protéinase sérine neutre qui se trouve dans les granules azurophiles des neutrophiles<sup>9</sup>. Les anticorps des PR3 constituent un marqueur pour la maladie de Wegener (WG)<sup>10</sup>, une angéite nécrosante endémique qui se présente sous 2 formes, étendue ou limitée<sup>10</sup>. La WG étendue est caractérisée par une inflammation granuleuse de l'appareil respiratoire et par une néphrite glomérulaire en croissant avec une réactivité aux c-ANCA chez 90% des patients<sup>11,12</sup>. La WG limitée est caractérisée par l'absence de complications rénales, et la réactivité aux c-ANCA est détectée chez 67% des patients. Le développement de la maladie peut se dérouler à n'importe quel âge et les hommes sont deux fois plus atteints que les femmes. Plusieurs études ont démontré une corrélation directe entre les anticorps PR3 et la phase active de la WG. La concentration en PR3 du sérum s'élève dramatiquement pendant les périodes de crise de la maladie (fréquence 90%), et les rechutes sont généralement accompagnées d'une augmentation significative des titres<sup>13,14</sup>. La présence des C-ANCA est également indicative d'autres désordres tels que la néphrite glomérulaire nécrosante immunitaire et les dérangements inflammatoires de l'intestin comme la colite ulcéreuse<sup>15,16</sup>. Menarini™ Screen ANCA offre une méthode facile de test de sérums patients pour la recherche des ANCA avant d'identifier les échantillons positifs aux c- ou p-ANCA avec le Menarini™ anti-PR3 et anti-MPO ELISA.

### PRINCIPES DE LA METHODE

Les antigènes MPO et PR3 recombinants sont fixés sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont immédiatement bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque anticorps MPO ou PR3 présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaines est alors ajouté dans chaque puit pour révéler les anticorps du patient. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe IgG. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps anti-MPO et anti-PR3 sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU/ml).



## INFORMATION PRODUIT

### Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler**. Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser. Le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes. Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1 L. Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

### Précautions

Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>17</sup>.

**ATTENTION** - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

### Matériel fourni









Menarini™ ANCA Screen ELISA **REF** 38083

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	<b>MICROPLATE ANCA</b>	<b>Micro-lamelle</b> avec micropuits individuels, revêtus d'antigène ANCA.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR ANCA</b> *	<b>Etalon</b> ( <i>couvercle vert</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ANCA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + ANCA</b> *	<b>Contrôle positif</b> ( <i>couvercle rouge</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ANCA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Contrôle négatif</b> ( <i>couvercle blanc</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines</b> . Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant pour sérum</b> prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat enzymatique</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF WASH</b>	<b>Tampon de lavage</b> en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>

**Symboles utilisés sur les étiquettes:**

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

**Matériel nécessaire mais non fourni**

- Eau déionisée ou distillée
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Timer
- Papier absorbant
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 300 µl

**Autres tests ANCA ELISA disponibles auprès de A. Menarini Diagnostics S.r.l. :**

Menarini™ Test Anticorps anti-myéloperoxydase (MPO)  37981

Menarini™ Test Anticorps anti-protéinase 3 (PR3)  37980

**PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

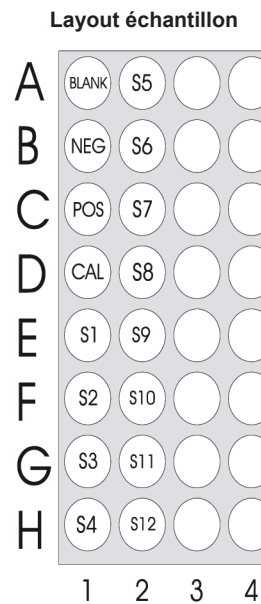
**METHODE****Préparation du test**

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage à l'aide d'une large bouteille sur toute la superficie de la micro-lamelle. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**

- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence.
- Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité. Replacer immédiatement le récipient au réfrigérateur.

### Exécution du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante.
2. Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.



3. Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
4. Prendre les micropuits nécessaires, remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient scellé et le replacer au réfrigérateur. Placer les micropuits en sécurité sur le support fourni.
5. Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.  
**Note** : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle. L'absorbance de ce micropuit ne devra pas dépasser 0.3.
6. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
7. Laver **4 x** avec le tampon de lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter le tampon reconstitué dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. En cas d'utilisation de bacs de lavage automatiques, programmer l'appareil comme indiqué sur la notice d'utilisation.
8. Ajouter **100 µl** de conjugué dans chaque puit.
9. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.



10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Ajouter **100 µl** de substrat enzymatique dans chaque puit dans le même ordre et le même timing que le conjugué.
12. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
13. Ajouter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à **405nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double 405/630 nm en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

### Contrôle qualité

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif.

### RESULTATS

#### Calcul des résultats

la méthode suivante doit être utilisée pour déterminer si l'échantillon est positif ou négatif aux ANCA :

#### D.O. Echantillon

$$\text{-----} \times \text{EU/ml étalon} = \text{EU/ml Echantillon}$$

#### D.O. Etalon

### Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Les valeurs décrites ci-dessous ont été déterminées en testant 62 échantillons de sang de donneurs et représentent la moyenne avec déviation standard de 3. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeurs ANCA	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif(-)
20 – 25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif (+)

### LIMITES D'UTILISATION

Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic à part entière. Chaque test indéterminé doit être réalisé à nouveau pour confirmer le résultat. Il est également recommandé que les patients avec des résultats indéterminés soient retestés à intervalles réguliers. Une thérapie immunosuppressive, un début ou une modification de traitement ne doivent pas être décidés sur la base d'une recherche anticorps ANCA positive mais confrontés attentivement aux observations cliniques.

### VALEURS PREVUES

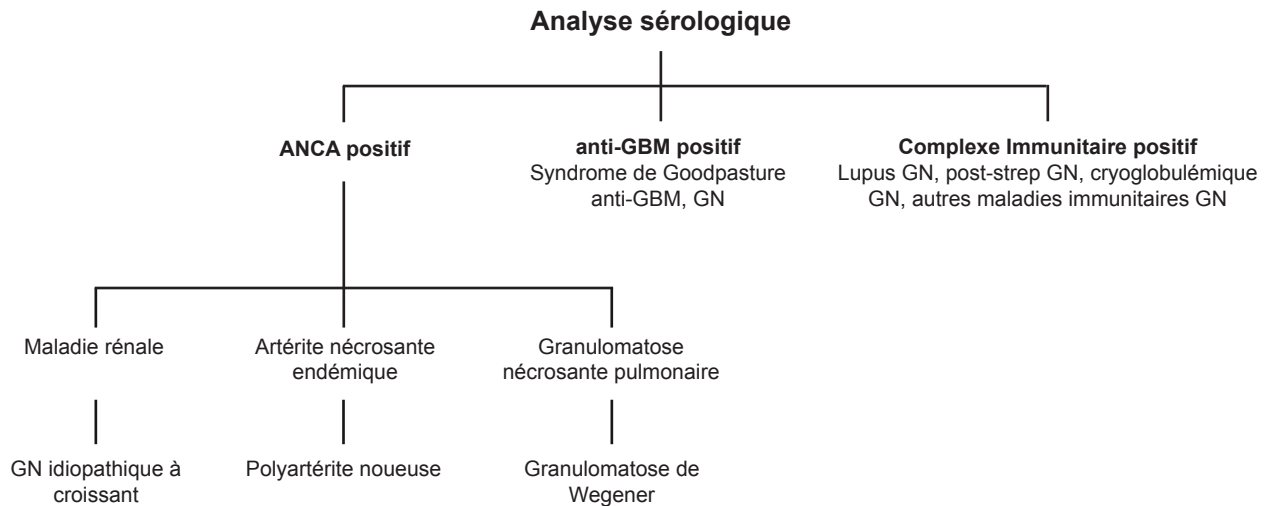
Les valeurs d'une population normale sont négatives. Cependant, 4% des individus apparemment en bonne santé et asymptomatiques peuvent se révéler positifs lors de la recherche des anticorps ANCA. Des études récentes ont montré que des patients, diagnostiqués pour l'arthrite rhumatoïde, la polyartérite chronique, diverses maladies indifférenciées du tissu conjonctif et pour le SLE présentent des anticorps anti-MPO<sup>5</sup>. Certains patients avec WG active peuvent avoir des anticorps anti-PR3 indétectables.

Le tableau suivant présente la fréquence des ANCA spécifiques PR3 et MPO dans les sérums de 112 patients présentant des angéites<sup>18</sup>.



	<b>Granulomatose de Wegener</b>	<b>Polyongitis Microscopique</b>	<b>Syndrome de Churg-Strauss</b>
<b>ANCA positif par IFA</b>	78%	59%	67%
<b>positif anti-PR3</b>	90%	0%	10%
<b>positif anti-MPO</b>	0%	62%	17%
<b>positif spécificité non connue</b>	40%	31%	73%

La présence des ANCA permet de distinguer certaines maladies caractéristiques d'autres conditions de néphrite glomérulaire, comme illustré ci-dessous<sup>12</sup> :



## PERFORMANCES

### Précision:

Deux sérums positifs aux ANCA ont été testés avec Menarini™ Screen ANCA ELISA pour déterminer la variabilité inter et intra-test. Les résultats sont les suivants:

	<b>inter-essai</b>	<b>intra-essai</b>
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
<b>Echantillon 1</b>	3,6	8,1
<b>Echantillon 2</b>	4,0	3,7

### Récupération

Trois échantillons avec des concentrations connues d'anticorps ANCA ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues. Les niveaux d'anticorps ANCA des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir de ces valeurs, le pourcentage de récupération calculé. Les résultats sont les suivants :

	<b>ANCA conc. ajouté (EU/ml)</b>	<b>ANCA conc. obtenu (EU/ml)</b>	<b>% Récupération</b>
<b>Echantillon 1</b>	135,9	132,5	97,5
<b>Echantillon 2</b>	110,9	114,4	103,2
<b>Echantillon 3</b>	65,7	71,5	108,8

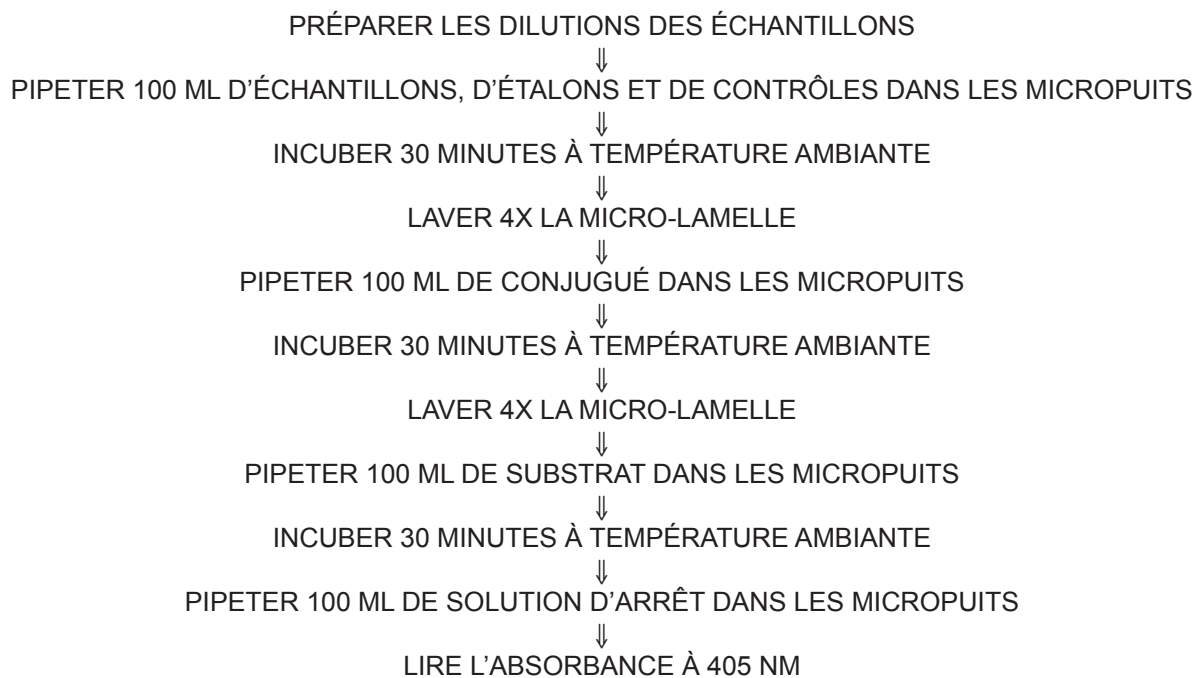
Les résultats obtenus avec Menarini™ Screen ANCA ELISA ont été comparés avec ceux obtenus par les tests Menarini™ anti-MPO et anti-PR3 ELISA. Les résultats sont les suivants:



		Menarini™ ANCA Screen		
		Positif	Négatif	Total
Menarini™ Anti-MPO & PR3	Positif	64	3	67
	Négatif	0	4	4
	Total	64	7	71

Concordance : 95.8%  
 Sensibilité relative: 95.5%  
 Spécificité relative: 100%

### PROCÉDURE MENARINI™ EN BREF





 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**  
via Sette Santi 3  
50131 Firenze  
Italia

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argypopolis  
Attiki

**AT**

**ÖSTERREICH**  
Vertrieb durch  
A. Menarini Ges.m.b.H  
Pottendorfer Straße, 25/27  
A - 1120 Wien

**BE**

**BELGIQUE**  
Distribué par  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4  
1930 Zaventem

**PT**

**PORTUGAL**  
Distribuido por  
A. Menarini Diagnósticos, Lda  
Quinta da Fonte  
Edifício D.Manuel I, 2ºB  
2770-203 Paço de Arcos

**NL**

**NEDERLAND**  
Distributed by  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux N.V.  
De Haak, 8  
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007  
Data de publicação: Março de 2007  
Ausgabedatum: März 2007  
Date d'émission : Mars 2007  
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4160 CE M

