


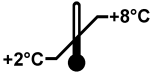




<b>REF</b> 41429 	<b>ZENIT RA PR3</b>	Distribué par 
<b>INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION</b>	   50	

## INDICATION

Le test *ZENIT RA PR3* est un test immunologique chimioluminescent (CLIA) pour la détermination quantitative, avec l'appareil *ZENIT RA Analyser*, des anticorps spécifiques de classe IgG dirigés contre la protéinase 3 (PR3) dans des échantillons de sérum ou plasma humain (EDTA, Héparine).

Ce dosage est utilisé comme auxiliaire de diagnostic dans l'évaluation des vasculites primitives systémiques associées aux ANCA, en particulier de la granulomatose de Wegener (GW).

ATTENTION: Toute décision médicale ne peut être basée sur le résultat de ce seul test, mais doit être fondée sur l'évaluation de l'ensemble des données cliniques et de laboratoire disponibles.

## SIGNIFICATION CLINIQUE

Les anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA) sont des auto-anticorps dirigés contre les antigènes contenus dans le cytoplasme des granulocytes et des monocytes <sup>(1)</sup>. Les ANCA sont un marqueur sérologique de certaines vasculites nécrosantes des vaisseaux de petit (moyen) calibre, en particulier la granulomatose de Wegener (GW), la polyangiite microscopique (PAM), la glomérulonéphrite nécrosante extra capillaire pauci-immune (GNNEP, une forme de PAM limitée au rein) et, dans une moindre mesure, le syndrome de Churg-Strauss (SCS), souvent définies collectivement " vasculiti-ANCA-associate " (VAA) (Vasculite associée aux ANCA) <sup>(2)</sup>.

De nombreuses preuves, tant cliniques qu'expérimentales, suggèrent de plus un rôle pathogénique des ANCA dans les VAA, en particulier pour les ANCA-MPO <sup>(3)</sup>.

Par la méthode standard d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur neutrophiles humains normaux fixés avec de l'éthanol absolu, on peut reconnaître deux cadres fluoroscopiques principaux: C-ANCA et P-ANCA. Moins souvent, on peut détecter deux autres pattern fluoroscopiques, C-ANCA atypique et ANCA-At, généralement non associés à la présence d'une vasculite idiopathique <sup>(4)</sup>.

Chez les patients affectés de VAA, les principales cibles antigéniques des ANCA sont la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR 3) <sup>(5,6)</sup>.

La MPO est une enzyme avec d'importantes propriétés bactéricides, qui exerce à travers la catalyse de réactions de peroxydation la formation de produits toxiques tels que HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et radicaux de l'oxygène. De plus, l'acide hypochlorique et ses métabolites peuvent inactiver les inhibiteurs des protéases et donc jouer un rôle dans la dégradation des tissus et dans le maintien d'un microenvironnement " inflammatoire " <sup>(3)</sup>.

La MPO représente environ 5% du contenu protéique totale des neutrophiles; c'est une molécule fortement cationique constituée d'un éther dimère de P.M. ~ 140 kDa.

La PR3 est une sérine-protéase faiblement cationique contenue dans les granules primaires (ou azurophiles) de granulocytes et monocytes, constituée de 228 acides aminés et avec un P.M. 29-31 kDa, dotée d'activité anti-microbienne envers les bactéries et les champignons. La plus grande partie de ses fonctions biologiques dépend de l'activité protéolytique. Dans un contexte inflammatoire, elle est relâchée à l'extérieur de la cellule, avec les autres constituants des granules et radicaux de l'oxygène, où elle peut dégrader le collagène, les protéoglycanes et autres constituants du tissu conjonctif. Une activité protéolytique excessive, prolongée ou inappropriée est cependant cause de dommages à l'organisme <sup>(3)</sup>. Les ANCA-PR3 interfèrent avec l'inhibition enzymatique de la PR3 de la part de son inhibiteur physiologique  $\alpha$ 1-antitrypsine.

Le pattern C-ANCA, dans la plus grande partie des cas, est dû à la présence d'anticorps spécifiques pour la PR3, tandis qu'un cadre P-ANCA peut être causé par des anticorps dirigés contre de nombreuses protéines parmi lesquelles la MPO est la plus fréquente. Jusqu'à présent, les ANCA dirigés contre les autres composants cytoplasmiques, autres que la MPO et PR3, n'ont pas une signification clinique claire et ne sont donc pas utiles dans le diagnostic de laboratoire des VAA <sup>(7,8)</sup>.

Suite à la publication des résultats de l'étude multicentrique pour la standardisation des méthodes pour la détermination des ANCA <sup>(9)</sup>, ont été rédigés les Lignes de Conduite pour l'exécution correcte et le rapport des tests ANCA chez les patients avec vasculite soupçonnée, auquel on renvoie pour un approfondissement <sup>(4,10,11)</sup>. De ce qui est clairement apparu dans l'étude ci-dessus, dont les résultats ont été par la suite largement confirmés, la détermination correcte des ANCA peut se targuer de l'exécution combinée de la méthode IFI et de l'identification de la spécificité antigénique reconnue, à travers des systèmes spécifiques aux antigènes pour les deux antigènes principaux MPO et PR3 (méthodes ELISA, FEIA, CLIA) <sup>(12,13)</sup>.

L'exécution combinée des deux méthodes permet d'obtenir une spécificité > 98% également envers les pathologies de contrôle, beaucoup plus importantes que celles obtenues avec les tests utilisés singulièrement.

Les titres des ANCA sont liés, bien qu'avec quelques exceptions, à l'activité de la maladie, nous recommandons donc pour le suivi des patients l'utilisation de méthodes quantitatives pour le dosage de ANCA-MPO ou ANCA-PR3 <sup>(14)</sup>.

La spécificité des ANCA (MPO ou PR3) ne permet pas de différencier les différentes VAA (GW, PAM, GNNEP, SCS), cependant la présence de P-ANCA/MPO-ANCA est plus suggestive pour un diagnostic de PAM ou de GNNEP, tandis qu'une positivité C-ANCA/PR3-ANCA est plus fréquemment associée à la GW.

Dans la GW et dans la PAM (y compris la forme limitée au rein) en phase active la prévalence des ANCA est de 70-90%, dans la SCS, les ANCA sont par contre présents uniquement chez  $\approx$  40% des patients, avec la MPO comme spécificité antigénique prévalente.

En relation à l'utilité diagnostique de la donnée de laboratoire, il faut se rappeler que les valeurs de prédiction positive et négative (VPP, VPN) dépendent, en plus de la sensibilité et de la spécificité du test, de la prévalence de la maladie dans la population enquêtée. Une demande appropriée (probabilité élevée pré-test) permet d'obtenir un résultat de réelle utilité clinique et réduit significativement la possibilité de résultats faussement positifs <sup>(15)</sup>.

La recherche des ANCA devrait donc être effectuée en présence d'une suspicion clinique fondée et un résultat positif, en soi non suffisant pour le diagnostic de VAA, doit être évalué à la lumière du cadre clinique et histologique.

Dans la littérature ont été signalées occasionnellement des positivités ANCA dans des pathologies différentes pour les vasculites associées aux ANCA, bien que non confirmées à travers démonstration de la spécificité antigénique pour MPO ou PR3.

Nombreuses sont les pathologies à considérer dans le diagnostic différentiel, parmi celles-ci il faut rappeler, également pour leur fréquence élevée, les pathologies infectieuses et en particulier l'endocardite bactérienne subaiguë. Malgré que le VPN d'un résultat négatif soit en général élevé, ceci n'exclut pas complètement la possibilité d'une VAA, surtout chez des patients avec une forte évidence clinique de vasculite primitive systémique <sup>(16)</sup>.

## PRINCIPE DE LA METHODE

---

Le kit *ZENIT RA PR3* pour la détermination quantitative des IgG spécifiques anti-PR3 utilise une méthode immunologique indirecte à deux étapes basée sur le principe de la chimioluminescence.

L'antigène spécifique est utilisé pour revêtir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps anti-IgG humaines est marqué avec un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué).

Durant la première incubation, les anticorps spécifiques se trouvant dans l'échantillon, dans les calibrateurs ou dans les contrôles se lient à la phase solide.

Durant la deuxième incubation le conjugué réagit avec les anticorps anti-PR3 IgG séquestrés par la phase solide.

Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est enlevé à travers aspiration et lavage successif.

La quantité de conjugué marqué restant lié à la phase solide est évaluée à travers l'activation de la réaction de chimioluminescence et mesure du signal lumineux. Le signal généré, exprimé en unités relatives de lumière (RLU, Relative Light Unit), est indicatif de la concentration des anticorps spécifiques dans l'échantillon, les calibrateurs et les contrôles.

## AUTOMATISATION

---

L'appareil *ZENIT RA Analyser* réalise en automatique toutes les opérations prévues par le protocole de dosage: ajout dans le récipient de réaction des échantillons, calibrateurs, contrôles, particules magnétiques, conjugué et solutions d'activation de la chimioluminescence; séparation magnétique et lavage des particules ; mesure de la lumière émise.

Le système calcule les résultats du dosage pour les échantillons et les contrôles à travers une courbe de calibration mémorisée et imprime un rapport qui inclut toutes les informations relatives au dosage et au patient.

## MATERIELS ET REACTIFS

Matériels et réactifs fournis

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Particules magnétiques revêtues avec l'antigène PR3 (protéinase 3) dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes, un tensioactif, du Pro-Clin 300 et de l'azide de sodium (< 0.1 %) comme conservateurs.

REAG	2	CONJ	15 mL
------	---	------	-------

Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG humaines marqué par un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué), dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes et de l'azide de sodium (< 0.1 %) comme conservateur.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Solution de Dilution Echantillons: Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO<sub>4</sub> comme conservateurs.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Sérum humain à faible concentration en anticorps anti-PR3 IgG dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO<sub>4</sub> comme conservateurs.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Sérum humain à forte concentration en anticorps anti-PR3 IgG dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO<sub>4</sub> comme conservateurs

Tous les réactifs sont prêts à l'usage.

Les réactifs 1, 2 et 3 sont assemblés en un seul ensemble qui constitue la cartouche réactifs.

Les concentrations des Calibrateurs sont exprimées en UA/mL (Unités Arbitraires) et tarées par rapport à un standard de référence interne. Les valeurs des concentrations, spécifiques par lot de produit, sont enregistrées dans le DATA DISK inséré dans le kit.

DATA DISK
-----------

Mini-DVD contenant les informations concernant tous les produits de la ligne ZENIT RA (Réactifs, Calibrateurs, Sérums de contrôle) mises à jour au dernier lot de production à l'exclusion des produits périmés à la date de compilation du nouveau DATA DISK.

Il suffit de conserver le DATA DISK avec le numéro de lot le plus élevé pour maintenir à jour les informations nécessaires pour le fonctionnement correct du système.

Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis dans le kit

- |  |                 |
|--|-----------------|
| - Appareil ZENIT RA  | Code. No. 41400 |
| - Cube Cuvette ZENIT RA *<br>Emballage de 960 cuvettes.  | Code No. 41402  |
| - Liquide Système ZENIT RA *<br>1 bouteille de 0.5 litre de solution 10x.  | Code No. 41409  |
| - Solution de Lavage ZENIT RA *<br>1 bouteille de 0.5 litre de solution 20x.   | Code No. 41407  |
| - Set Trigger ZENIT RA *<br>1 flacon de 250 mL de Trigger A (solution de préactivation)<br>1 flacon de 250 mL de Trigger B (solution d'activation) | Code No. 41403  |
| - Solution D-SORB ZENIT RA<br>Emballage de 2 bouteilles de 1 litre de solution prête à l'usage.  | Code No. 41436  |
| - Système Vérification Cartouche ZENIT RA *  | Code No. 41401  |
| - Top Cap Set ZENIT RA<br>300 bouchons supérieurs pour la fermeture des récipients des calibrateurs après la première utilisation.                 | Code No. 41566  |

(\*) L'appareil ZENIT RA Analyzer et les accessoires identifiés par l'astérisque sont fabriqués par Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgique et distribués par A. Menarini

Diagnostics Srl.

Autres Réactifs recommandés

SET DE CONTROLE ANCA/GBM ZENIT RA

Code No. 41449

3 flacons de 1.5 mL de sérum humain négatif et 3 flacons de 1.5 mL de sérum humain positif pour anticorps anti-PR3.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

---

Les réactifs fournis dans le kit *ZENIT RA PR3* sont exclusivement pour usage diagnostique *in vitro* et non pour usage *in vivo* chez l'homme ou les animaux.

Ce produit doit être utilisé par des utilisateurs professionnels en respectant strictement les instructions reportées dans ce document.

La société Menarini ne peut être tenue responsable de pertes ou dommages dus à une utilisation non conforme aux instructions fournies.

Précautions de sécurité

Ce produit contient du matériel d'origine animale et doit donc être manipulé comme s'il contenait des agents infectieux.

Ce produit contient du matériel d'origine humaine.

Toutes les unités de sérum ou de plasma utilisées pour la fabrication des composants du Set de Contrôle ont été analysées par des méthodes approuvées par la FDA et ont résulté non réactives à la présence de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 et anti-HIV2.

Cependant, vu qu'aucune méthode d'analyse n'est capable de garantir l'absence d'agents pathogènes, tout le matériel d'origine humaine doit être considéré potentiellement infectieux et manipulé comme tel.

En cas d'emballage endommagé avec déversement des réactifs, effectuer la décontamination de la zone intéressée avec une solution diluée d'Hypochlorite de Soude après s'être protégé avec des dispositifs de protection individuelle (tablier, gants, yeux).

Effectuer l'élimination du matériel utilisé pour le nettoyage et des déchets d'emballage impliqués dans le déversement sur base des normes nationales pour l'élimination des déchets potentiellement infectés.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Etant donné que l'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton plombé en formant des azides explosifs dans les canalisations, il est recommandé de ne pas éliminer les réactifs ou les déchets dans les égouts mais de suivre les normes nationales en matière d'élimination des déchets potentiellement dangereux

### Précautions opérationnelles

Pour obtenir des résultats fiables, il faut s'en tenir étroitement à ces Instructions pour l'utilisation et suivre scrupuleusement ce qui est indiqué dans le manuel opérationnel de l'appareil.

Les réactifs fournis dans le kit doivent être utilisés exclusivement avec le système *ZENIT RA Analyzer*.

Les composants de la cartouche réactifs ne peuvent être enlevés de la cartouche et réassemblés.

Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.

## PREPARATION DES REACTIFS

---

Les réactifs fournis dans le kit sont prêts à l'usage.

## CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

---

Conserver les réactifs fournis dans le kit entre 2-8 °C en position verticale et à l'obscurité.

Dans ces conditions, la cartouche réactifs et les calibrateurs non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption.

Après ouverture, la cartouche réactifs peut être utilisée pendant 60 jours si conservée au frigo entre 2-8 °C ou bien dans la machine.

Après ouverture, les calibrateurs peuvent être utilisés pendant 60 jours si conservés au frigo entre 2-8 °C ou bien si la permanence dans la machine ne dépasse pas les 6 heures par séance.

Ne pas congeler les réactifs et les calibrateurs.

## PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

---

Le dosage doit être effectué sur des échantillons humains de sérum et plasma (EDTA - Héparine).

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés et troubles est déconseillée.

Si le dosage est effectué après plus de 8 heures du prélèvement, séparer le sérum du coagulat ou le plasma des globules rouges en le transférant des éprouvettes primaires de séparation avec gel dans les éprouvettes secondaires sans additifs.

Avant d'être analysés, les échantillons peuvent être conservés au frigo entre 2-8 °C pendant maximum 7 jours.

Si le dosage est réalisé après plus de 7 jours, conserver les échantillons congelés (< - 20 °C).

Eviter les congélations et décongélations répétées.

---

## PROCEDURE

---

Pour obtenir des prestations analytiques fiables, s'en tenir scrupuleusement aux instructions reportées dans le manuel opérationnel de cet appareil.

### Chargement des réactifs

Tous les réactifs fournis dans le kit sont prêts à l'usage.

Avant d'insérer la cartouche réactifs dans le système, le récipient des particules magnétiques doit être agité par rotation horizontalement de façon à favoriser la remise en suspension des particules. Réaliser l'opération en évitant la formation de mousse.

Placer la cartouche réactifs dans la zone réactifs de l'appareil en utilisant la glissière prévue et laisser en agitation pendant au moins 30 minutes avant l'utilisation.

Le positionnement de la cartouche réactifs détermine en même temps la lecture du code à barres d'identification. Si l'étiquette de la cartouche est endommagée ou en cas de non lecture, les données d'identification peuvent être insérées manuellement.

L'appareil maintient automatiquement en agitation continue les particules magnétiques.

Si la cartouche réactifs est enlevée de l'appareil, la conserver verticalement, à l'obscurité et entre 2-8 °C.

### Chargement des calibrateurs et des contrôles

Les calibrateurs et les contrôles ZENIT RA sont prêts à l'usage. Laisser les calibrateurs et les contrôles à température ambiante pendant 10 minutes. Agiter délicatement le contenu, manuellement ou au moyen du vortex, en évitant la formation de mousse. Ne pas retourner le récipient et ne pas enlever le bouchon perforateur de fermeture (bouchons jaunes pour les calibrateurs et bouchons verts ou bleus pour les contrôles).

Au cas où l'on utilise les calibrateurs ou les contrôles pour la première fois, enfoncer le bouchon perforateur à fond vers le bas. Par cette opération, la membrane qui scelle le récipient sera perforée en rendant possible le prélèvement du liquide qui y est contenu. L'abaissement du bouchon perforateur est signalé par la couverture simultanée de la bande de couleur rouge se trouvant sur le côté supérieur de l'étiquette. (Voir Fig. 1 – Récipient scellé et Récipient perforé).

Au cas où les calibrateurs ou les contrôles ont déjà été utilisés auparavant, le récipient sera équipé du bouchon supérieur de fermeture (bouchon blanc) et la bande rouge de l'étiquette sera couverte.

On ne peut charger sur l'appareil qu'exclusivement les récipients sans bouchon supérieur et avec la bande rouge couverte (Voir Fig. 1 – Récipient perforé).

Insérer dans l'appareil les calibrateurs ou les contrôles dans la zone échantillons après lecture du code à barres. Les données du code à barres peuvent aussi être insérées manuellement en cas d'étiquette endommagée ou en cas de non lecture.

Les valeurs de la concentration des anticorps IgG anti-PR3 se trouvant dans les calibrateurs ou dans les

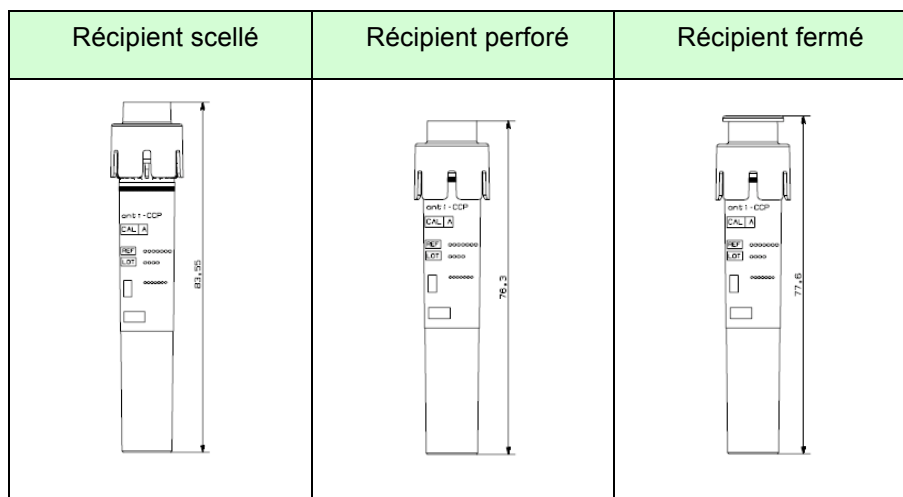


contrôles sont enregistrées dans le DATA DISK et automatiquement transférées à l'analyseur. En cas d'absence de transfert des données, on peut les insérer manuellement.

A la fin de la séance, les récipients des calibrateurs et des contrôles doivent être refermés avec les bouchons supérieurs prévus (bouchons blancs) et transférés à 2-8 °C jusqu'à leur utilisation successive (Voir Fig. 1 – Récipient fermé).

Les calibrateurs peuvent être utilisés au maximum quatre fois.

Figure 1: Layout récipient



### Chargement des échantillons

Identifier les échantillons en utilisant le lecteur code à barres et les placer dans l'appareil, dans le récipient prévu. En cas d'absence de code à barres sur l'échantillon ou en cas de non lecture, les données d'identification de l'échantillon peuvent être insérées manuellement.

Sélectionner pour chaque échantillon les paramètres requis.

### Calibration

L'appareil *ZENIT RA Analyzer* utilise une courbe de calibration mémorisée (courbe maîtresse), générée par le producteur pour chaque lot de cartouche réactifs.

Les paramètres des "courbes maîtresses", ainsi que les valeurs des concentrations des calibrateurs, sont mémorisées dans le DATA DISK et transférées dans la base de données de l'appareil.

Les calibrateurs A et B sont utilisés pour recalibrer la "courbe maîtresse" en fonction tant de l'appareil utilisé que des réactifs à bord.

Pour réaliser la recalibration, analyser en triple les deux calibrateurs A et B et en simple les contrôles. Les valeurs de concentration obtenues avec les contrôles permettent de valider la nouvelle calibration.

Une fois que la recalibration de la "courbe maîtresse" a été acceptée et mémorisée, tous les échantillons successifs peuvent être analysés sans calibration supplémentaire, sauf dans les cas suivants:

- quand on charge à bord de l'appareil une cartouche réactifs avec un nouveau lot;

- quand les valeurs des contrôles ne rentrent pas dans l'intervalle d'acceptabilité;
- quand on effectue la procédure d'entretien de l'appareil;
- quand la validité de la "courbe maîtresse" recalibrée est périmée.

La validité de la "courbe maîtresse" recalibrée pour le kit *ZENIT RA PR3* est de 15 jours.

La gestion de la recalibration est mise en œuvre en automatique par l'appareil.

### Dosage

Appuyer sur la touche de mise en route.

1. Le système aspire 80 µL de Diluant Echantillons, 40 µL de Particules Magnétiques, 100 µL de Diluant Echantillons et 6 µL d'échantillon ou contrôle (pour les calibrateurs, le sérum positif est fourni pré-dilué avec le Diluant Echantillons et le volume prélevé est de 106 µL). Les solutions et la suspension sont distribuées dans la cuvette de réaction.
2. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
3. Après cette phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées.
4. Dans la cuvette, on distribue 200 µL de conjugué.
5. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
6. Après cette dernière phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées et la cuvette est transférée dans la chambre de lecture.
7. La quantité de conjugué lié à la phase solide, exprimée en RLU, est directement proportionnelle à la concentration en IgG anti-PR3 se trouvant dans l'échantillon.
8. Les réponses obtenues sont interpolées sur la courbe de tarage et transformées en concentrations.

Les échantillons avec des valeurs de concentration plus élevées que la limite supérieure de l'intervalle de mesure peuvent être dilués et retestés. La nouvelle valeur obtenue est multipliée, pour obtenir le résultat final, par le facteur de dilution utilisé.

### CONTROLE QUALITE

---

Pour assurer la validité du dosage, on doit mesurer des sérums de contrôle à différents niveaux de concentration (au moins un sérum négatif et un sérum positif) chaque jour où l'on effectue un dosage.

Si le laboratoire demande, pour la vérification des résultats du dosage, une utilisation plus fréquente ou un nombre plus élevé de contrôles, effectuer les procédures de contrôle qualité qui y sont établies.

Si l'on utilise des sérums de contrôle ZENIT RA, les valeurs attendues moyennes et les limites d'acceptabilité sont celles reportées dans le DATA DISK se trouvant également dans l'emballage des contrôles.

Si l'on utilisait des sérums de contrôle différents, il faut, avant leur utilisation, définir les valeurs attendues avec les réactifs et le système ZENIT RA.

Si la valeur des contrôles ne rentrait pas dans l'intervalle d'acceptabilité spécifié, les résultats relatifs du dosage ne seraient pas valides et les échantillons respectifs devraient être analysés à nouveau

Dans ce cas, il faut réaliser une procédure de recalibration avant la répétition du dosage.

## CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

---

### Calcul des résultats

La concentration des anticorps IgG anti-PR3 se trouvant dans les échantillons en examen est calculée automatiquement par le système. Les valeurs peuvent être visualisées à travers lecture sur l'écran ou impression.

Les concentrations sont exprimées en UA/mL.

Le calcul de la concentration en analyte de l'échantillon se fait à travers lecture de la réponse obtenue pour chaque échantillon sur une courbe de calibration élaborée à travers un système de "fitting" logistique à quatre paramètres (4PL, Y pondéré), corrigée périodiquement en fonction des réponses obtenues dans le dosage des calibrateurs.

Pour des informations détaillées sur comment le système calcule les résultats, consulter le manuel opérationnel du système.

### Interprétation des résultats

La gamme de mesurabilité du dosage *ZENIT RA PR3* est: 0.0 – 1067 UA/mL.

Les valeurs inférieures à 0.0 UA/mL sont des valeurs extrapolées et peuvent être reportées comme "égales à 0.0 UA/mL".

Les valeurs supérieures à 1067 UA/mL peuvent être reportées comme "supérieures à 1067 UA/mL", ou testées à nouveau après dilution.

Les résultats des échantillons peuvent être interprétés de la façon suivante:

---

(UA/mL)	Interprétation
< 10	L'échantillon doit être considéré Négatif pour la présence de IgG anti-PR3
10÷20	L'échantillon doit être considéré Douteux pour la présence de IgG anti-PR3
> 20	L'échantillon doit être considéré Positif pour la présence de IgG anti-PR3

---

Les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées uniquement comme valeurs suggérées. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles de référence.

## LIMITES DU DOSAGE

---

Pour établir un diagnostic, les résultats obtenus avec le kit *ZENIT RA PR3* et le système *ZENIT RA Analyzer* doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et de laboratoire à la disposition du médecin.

La contamination bactérienne des échantillons et l'inactivation à la chaleur peuvent influencer le résultat du dosage.

Les anticorps hétérophiles se trouvant dans les échantillons de sérum humain peuvent réagir avec les réactifs à base d'immunoglobulines, causant des interférences dans les dosages immunologiques in vitro. Ces échantillons peuvent donner lieu à des valeurs anormales si analysés avec le kit *ZENIT RA PR3*.

---

#### VALEURS ATTENDUES

---

On a analysé 99 donneurs sélectionnés au hasard pour vérifier la présence d'anticorps IgG anti-PR3.

Tous les échantillons analysés étaient négatifs, avec une valeur moyenne de 1.0 UA/mL et une déviation standard de 1.239 UA/mL.

Avec les résultats obtenus, on a calculé la "Limit of Blank" (LoB = la plus haute valeur que l'on puisse attendre dans une série d'échantillons qui ne contiennent pas l'analyte). La "Limit of Blank", déterminée comme le 95° percentile de la population négative, était égal à 3.5 UA/mL avec le lot de réactifs n° 1.

---

#### SENSIBILITE ET SPECIFICITE CLINIQUE

---

On a testé avec le kit *ZENIT RA PR3* un total de 333 échantillons dont 50 échantillons de patients atteints de vasculite primitive systémique associée aux ANCA diagnostiquée comme granulomatose de Wegener (GW), 45 échantillons de patients atteints de vasculite primitive systémique associée aux ANCA diagnostiquée comme polyangiite microscopique (PAM), 109 échantillons de patients atteints de diverses pathologies (14 maladies inflammatoires intestinales chroniques, 44 lupus érythémateux systémique, 7 conjonctives systémiques, 20 vasculites non associées aux ANCA, 10 arthrite rhumatoïde, 14 pathologies infectieuses), 30 échantillons de sujets normaux et 99 échantillons de donneurs.

Dans la population supposée négative (45 échantillons de patients avec diagnostic de PAM, 109 échantillons de patients atteints de diverses pathologies non associées aux ANCA, 30 échantillons de sujets normaux et 99 échantillons de donneurs) étudiée, il y a eu 9 échantillons positifs, 8 douteux et 266 négatifs.

**- Spécificité diagnostique 94.0 % (266/283)**

Des 18 échantillons résultant "non négatifs", 7 appartenaient au groupe des patients avec diagnostic PAM, 8 au groupe des patients atteints de différentes pathologies et un au groupe des sujets normaux.

Dans la population supposée positive (50 échantillons de patients avec diagnostic GW) étudiée, on a trouvé 11 échantillons négatifs, 39 positifs.

**- Sensibilité diagnostique: 78.0 % (39/50)**

Des 11 échantillons résultant "non positifs", 7 échantillons ont résulté positifs tant au test "gold standard" d'immunofluorescence indirecte avec pattern C-ANCA et 4 échantillons ont résulté négatifs au test "gold standard" d'immunofluorescence indirecte (dont un montrait un pattern "atypique").

Sur base des résultats de la spécificité et de la sensibilité diagnostique, l'**accord diagnostique est de 91.6 % (305/333)**.

---

**PRESTATIONS**


---

Avertissement: les données présentées ne représentent pas les spécifications de fonctionnement du kit, mais constituent une démonstration expérimentale de comment fonctionne le kit dans ces spécifications de la façon prévue par le producteur.

**Précision et Reproductibilité**

La précision et reproductibilité du kit *ZENIT RA PR3* ont été évaluées en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP5-A2 de la Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **précision** a été calculée en analysant les résultats de 20 réplifications de cinq sérums (un négatif et quatre positifs avec différentes concentrations de anti-PR3 IgG) réalisées avec deux lots différents de réactifs lors de la même séance expérimentale.

La concentration du sérum anti-PR3 IgG négatif (N2) était comprise dans l'intervalle de 0.0 à 3.0 UA/mL et de 2.1 à 4.4 UA/mL respectivement avec le lot de réactif n° 1 et n° 2.

Dans le tableau se trouvent les résultats obtenus avec les 4 sérums positifs.

Echantillon	Lot réactif n°	Concentration moyenne (UA/mL)	DS	CV %
P1	1	23.0	0.80	3.5
	2	28.5	0.86	3.0
P2	1	70.0	1.83	2.6
	2	80.0	1.68	2.1
P3	1	110.2	3.74	3.4
	2	145.8	2.93	2.0
P4	1	386.7	6.64	1.7
	2	434.6	8.78	2.0

La **reproductibilité** a été calculée en analysant les résultats de la détermination de cinq sérums (un négatif et quatre positifs avec différentes concentrations de anti-PR3 IgG) réalisée en simple, en 30 séances différentes, avec deux lots de réactifs différents.

La concentration du sérum anti-PR3 IgG négatif (LOB2) était comprise dans l'intervalle de 0.0 à 3.8 UA/mL.

Dans le tableau se trouvent les résultats obtenus avec les 4 sérums positifs.

Echantillon	Concentration moyenne (UA/mL)	DS	CV %
P1	24.5	1.56	6.4
P2	71.3	3.09	4.3
P3	124.6	11.05	8.9
P4	391.8	22.87	5.8

#### Linéarité des Dilutions

La linéarité des dilutions du kit ZENIT RA PR3 a été évaluée en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP6-A de la Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

On a dosé des dilutions scalaires de 3 sérums à concentration élevée de IgG anti-PR3, réalisées avec le Diluant Echantillons.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant.

Echantillon	Facteur de dilution	Concentration mesurée (UA/mL)	Concentration attendue (UA/mL)	Recovery %
1	1	377.4	-	(100)
	2	186.7	188.7	98.9
	4	84.7	94.4	89.7
	8	37.0	47.2	78.4
	1	957.1	-	(100)
2	2	493.1	478.6	103.0
	4	256.1	239.3	107.1
	8	131.8	119.6	110.2
	16	71.0	59.8	118.7
	1	206.9	-	(100)
3	2	111.6	103.5	107.8
	4	64.0	51.7	123.8
	8	33.4	25.9	129.0
	1	377.4	-	(100)
	2	186.7	188.7	98.9

Il faut dans tous les cas souligner que tous les sérums, quand ils sont mesurés à des dilutions différentes, ne peuvent fournir des résultats linéaires à l'intérieur de l'intervalle de mesurabilité car le résultat dépend non seulement de la concentration mais aussi de l'affinité des anticorps se trouvant dans l'échantillon.

Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique du kit *ZENIT RA PR3*, exprimée comme **limite de détection** (*Limit of Detection – LoD*: c'est à dire la plus petite quantité d'analyte que la méthode est capable de mesurer) a été évaluée en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP17-A de la Clinical and Laboratory Standards (CLSI) et la formule pour le calcul  $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$  (où *LoB* représente la valeur de la "Limit of Blank", *SD<sub>s</sub>* la déviation standard estimée de la distribution de l'échantillon à faible concentration et *C<sub>β</sub>* est dérivé du 95 ° percentile de la distribution standard gaussienne).

On a utilisé 4 échantillons à faible concentration en analyte, déterminés en simple avec deux différents lots de réactifs en 30 expériences différentes.

La limite de détection du kit *ZENIT RA PR3* est de 7.3 UA/mL.

Les valeurs de la limite de détection, ainsi que les considérations de caractère clinique et les résultats de comparaison avec des méthodes de référence ont contribué à la définition de la valeur cut-off.

Spécificité Analytique: Interférences

Une étude basée sur les lignes de conduite du document EP7-A2 de la CLSI a démontré que les prestations du dosage ne sont pas influencées par la présence dans l'échantillon des substances potentiellement interférentes reprises dans le tableau suivant, jusqu'à la concentration expérimentée.

Substances potentiellement interférentes	Concentration maximale expérimentée
Bilirubine libre	20 mg/dL
Bilirubine conjuguée	28 mg/dL
Hémoglobine	1000 mg/dL
Acides gras	3000 mg/dL

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles est toutefois déconseillée.

Spécificité Analytique: Réactions croisées

Pour évaluer les réactions croisées potentielles de l'antigène utilisé pour sensibiliser les microparticules, on a mené une étude avec 24 échantillons, tous avec des niveaux élevés d'autres auto-anticorps et négatifs pour les IgG anti-PR3.

Les échantillons utilisés étaient subdivisés comme suit: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (2), Histones (1/), Nucléolaires (1),  $\beta_2$ -GPI/CL IgG (2), Gliadine/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (3).

L'étude n'a montré aucune réaction croisée significative de l'antigène en phase solide avec les autres auto-anticorps.

Effet saturation à fortes doses

Certaines méthodes immunologiques employées pour la détermination d'échantillons contenant l'analyte à

des concentrations extrêmement élevées peuvent fournir des niveaux apparents en analyte sous-estimés (Effet hook).

La méthode utilisée dans le kit *ZENIT RA PR3*, étant un méthode à deux incubations, ne subit pas cet effet. Un échantillon avec une concentration extrêmement élevée (au-dessus de l'intervalle de mesure) de IgG anti-PR3 a confirmé l'absence d'effet "hook" jusqu'à la concentration de 20831 UA/mL.

#### Sensibilité et Spécificité Relative

La présence d'anticorps anti-PR3 IgG a été déterminée en utilisant le kit *ZENIT RA PR3* et une méthode de dosage ELISA disponible dans le commerce sur 226 échantillons: 50 échantillons de patients atteints de vasculite primitive systémique associée aux ANCA diagnostiquée comme granulomatose de Wegener, 43 échantillons de patients atteints de vasculite primitive systémique associée aux ANCA diagnostiquée comme polyangiite microscopique, 103 échantillons de patients atteints de différentes pathologies (maladies inflammatoires intestinales chroniques, lupus érythémateux systémique, conjonctives systémiques, vasculite non associée aux ANCA, arthrite rhumatoïde, pathologies infectieuses) et 30 patients normaux.

4 échantillons ont donné lieu à des résultats discordants entre le dosage ZENIT RA et le dosage ELISA disponible dans le commerce.

La **concordance relative** est donc de 98.2 % (222/226).

La **sensibilité relative** est de 97.8 % (45/46).

La **spécificité relative** est de 98.3 % (177/180).

L'échantillon résultant négatif avec le kit *ZENIT RA PR3* et positif avec le kit ELISA appartenait au groupe des échantillons lupus érythémateux.

Les trois échantillons résultant positifs avec le kit *ZENIT RA PR3* et négatifs avec le kit ELISA appartenaient: deux au groupe des échantillons avec granulomatose de Wegener et un au groupe des échantillons avec polyangiite microscopique.

#### Sérums de référence

La quantité d'anticorps anti-PR3 IgG se trouvant dans l'échantillon "PR3-ANCA HUMAN REFERENCE SERUM #16" (CDC, Cat. No. IS2721, Lot No. 07-0002), testée avec le kit *ZENIT RA PR3*, après dilution appropriée, a été de 2282 UA/mL.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97 ( Suppl 6 ) : S12-S13, 1989.
2. Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases : a review. Am J Kidney Dis 1990; 15 : 517-29.
3. Chen M, Kallenberg CGM. New advantages in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. Clin



- Exp Rheumatol 2009, 27( s.52 ): 108-14. Review.
4. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-13.
  5. Sinico RA, Radice A, Pozzi C, et al. Diagnostic significance and antigen specificity of antineutrophil cytoplasmic antibodies in renal disease : a prospective multicentre study. Nephrol Dial Transplant 1994; 9 : 505-10.
  6. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies ( ANCA ). Autoimmunity 2005;38: 93-103.
  7. Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis : sensitivity,specificity and recognition of putative antigens. Digestion 1994 ; 55: 34-9.
  8. Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, et al. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. Ann Int Med 1997; 126: 866-73.
  9. Hagen EC, Daha MR, Andrassy K, Csernok E, et al for the EC/BRC Project for ANCA Assay Standardization. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. Kidney Int 1998; 53: 743-53.
  10. Sinico RA, Radice A, Tonutti E, Villalta D, et al per il gruppo FIRMA. Proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili ( ANCA ). Riv Med Lab-JLM 2002; 3 (4): 20-24.
  11. Savige J, Dimech W, Fritzier M, et al for the International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies ( ANCA ). Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies: quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312-18.
  12. Jennette JC,Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predicting value of ANCA serology. Kidney Int 1998; 53: 796-8.
  13. Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical Applications of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Testing. Curr Opin Rheumatol 2004 ; 16(1): 9-17.

14. Sinico RA, Radice A, Corace C, Di Toma L, Sabadini E. Value of a New Automated Fluorescence Immunoassay ( ELIA ) for PR3 and PR3-ANCA in Monitoring Disease Activity in ANCA-Associated Systemic Vasculitis. Ann NY Acad Sci 2005;1050: 185-92.
15. Mandl LA, Solomon DH, Smith EL, Lew RA, Katz JN, Shmerling RH. Using antineutrophil cytoplasmic antibody testing to diagnose vasculitis : can test-ordering guidelines improve diagnostic accuracy ? Arch Inter Med 2002; 162:1509-14.
16. Radice A, Sinico RA. La diagnosi clinica e di laboratorio delle malattie autoimmune sistemiche: le vasculiti. In: Il Laboratorio nelle Malattie Reumatiche Autoimmuni, R Tozzoli, N Bizzaro, D Villalta, E Tonutti, Ed. Aesculapio 2007.



**TECHNOGENETICS S.r.l.**

Viale Casiraghi 471

20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italie

#### **FRANCE**

##### **Distribué par**

A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L.  
3-5, Rue du Jura - BP 70511- 94633 Rungis Cedex  
Tél. +33 1 56 34 69 10 - Fax +33 1 56 34 69 11  
[www.menariniagnostics.fr](http://www.menariniagnostics.fr)

#### **BELGIQUE et LUXEMBOURG**

##### **Distribué par**

Menarini Diagnostics Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4 - 1930 Zaventem  
Tél. +32 2 72 14 545 - Fax +32 2 72 09 292  
[www.menariniagnostics.be](http://www.menariniagnostics.be)