

UTILISATION PRÉVUE

Le test de diagnostic étendu de la vascularite auto-immune Zeus **AtheNA Multi-Lyte**® a été conçu pour la détection qualitative et semi-quantitative dans le sérum humain d'anticorps IgG dirigés contre 3 antigènes différents : membrane basale glomérulaire (MBG), myéloperoxydase (MPO) et protéinase 3 (PR-3). Ce test a pour but d'aider à diagnostiquer divers troubles vasculaires auto-immuns caractérisés par des taux élevés des anticorps sélectionnés. La MPO et/ou la PR-3 peuvent être associées à des troubles auto-immuns tels que la granulomatose de Wegener, la GNRP idiopathique, la PAM et l'hémiatrophie faciale de Parry-Romberg (SPR). Les anticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG) aident au diagnostic du syndrome de Goodpasture. Ce test a été conçu uniquement pour des diagnostics *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA en anglais) ont été découverts en 1982 par Davies *et al* (1). Depuis cette première découverte, il a été démontré que les ANCA sont associés à un certain nombre de vascularites systémiques. On sait aujourd'hui que les ANCA présentent deux principaux aspects : C-ANCA dirigé contre la protéinase 3 (PR-3) et P-ANCA dirigé contre la myéloperoxydase (MPO). Il est vivement recommandé lors des tests biologiques menés sur des patients présentant des signes cliniques suggérant une vascularite systémique de rechercher la présence des deux types C-ANCA et P-ANCA. Les syndromes cliniques les plus fréquemment associés aux ANCA sont les suivants : granulomatose de Wegener (2), périartérite (3), polyangéite (4), glomérulonéphrite rapidement progressive (GNRP) idiopathique (5), maladie de Kawasaki (6) et troubles rénaux comme le syndrome de Goodpasture (7).

Si, au départ, la détection des C-ANCA et P-ANCA se basait sur des techniques d'immunofluorescence indirecte, une identification et une purification plus poussées de la PR-3 et de la MPO ont conduit au développement de méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) et de méthodes immunologiques basées sur l'utilisation de microparticules, autant pour la PR-3 que pour la MPO. Le syndrome de Goodpasture se caractérise par une hémorragie pulmonaire, une insuffisance rénale et la présence d'anticorps anti-MBG (8). Concernant le syndrome de Goodpasture, une partie du domaine globulaire des chaînes du collagène de type IV est antigénique et responsable du développement des anticorps anti-MBG présents dans la glomérulonéphrite progressive (9, 10 et 11).

PRINCIPE DU TEST

Le test de diagnostic étendu de la vascularite auto-immune Zeus **AtheNA Multi-Lyte** a été conçu pour détecter dans le sérum humain la présence d'anticorps IgG anti-MPO, anti-PR-3 et anti-MBG. La procédure comprend deux étapes d'incubation :

1. Les échantillons de sérum à tester (correctement dilués) sont incubés dans un tube contenant un mélange de billes en suspension pour test multiplex. La suspension de billes contient un mélange de populations marquées de microsphères en polystyrène (billes) ; chaque population est associée à un antigène différent. S'ils sont présents dans les sérums du patient, les anticorps spécifiques se lieront à l'antigène fixé sur une ou plusieurs populations de billes. Les microsphères sont ensuite rincées pour éliminer les protéines sériques non-réactives.
2. Une solution d'IgG anti-humaine d'origine caprine conjuguée à de la phycoérythrine (PE) est ajoutée au micro-puits et la plaque est de nouveau incubée. Le conjugué va réagir avec les anticorps IgG fixés sur la phase solide au cours de l'étape 1. La suspension de billes est alors analysée par l'instrument **AtheNA Multi-Lyte**. Le(s) population(s) de billes est/sont triée(s) (identifiée(s)) et l'on détermine pour chaque population de billes la quantité de molécules indicatrices (conjugué PE). À l'aide de la technologie d'étalonnage intra-puits (*Intra-Well Calibration Technology*®), les populations de billes d'étalonnage internes sont utilisées pour convertir la fluorescence brute en résultats numériques.

COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

Matériel inclus :

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement.

REMARQUE : Les composants suivants contiennent de l'azotate de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : suspension de billes, contrôles, conjugué et SAVE Diluent®.

SOLN	BEAD	1. Suspension de billes : La suspension contient des microsphères en polystyrène de 5,6 microns marquées qui sont conjuguées aux antigènes suivants : myéloperoxydase (MPO), protéinase 3 (PR3) et membrane basale glomérulaire (MBG). La suspension de billes contient également une population de billes pour la détection d'anticorps non spécifiques (s'il y en a) dans l'échantillon du patient et quatre populations de billes utilisées pour l'étalonnage de l'essai. Un flacon couleur ambre contenant 5,5 ml. Prêt à l'emploi.	
CONJ		2. Conjugué : IgG anti-humaines d'origine caprine conjuguées à de la phycoérythrine (chaîne spécifique γ). Un flacon couleur ambre contenant 15 ml. Prêt à l'emploi.	
CONTROL	+	1	3. Contrôle positif 1 (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon rouge.
CONTROL	+	2	4. Contrôle positif 2 (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon blanc.
CONTROL	-		5. Contrôle négatif (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon vert.
DIL	SPE		6. SAVE Diluent® : Un flacon de 50 ml à bouchon vert contenant une solution de tampon phosphate salin. Prêt à l'emploi. REMARQUE : La solution SAVE Diluent® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.
WASHBUF	10X		7. Tampon de lavage concentré (10X) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou déionisée. Un flacon de 50 ml à bouchon transparent contenant une solution de tampon phosphate salin concentrée 10X.

1. **REMARQUES : Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte : tampon de lavage et SAVE Diluent®.**
2. **Le système de test contient également :**
 - a. une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.
 - b. un CD d'étalonnage contenant des valeurs d'étalonnage spécifiques par lot, requises pour les analyses d'échantillons et le contrôle de qualité des essais, et des notices.
 - c. une plaque de dilution de 96 puits.
 - d. une plaque de filtration de 96 puits.

PRÉCAUTIONS

1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. La suspension de billes du test **AtheNA Multi-Lyte** ne contient pas d'organismes vivants. Cependant, le réactif doit être considéré comme un **matériau biologique dangereux** et être manipulé comme tel.
4. Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue

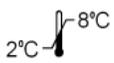
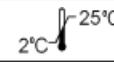
d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (20).

5. Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. **Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20 à 25 °C) avant de commencer le test.** Les réactifs non utilisés doivent être retournés à une température de réfrigération immédiatement après utilisation.
6. Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution de lavage résiduelle (p. ex., par aspiration ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
7. La solution SAve Diluent®, la suspension de billes, les solutions de contrôle et le conjugué contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azoture de sodium.
8. Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
9. La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
10. Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
11. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
12. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
13. Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
14. Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
15. Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation. La suspension de billes et le conjugué sont des réactifs photosensibles. Tous deux ont été conditionnés dans des emballages photoprotecteurs. Des niveaux normaux d'exposition à la lumière au cours de l'exécution de l'essai n'affecteront pas les performances de ce dernier. Ne pas exposer inutilement ces réactifs à des sources puissantes de lumière visible.
16. Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex., 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
17. Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
18. Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azoture de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azoture de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
19. Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 à 200 µl.
2. Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 à 200 µl.
3. Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
4. Pipettes sérologiques.
5. Embouts de pipettes jetables.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
8. Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex., 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium).
9. Système **AtheNA Multi-Lyte** (instrument Luminex®) avec fluide d'entraînement (produit n° 40-50035).
10. Eau distillée ou déionisée.
11. Vortex.
12. Petit bain de sonication.
13. Un agitateur de plaque pouvant atteindre la vitesse de 800 r/min (optionnel pour mélanger).
14. Système et embout d'aspiration pour le lavage des microsphères.

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Suspension de billes : Retirer uniquement la quantité nécessaire pour analyser les échantillons devant être testés, puis restocker toute quantité non utilisée.
	Conjugué : NE PAS CONGELER.
	Système de test non ouvert, solutions de contrôle positif, solutions de contrôle négatif, solution SAve Diluent®
	Tampon de lavage (1 x) : 20 - 25°C pendant un maximum de 7 jours; 2 à 8 °C pendant un maximum de 30 jours. Tampon de lavage (10 x) : 2 - 25°C

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

1. ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* » (dernière édition).
2. Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
3. Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (13, 14). Ne pas utiliser si un anticoagulant ou un agent de conservation a été ajouté. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.
4. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 à 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (15).

PROCÉDURE D'ESSAI

1. Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 à 25 °C).
2. Déterminer le nombre total de contrôles et d'échantillons à tester. Il est nécessaire d'utiliser un contrôle négatif et deux contrôles positifs dans chaque série d'essais. Le contrôle négatif doit être utilisé dans le puits A1, le contrôle positif 1 dans le puits B1 et le contrôle positif 2 dans le puits C1. Utiliser un puits pour chaque contrôle et chaque échantillon à doser.
 - a. Afin d'optimiser les temps de lecture, la suspension de billes doit être parfaitement mélangée juste avant son utilisation. Pour resuspendre efficacement les billes, il convient tout d'abord d'agiter la suspension de billes par vortex pendant environ 30 secondes puis d'effectuer une sonication pendant environ 30 secondes dans un bain de sonication léger.

- b. Afin de garantir la réussite de l'essai, il est important que les composants soient minutieusement mélangés. Afin de garantir un mélange adapté des composants, il convient de mélanger la plaque par agitation pendant environ 30 secondes à 800 r/min environ ; ou bien de placer un pipetteur à environ la moitié du volume de la plaque puis d'aspirer et d'expulser (en pompant vers le haut et vers le bas) le contenu du puits ; répéter l'opération au moins 5 fois.

EXEMPLE DE CONFIGURATION DE PLAQUE		
	1	2
A	Contrôle négatif	etc.
B	Contrôle positif 1	
C	Contrôle positif 2	
D	Patient 1	
E	Patient 2	
F	Patient 3	
G	Patient 4	
H	Patient 5	

- Préparer une dilution 1:21 (p. ex., 10 µl de sérum + 200 µl de SAVE Diluent®) de contrôle négatif, de contrôles positifs et de sérum de chaque patient. **REMARQUE : La solution SAVE Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.** Afin de garantir de bons résultats, il est important que les dilutions d'échantillons soient minutieusement mélangées, conformément à l'alinéa 2b ci-dessus.
- Après avoir déterminé le nombre total de puits à doser, utiliser une pipette multicanaux ou une pipette à répétition pour délivrer 50 µl de billes en suspension dans chaque puits de la plaque de filtration.
- Transférer 10 µl de chaque échantillon dilué (1:21) et contrôler en comparant la plaque de dilution à la plaque de filtration. Afin de garantir de bons résultats, il est important que les dilutions d'échantillons soient minutieusement mélangées, conformément à l'alinéa 2b ci-dessus.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 ± 10 minutes.
- Après l'incubation, rincer les billes par filtration sous vide à l'aide du tampon de lavage fourni dilué (concentration 1X).
 - Placer la plaque de filtration sur le distributeur à vide et retirer la solution en laissant les billes.
 - Arrêter l'aspiration et ajouter 200 µL de solution tampon de lavage diluée (1x).
 - Créer le vide et retirer la solution.
 - Répéter les étapes 7b et 7c jusqu'à un total de trois rinçages.
- Après le dernier lavage, sécher délicatement le fond de la plaque de filtration et laisser sécher la plaque à l'air pendant 3 à 5 minutes avant de passer à l'étape suivante.
- Ajouter 150 µl de conjugué dans chaque puits, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons. Afin de garantir de bons résultats, il est important que le conjugué et la suspension de billes soient minutieusement mélangés, conformément à l'alinéa 2b ci-dessus. Il est possible, en option, pendant le mélange du conjugué, de transférer le mélange dans des puits vides d'une plaque de réaction en polystyrène.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 ± 10 minutes.
- Régler l'instrument **AtheNA Multi-Lyte** pour l'analyse des réactions en sélectionnant le calibre AIV Plus. Pour les détails concernant le fonctionnement de l'instrument **AtheNA Multi-Lyte**, consulter le manuel d'utilisation. Les résultats peuvent être lus à partir de la plaque de filtration ou de la plaque de réaction. **REMARQUE : Afin de garantir que les analyses d'échantillons soient correctement effectuées, il est important que l'instrument soit préparé, étalonné et conservé conformément aux instructions du fabricant.** Veuillez relire le manuel de préparation de l'instrument avant de lire les résultats de l'essai.
- Il faut lire la plaque dans les 60 minutes qui suivent la fin de l'incubation du conjugué. Il est possible d'agiter la plaque 15 secondes environ avant de lire les résultats. Cette étape facultative peut permettre de diminuer le temps nécessaire à la lecture de la plaque.

Étape	Procédure d'essai abrégée
1	Diluer les échantillons 1:21 avec le diluant SAVE. Bien mélanger.
2	Mélanger dans un puits vide 50 µl de billes en suspension avec 10 µl d'échantillon dilué. Bien mélanger.
3	Incuber à température ambiante pendant 30 minutes (± 10 minutes).
4	Rincer les microsphères 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage 1x.
5	Sécher délicatement le fond de la plaque et laisser sécher à l'air 3 à 5 minutes.
6	Ajouter 150 µl de conjugué dans chaque puits. Bien mélanger.
7	Transférer sur une plaque de réaction (facultatif).
8	Incuber à température ambiante pendant 30 minutes (± 10 minutes).
9	Agiter la plaque (facultatif).
10	Lire les résultats dans les 60 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Lors de chaque essai, il est nécessaire d'inclure le contrôle négatif (dans le puits A1) et deux contrôles positifs (dans les puits B1 à C1).
- La validité de l'épreuve est définie par la performance des contrôles positifs et du contrôle négatif. Ces critères sont automatiquement analysés avec la *technologie d'étalonnage intra-puits*.
 - Le contrôle négatif et les contrôles positifs doivent tous être négatifs sur les billes porteuses d'anticorps non spécifiques ou témoins.
 - Le contrôle négatif doit être négatif pour tous les analytes inclus dans le test sur billes en suspension.
 - Chaque contrôle positif doit être positif pour un groupe d'analytes prédéterminé compris dans la suspension de billes. Ces intervalles sont codés sur le CD d'étalonnage.
 - Si l'un des critères ci-dessus n'est pas rempli, l'épreuve toute entière sera considérée comme non valide et devra être recommencée.
- La validité des échantillons repose sur les caractéristiques des billes d'étalonnage et leurs interactions avec les sérums du patient. Il existe divers paramètres qui sont automatiquement contrôlés avec la *technologie d'étalonnage intra-puits*. Si l'un des critères s'avérait ne pas correspondre aux spécifications, les résultats pour le patient seraient considérés comme non valides et l'épreuve devrait être recommencée. Le cas échéant, le rapport de données indiquera l'échantillon qui a été invalidé ainsi qu'un code de dépannage.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes. Les contrôles externes doivent être représentatifs d'un sérum humain normal car le système d'étalonnage des tests **AtheNA Multi-Lyte** est partiellement basé sur les caractéristiques d'un échantillon de sérum. Si la formulation de l'échantillon est artificielle (pas du sérum humain), des résultats erronés sont possibles.
- Consulter le document C24 du CLSI intitulé Statistical Quality Control for Quantitative Measurements [Contrôle de qualité statistique pour les mesures quantitatives] pour connaître les pratiques appropriées en termes de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Calculs**
 - Étalonnage de l'essai : Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus utilise une *technologie d'étalonnage intra-puits*. La *technologie d'étalonnage intra-puits* utilise une courbe d'étalonnage multipoints standard dans la suspension de billes. Grâce à la *technologie d'étalonnage intra-puits*, chaque puits de l'essai est étalonné de l'intérieur sans aucune intervention de l'utilisateur. La courbe standard est conçue pour se régler automatiquement en fonction des caractéristiques propres au sérum du patient ou au sérum témoin. Les valeurs d'étalonnage sont attribuées aux étalons internes par ZEUS. Ces valeurs

sont spécifiques pour chaque lot et sont codées sur le CD d'étalonnage accompagnant chaque lot.

- b. Valeurs seuils d'analyse : Une valeur seuil a été assignée à chaque analyte du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus. Les valeurs seuils sont déterminées par ZEUS pour chaque lot de tests et sont codées sur le CD d'étalonnage accompagnant chaque lot.
- c. Grâce à la *technologie d'étalonnage intra-puits*, tous les calculs sont effectués automatiquement lors de l'utilisation du système **AtheNA Multi-Lyte**. La *technologie d'étalonnage intra-puits* effectue une analyse de régression des étalons internes, puis règle les valeurs unitaires calculées en fonction des étalons supplémentaires et des caractéristiques de l'échantillon de sérum.

2. **Interprétations** : Les valeurs unitaires des échantillons pour MBG, MPO et PR-3 sont interprétées comme suit :

Échantillons négatifs	< 100 UA/ml
Échantillons positifs	> 120 UA/ml
Échantillons ambivalents	100 à 120 AU/mL

LIMITES DU TEST

1. Le test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus vise à aider au diagnostic mais n'est pas un diagnostic en soi. Les résultats de test doivent être interprétés conjointement avec l'évaluation clinique et avec les résultats d'autres procédures de diagnostic.
2. Des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques peuvent fausser le résultat de cette analyse. Par ailleurs, des échantillons présentant des taux anormaux d'IgG peuvent interférer avec les résultats du test. Il faudra donc éviter d'utiliser de tels échantillons.

RÉSULTATS ATTENDUS

1. MPO/PR-3

L'essai clinique incluait 122 échantillons envoyés au laboratoire pour un test ANCA de routine, 173 échantillons recueillis sur des patients ayant bénéficié d'un diagnostic clinique et 150 échantillons de donneurs de sang normaux. Les résultats de la méthode ELISA pour la MPO et la PR-3 ont montré les résultats attendus pour chaque groupe. Les résultats relatifs à chaque groupe sont reportés dans le tableau 1 et dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats attendus des essais sur analytes MPO et PR-3 avec différentes populations d'échantillons

Groupe	N	Analyte	Résultat AtheNA Multi-Lyte				
			Invalide	Ambivalent	Positif	Négatif	
Routine	122	MPO	Quantité	2	2	21	97
			%	1,6	1,6	17,2	79,5
		PR-3	Quantité	2	2	50	68
			%	1,6	1,6	41,0	55,7
Clinique	173	MPO	Quantité	1	2	104	66
			%	0,6	1,2	60,1	38,2
		PR-3	Quantité	1	6	104	62
			%	0,6	3,5	60,1	35,8
Normal	150	MPO	Quantité	0	1	9	140
			%	0,0	0,7	6,0	93,3
		PR-3	Quantité	0	6	27	117
			%	0,0	4,0	18,0	78,0

Tableau 2 : Résultats attendus des essais sur analytes MPO et PR-3 avec différentes populations d'échantillons

Groupe	Analyte	Résultats AtheNA Multi-Lyte			
		Moyenne	Médiane	Plage	
				Valeur inférieure	Valeur supérieure
Routine	MPO	211,6	35,5	0	1887
	PR-3	396,3	73	5	3405
Clinique	MPO	272	50	14	2451
	PR-3	267,2	62	18	3041
Normal	MPO	53	35	0	684
	PR-3	128	57	0	1636

2. MBG

L'essai clinique incluait 115 échantillons envoyés au laboratoire pour un test des ANCA (vascularite systémique) et 115 échantillons envoyés pour un test des anticorps anti-MBG (syndrome de Goodpasture). Les résultats se sont avérés correspondre aux résultats attendus pour tous les groupes.

Tableau 3 : Résultats attendus des essais sur analytes ANCA et MBG avec différentes populations d'échantillons

N	Analyte	Résultat AtheNA Multi-Lyte				
		Invalide	Ambivalent	Positif	Négatif	
115	ANCA	Quantité	0	0	20	95
		%	1,6	1,6	17,4	82,6
	MBG	Quantité	0	0	13	102
		%	0,00	0,00	11,3	88,7

Tableau 4 : Résultats attendus des essais sur analytes ANCA et MBG avec différentes populations d'échantillons

Analyte	Moyenne	Médiane	Plage	
			Valeur inférieure	Valeur supérieure
			ANCA	105
MBG	85	39	13	1336

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Étude comparative

Une étude comparative interne a été réalisée afin de démontrer que le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus est équivalent aux systèmes de test ELISA disponibles sur le marché. Les performances ont été évaluées sur 455 échantillons ; 150 échantillons de sérums de donneurs normaux, 122 échantillons envoyés au préalable au laboratoire pour un test de routine des auto-anticorps ANCA et 173 échantillons de patients présentant une vascularite systémique révélée par diagnostic clinique. Les résultats de l'essai ont été résumés dans les tableaux 5 et 6 ci-dessous. Des données de comparaison pour le test d'anticorps anti-MBG, réalisé sur 230 échantillons (dont 115 échantillons de sérums de patients pour lesquels un syndrome de Goodpasture est suspecté) sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 5 : Performances du système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte AIV Plus (analyte MPO) par rapport au système de test ZEUS ELISA MPO IgG

		Résultats ELISA			
		Positif	Négatif	Ambivalent*	Total
Résultats AtheNA Multi-Lyte	Positif	55	39	2	96
	Négatif	2	338	1	341
	Ambivalent*	1	4	0	5
	Total	59	383	3	445
Sensibilité relative = 55/57 = 96,5 %		Spécificité relative = 338/377 = 89,6 %		Concordance relative = 393/434 = 90,6 %	
* Les échantillons ambivalents ont été exclus des calculs de concordance					

Tableau 6 : Performances du système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte AIV Plus (analyte PR-3) par rapport au système de test ZEUS ELISA PR-3 IgG

		Résultats ELISA			
		Positif	Négatif	Ambivalent*	Total
Résultats AtheNA Multi-Lyte	Positif	85	53	1	139
	Négatif	6	283	0	289
	Ambivalent*	4	10	0	14
	Total	96	348	1	445
Sensibilité relative = 85/91 = 93,4 %		Spécificité relative = 283/336 = 84,2 %		Concordance relative = 368/427 = 86,2 %	
* Les échantillons ambivalents ont été exclus des calculs de concordance					

Tableau 7 : Performances du système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte AIV Plus (analyte MBG) par rapport au système de test ZEUS ELISA ANCA

		Résultats ELISA			
		Positif	Négatif	Ambivalent*	Total
Résultats AtheNA Multi-Lyte	Positif	31	2	0	33
	Négatif	1	195	1	197
	Ambivalent*	0	0	0	0
	Total	32	197	1	230
Pourcentage de concordance positive = 31/33 = 93,9 %		Pourcentage de concordance négative = 195/197 = 99,0 %		Pourcentage de concordance globale = 226/230 = 98,3 %	
* Les échantillons ambivalents ont été exclus des calculs de concordance					

Tableau 8 : Résumé des comparaisons de performance

Analyte	N	Sensibilité relative	Spécificité relative	Concordance globale
MPO	445	55/57 = 96,5 %	338/377 = 89,6 %	393/439 = 90,6 %
PR-3	445	85/91 = 93,4 %	283/336 = 84,2 %	368/427 = 86,2 %
MBG	230	31/33 = 93,9 %	195/197 = 99,0 %	226/230 = 98,3 %

2. Reproductibilité

Une évaluation interne de la reproductibilité intra-essai et inter-essais a été effectuée. Six échantillons ont été testés. Chaque jour, chaque échantillon était dilué deux fois puis copié quatre fois, ce qui a donné un total de huit puits pour chacun des six échantillons. Ce protocole a été suivi pendant trois jours. Les résultats ont ensuite été utilisés pour calculer les valeurs moyennes UA/ml, les écarts types et le coefficient de variation (exprimé en pourcentage). Les échantillons ont été sélectionnés de telle façon que les échantillons 5 et 6 ont été clairement négatifs, les échantillons 1 et 2 clairement positifs et les échantillons 3 et 4 près de la valeur seuil de l'essai. Les résultats de cette analyse ont été résumés dans les tableaux 9, 10 et 11 ci-dessous :

Tableau 9 : Étude de précision - MPO

Échant.	Résultats du jour 1		Résultats du jour 2		Résultats du jour 3		Précision intra-essai				Précision inter-essais	
	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 1	Dilution 2		Jour 1	Jour 2	Jour 3		
1	1350	1275	1905	1642	1478	1619	Moyenne	1349	1684	1683	Moyenne	1572
	1339	1453	1623	1623	1759	1655	ET	61,94	115,78	99,70	ET	184,98
	1298	1297	1817	1682	1778	1712	CV (%)	4,6	6,9	5,9	CV (%)	11,8
	1420	1360	1611	1571	1695	1766						
2	461	458	380	479	503	389	Moyenne	431	436	455	Moyenne	440
	422	397	412	454	482	417	ET	26,58	33,03	44,00	ET	35,33
	396	454	453	457	489	449	CV (%)	6,2	7,6	9,7	CV (%)	8,0
	441	416	405	444	496	412						
3	175	178	144	167	164	209	Moyenne	175	160	182	Moyenne	172
	169	173	156	175	195	187	ET	7,88	15,47	14,93	ET	15,58
	166	192	158	180	178	179	CV (%)	4,5	9,7	8,2	CV (%)	9,1
	171	175	134	167	169	171						
4	100	104	91	87	86	101	Moyenne	113	97	93	Moyenne	101
	110	99	114	98	94	84	ET	11,41	10,68	9,86	ET	13,32
	118	125	105	99	79	92	CV (%)	10,1	11,0	10,6	CV (%)	13,2
	130	114	101	80	108	101						
5	25	24	23	26	19	20	Moyenne	25	25	23	Moyenne	24
	27	27	29	19	23	23	ET	2,97	3,85	3,21	ET	3,39
	31	21	30	23	26	20	CV (%)	11,7	15,4	13,9	CV (%)	13,9
	24	24	28	22	28	25						
6	17	24	19	28	15	21	Moyenne	19	18	24	Moyenne	20
	19	19	17	21	17	23	ET	2,60	5,88	9,22	ET	6,76
	19	22	15	7	14	33	CV (%)	13,5	32,7	38,2	CV (%)	33,1
	18	16	18	19	31	39						

Tableau 9 : Étude de précision - PR-3

Échant.	Résultats du jour 1		Résultats du jour 2		Résultats du jour 3		Précision intra-essai				Précision inter-essais	
	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 1	Dilution 2		Jour 1	Jour 2	Jour 3		
1	2535	2631	2723	2541	2447	2718	Moyenne	2583	2620	2609	Moyenne	2604
	2582	2674	2591	2713	2611	2596	ET	85,75	83,58	90,77	ET	84,36
	2501	2496	2649	2474	2597	2728/	CV (%)	3,3	3,2	3,5	CV (%)	3,2
	2726	2521	2632	2636	2542	2633						
2	1349	1536	1434	1501	1785	1414	Moyenne	1387	1427	1491	Moyenne	1435
	1318	1348	1408	1383	1489	1438	ET	96,71	68,84	144,02	ET	111,88
	1268	1445	1367	1517	1520	1452	CV (%)	7,0	4,8	9,7	CV (%)	7,8
	1323	1505	1325	1484	1547	1280						
3	113	118	109	119	107	116	Moyenne	120	113	112	Moyenne	115
	118	114	132	96	137	93	ET	7,76	11,92	14,42	ET	11,82
	137	118	108	124	98	110	CV (%)	6,4	10,6	12,8	CV (%)	10,3
	119	126	111	101	127	110						
4	79	79	73	85	81	79	Moyenne	78	80	79	Moyenne	79
	73	98	87	84	88	81	ET	9,67	7,06	5,80	ET	7,39
	70	76	76	73	73	72	CV (%)	12,4	8,8	7,3	CV (%)	9,4
	82	66	72	89	84	73						
5	15	22	28	15	14	16	Moyenne	22	20	22	Moyenne	21
	26	18	21	23	15	29	ET	3,74	6,75	6,57	ET	5,63
	21	23	7	27	22	19	CV (%)	17,3	33,5	30,6	CV (%)	26,7
	26	22	19	21	26	31						
6	53	53	54	48	52	56	Moyenne	56	52	56	Moyenne	55
	57	63	54	50	58	51	ET	4,43	3,56	6,52	ET	5,10
	52	61	56	50	66	46	CV (%)	7,6	6,8	11,6	CV (%)	9,3
	52	57	57	48	63	58						

Tableau 9 : Étude de précision - MBG

Échant.	Résultats du jour 1		Résultats du jour 2		Résultats du jour 3		Précision intra-essai				Précision inter-essais	
	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 1	Dilution 2		Jour 1	Jour 2	Jour 3		
1	773	611	798	672	901	782	Moyenne	733	740	812	Moyenne	762
	829	809	651	700	812	752	ET	91,15	75,47	48,50	ET	79,35
	706	638	883	705	796	803	CV (%)	12,4	10,2	60	CV (%)	10,4
	840	659	743	766	865	782						
2	796	728	651	646	882	794	Moyenne	742	714	842	Moyenne	766
	736	674	729	824	970	790	ET	54,40	61,63	62,90	ET	80,31
	715	706	676	700	844	821	CV (%)	7,3	8,6	7,5	CV (%)	10,5
	846	732	777	706	859	779						
3	115	124	90	93	119	128	Moyenne	116	87	112	Moyenne	105
	127	95	76	80	118	107	ET	11,93	12,40	10,69	ET	17,28
	115	118	101	64	95	101	CV (%)	10,3	14,3	9,6	CV (%)	16,5
	130	103	98	91	116	109						
4	163	130	107	83	94	92	Moyenne	112	98	98	Moyenne	103
	118	89	103	101	115	106	ET	27,21	7,86	8,67	ET	17,74
	122	86	103	96	95	102	CV (%)	24,2	8,1	8,8	CV (%)	17,3
	108	82	97	90	89	94						
5	41	15	29	36	14	2	Moyenne	22	21	25	Moyenne	23
	25	29	21	20	24	29	ET	9,68	9,74	11,63	ET	10,06
	13	17	20	26	30	31	CV (%)	44,0	45,6	46,5	CV (%)	44,1
	13	23	16	3	38	32						
6	41	26	16	50	39	24	Moyenne	28	33	21	Moyenne	27
	7	18	35	32	17	27	ET	10,91	14,10	9,05	ET	12,51
	33	31	55	33	19	11	CV (%)	39,1	45,9	43,6	CV (%)	46,0
	30	37	32	10	15	14						

3. Réactivité croisée

Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus et les analytes PR-3 ont été évalués pour une éventuelle réactivité croisée à d'autres anticorps et l'interférence de composants présents dans le sérum. Pour cet essai, 35 échantillons au total ont été évalués. Quinze échantillons étaient positifs aux anticorps de diverses maladies auto-immunes et infectieuses. Des 15 évalués, 1 a été réactif à l'analyte MPO et le même échantillon s'est avéré positif avec l'analyte PR-3. L'analyte MBG a été évalué pour une éventuelle réactivité croisée à d'autres anticorps et l'interférence de composants présents dans le sérum, avec un total de 26 échantillons. Vingt-six échantillons étaient positifs aux anticorps de diverses maladies auto-immunes et infectieuses. Sur les 26 échantillons étudiés, tous sont restés négatifs aux anti-MBG, ce qui tend à démontrer qu'une réactivité croisée est très peu probable. Par ailleurs, 10 échantillons contenant des niveaux élevés de MPO et 10 échantillons contenant des niveaux élevés de PR-3 ont été testés pour une réactivité croisée avec la MBG. Les 20 échantillons sont restés négatifs à la MBG, ce qui tend à démontrer qu'une réactivité croisée entre la MPO/PR-3 et la MBG est très peu probable.

4. Substances interférentes

Au total, 20 échantillons de MPO/PR-3 contenaient des substances potentiellement interférentes. Ces 20 échantillons présentaient soit des taux d'hémolyse anormaux (n = 5), soit des taux de bilirubine anormaux (n = 5), soit une concentration en IgG au-dessus de la normale (n = 5), soit des taux de lipides au-dessus de la normale (n = 5). Deux échantillons se sont révélés positifs avec les analytes MPO et PR-3. Au total, 6 échantillons MBG testés contenaient des substances potentiellement interférentes. Ces 6 échantillons étaient caractérisés par des taux anormaux d'hémolyse (n = 2), de bilirubine (n = 2), des taux au-dessus de la normale de lipides (n = 2), d'albumine (n = 2), de cholestérol (n = 2) ou de triglycérides (n = 2). Le résultat qualitatif pour ces six échantillons est resté inchangé à l'exception d'un échantillon marqué par un taux élevé de cholestérol et de deux échantillons marqués par des taux élevés de triglycérides. Les échantillons lipémiqes peuvent interférer avec les résultats de l'essai. Il faudra donc éviter d'utiliser de tels échantillons.

RÉFÉRENCES

1. Davies D, Moran ME, Niall JF, Ryan GB: Segmental glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology. *Br. J. Med.* 285: 606, 1982
2. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tools for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1: 425-429, 1985.
3. Feehally J, Wheeler DC, Walls J, *et al*: A case of microscopic polyarteritis associated with antineutrophilia cytoplasmic antibodies. *Clin. Nephrol.* 27: 214-215, 1987
4. Falk RJ, Becker M, Terrell R, Jennette JC: Antigen specificity of P-ANCA and C-ANCA (Abstract). The 3rd International Workshop on ANCA, Washington, DC 1990: 2-3.
5. Jennette JC, Falk RJ: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N.Engl.J. Med.* 318: 1651-1657, 1988.
6. Savage COS, Tizard J, Jayne D, *et al*: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Kawasaki disease. *Arch. Dis. Child.* 64: 360-363, 1989.
7. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J: Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J. Intern. Med.* 238: 143-152, 1995.
8. Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterisation of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture syndrome: *Kidney Int.* 46: 823-829, 1994.
9. Wieslander J, Barr J, Butkowski R, Edwards S, Bygren P, Heinegard D, Hudson B: Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: Localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3838-42, 1984.
10. Butkowski R, Wieslander J, Wisdom B, Barr J, Noelken M, Hudson B: Properties of the globular domain of type IV collagen and its relationship to the Goodpasture antigen. *J. Biol. Chem.* 262: 7874-7877, 1987.
11. Butkowski R, Langveld J, Wieslander J, Hamilton J, Hudson B: Localization of Goodpasture epitope to novel chain of basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* 260: 3739-3747, 1985.
12. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 4th Ed., 1999.
13. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration; Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. *Fed.Register* 56:64175-64182, 1991.
14. Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline. *NCCLS/CLSI Document M29, Vol.17(12)*, 1997.
15. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). *CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3)*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Appel gratuit (É-U) : 1-800-286-2111, Option 2

International : +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Site Web: www.zeusscientific.com

AtheNA Multi-Lyte et **SAVE Diluent** sont des marques de commerce de ZEUS Scientific, Inc.

Service clients aux États-Unis : contactez votre distributeur local.

Assistance technique aux États-Unis : contactez ZEUS Scientific ;

appelez pi écrivez à support@zeusscientific.com.

Service clients et assistance technique hors des États-Unis :

contactez votre distributeur local.

© 2021 ZEUS Scientific, Inc. Tous droits réservés.

