

Évaluation de la pratique en urgence de la recherche des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles

Caroline Poli^{a,b}, Pierre-Antoine Deguigne^a, Jean-François Augusto^{b,c}, Jean-François Subra^{b,c}, Alain Chevailler^{a,b,*}

1. Introduction

Les autoanticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ACPN ou ANCA pour anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) sont dirigés contre des enzymes leucocytaires intra-granulaires. Leur détection fait appel à des tests d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur polynucléaires humains fixés à l'éthanol. Avec ce fixateur, trois aspects sont décrits : cytoplasmique (cANCA), périnucléaire (pANCA) et atypique (aANCA). L'utilisation d'autres fixateurs (formol, méthanol) permet de les préciser et de distinguer les pANCA des anticorps antinucléaires. La spécificité des ANCA est recherchée par des tests en phase solide (ELISA, immunodot et multiplexage) [1]. À titre élevé et avec une spécificité identifiée (anti-protéine 3 [PR3] ou anti-myéloperoxydase [MPO]), les ANCA sont de bons marqueurs diagnostiques et évolutifs des vascularites nécrosantes primitives : cANCA de spécificité anti-PR3 et granulomatose avec polyangéite (GPA pour granulomatosis with polyangitis, anciennement maladie de Wegener), pANCA de spécificité anti-MPO et micropolyangéite [2]. A titre faible, parfois de spécificité anti-MPO, mais le plus souvent dirigés contre des antigènes mineurs ou de spécificité indéterminée, ils se rencontrent dans un éventail beaucoup plus large de maladies, avec ou sans signe de vascularite. Le clinicien doit garder présent à l'esprit la possible survenue

d'ANCA dans des pathologies infectieuses chroniques, comme l'endocardite [3], qui ne seraient qu'être aggravées par un traitement immunosuppresseur délivré sur la seule positivité sérologique.

Néanmoins l'association des ANCA à des situations cliniques pouvant mettre en jeu le pronostic vital, tel que le syndrome pneumorénal avec son risque d'hémorragie intra-alvéolaire massive, justifie que leur recherche soit à considérer comme un examen d'urgence [1]. Certaines vascularites associées aux ANCA peuvent mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel, qu'elles se traduisent par une glomérulonéphrite rapidement progressive ou un syndrome pneumorénal. Dans un tel contexte [4], la décision de mettre en route un traitement immunosuppresseur lourd et non dénué d'effets secondaires, mais seul à même de préserver le pronostic, ne peut attendre la confirmation diagnostique apportée par l'examen anatomopathologique de l'organe biopsié, le rein le plus souvent. La recherche des ANCA, habituellement exécutée par séries programmées, doit alors se faire en urgence dans la journée, en associant IFI et test en phase solide, immunodot, fluorométrie ou multiplexage (ou ALBIA pour adressable laser bead immunoassays), mieux adaptés à une demande ponctuelle que l'ELISA en microplaque [5].

Nous présentons l'expérience angevine de neuf années de pratique d'une telle stratégie, qui, jusqu'ici, n'a fait l'objet que de peu d'évaluation [6]. Nous finissons par un cas clinique récent qui illustre les difficultés rencontrées.

2. Évaluation de l'expérience angevine

2.1. Définition de l'étude et patients

La procédure de la recherche des ANCA en urgence au laboratoire d'immunologie et d'allergologie du CHU d'Angers, aux heures ouvrables du lundi au samedi matin, est en place depuis janvier 2005, formalisant une pratique beaucoup plus ancienne eu égard à l'implication des immunologistes et des néphrologues angevins dans le champ des vascularites associées aux ANCA (AAV pour ANCA associated vasculitis) [7]. En cas de suspicion d'AAV, sur appel d'un clinicien senior qui argumente sa demande à un biologiste senior, celui-ci décide de la mise en route de la procédure qui associera toujours une recherche par IFI des ANCA, mais aussi

a Laboratoire d'immunologie et d'allergologie

Département d'hématologie et d'immunologie
Plateau de biologie hospitalière (PBH)
Institut de biologie en santé (IBS)
Centre hospitalier universitaire d'Angers
49933 Angers cedex 09

b UMR Inserm 892 – CNRS 6299 – CRCNA

Université d'Angers
Equipe Immunité innée et immunothérapies
49933 Angers cedex 09

c Service de néphrologie-dialyse-transplantation

Centre hospitalier universitaire d'Angers
49933 Angers cedex 09

* Correspondance

AlChevailler@chu-angers.fr

des anticorps anti-membranes basales glomérulaires (MBG), et un test en phase solide (immunodot et/ou ALBIA) à la recherche des ANCA anti-PR3, ANCA anti-MPO et anticorps anti-MBG. Les recommandations internationales [6], rappelées lors du dernier congrès international d'avril 2013 à Paris [8] sont appliquées : seuls ont été retenus les sérums positifs en IFI et par au moins un test en phase solide. Seuls les résultats des patients hospitalisés au CHU ont été pris en compte. Cette étude a été approuvée par le Comité de protection des personnes du CHU (CE-2013-65).

2.2. Méthodes

La recherche des ANCA en immunofluorescence indirecte (IFI) utilise des lames commerciales (Euroimmun, distribuées par BioAdvance) qui associent dans un même puits des frottis de polynucléaires neutrophiles humains fixés par l'éthanol, le formol et le méthanol et des cellules HEp-2. La recherche de la spécificité a reposé sur un immunodot (D-tek, distribué par DiaSorin) identifiant les spécificités PR3, MPO et MBG et/ou un test ELISA de dépistage des spécificités PR3, MPO, élastase, cathepsine G, lactoferrine et bactericidal/permeability increasing protein (BPI) (Euroimmun, distribuées par BioAdvance).

2.3. Statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (déviation standard) ou en pourcentage. Les variables quantitatives ont été comparées en utilisant le test du Chi-2 et les variables qualitatives en utilisant le test de Mann-Whitney. Pour tous les calculs, un $p < 0,05$ est considéré comme significatif. Les analyses ont été faites à l'aide du logiciel SPSS15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

2.4. Résultats

De janvier 2005 à décembre 2012 on recense 114 demandes d'ANCA en urgence. La moyenne d'âge des patients est de $56,9 \pm 25$ [1,1-89,8] ans et 63 % sont des hommes. Pendant cette même période, 11 147 demandes standards d'ANCA ont été faites, ce qui donne une fréquence de 1 % pour les demandes en urgence. Aucune variation significative n'est notée quant au jour de la semaine.

Les services de néphrologie et de réanimation médicale représentent 57,4 % des demandes. Le dépistage est effectué en moyenne 1,5 jour après l'admission du patient et pour 64 % d'entre eux dans un délai de 2 jours. Les signes cliniques évocateurs de AAV justifiant la demande en urgence sont ceux de la classification de Chapel Hill [2] et sont regroupés dans le **tableau 1**. La majorité des patients ont de la fièvre, un syndrome inflammatoire et une atteinte rénale ou respiratoire. L'atteinte rénale est présente chez 73,7 % des patients, principalement sous la forme d'une insuffisance rénale aiguë avec une protéinurie et/ou une hématurie. La moitié des patients ont une atteinte respiratoire avec une dyspnée, une toux et/ou des hémoptysies ; les atteintes digestives, rhumatologiques, cutanées ou ORL sont moins fréquentes. Parmi les 114 patients, 31 (27,2 %) ont des cANCA (6) ou des pANCA (9) typiques, des cANCA ou des pANCA atypiques (12) ou des aANCA (4). La **figure 1** reprend les diagnostics en fonction des résultats d'IFI et des tests en phase solide.

Parmi les 83 patients sans ANCA, seuls quatre ont une vascularite : deux EGPA (granulomatose éosinophile avec polyangéite, anciennement syndrome de Churg et Strauss), un purpura rhumatoïde et une artérite gigantomégaclaire.

Douze nouveaux cas (10,5 %) d'AAV ont été identifiés (5 MPA, 5 GPA et 2 EGPA) [2]. Les cinq patients avec une MPA ont des pANCA anti-MPO, alors que ceux avec une GPA ont des cANCA anti-PR3 pour quatre d'entre eux et des pANCA anti-MPO pour le cinquième. Les deux patients avec une EGPA n'ont pas d'ANCA. La sensibilité et la spécificité de la recherche des ANCA en urgence pour les nouveaux cas d'AAV sont respectivement de 83,3 % et 83,5 %. Lorsque l'analyse est restreinte aux seuls cANCA anti-PR3 et pANCA anti-MPO typiques en IFI, les chiffres sont les suivants : sensibilité de 82,3 % et spécificité de 100 %. Parmi les signes cliniques, seule l'atteinte sinusienne est significativement associée aux AAV.

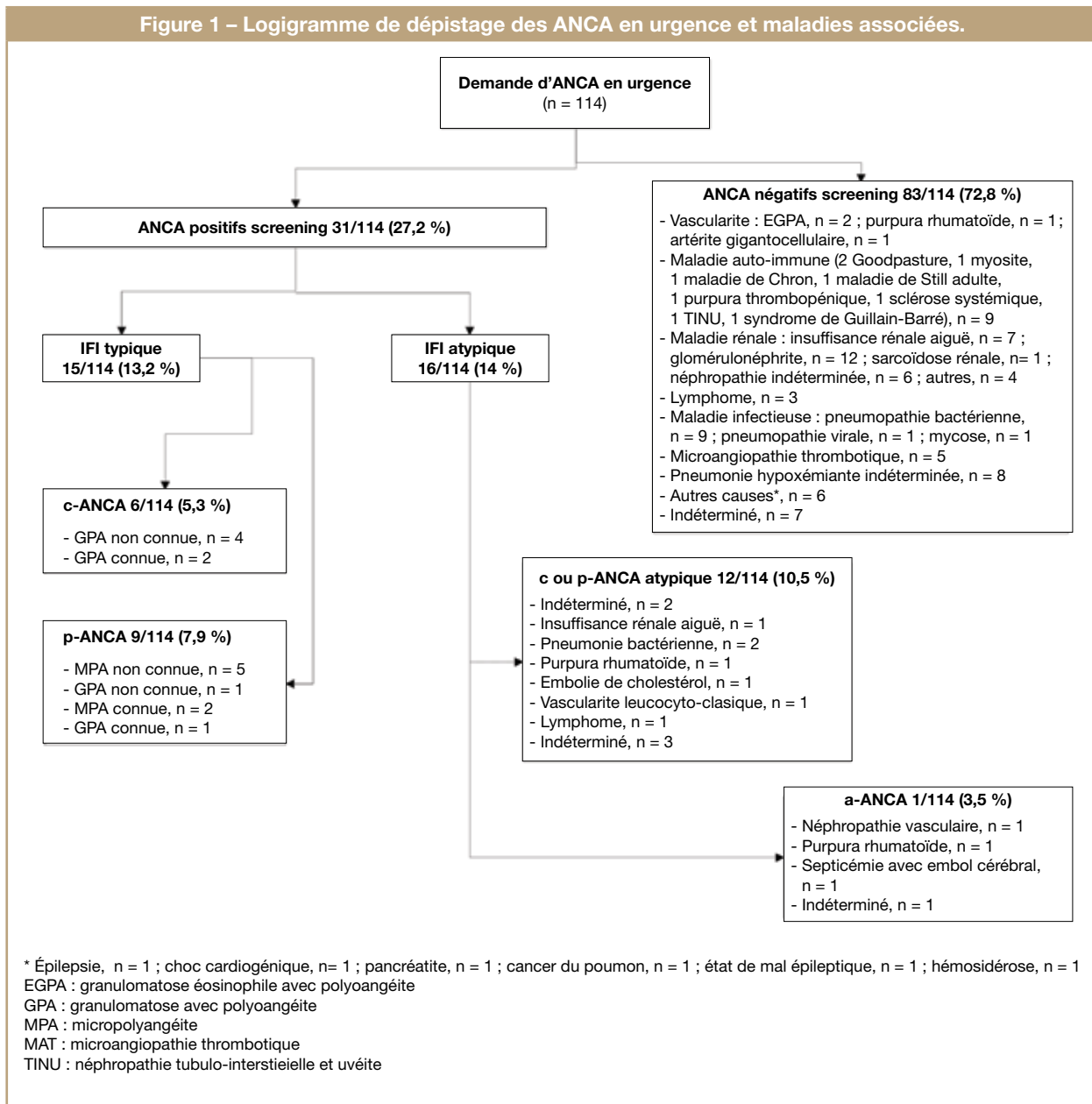
L'impact du résultat biologique sur la prise en charge thérapeutique, confronté aux données histologiques, montre que parmi les 83 patients sans ANCA, seuls les deux patients atteints d'EGPA ont reçu un traitement

Tableau 1 – Données clinicobiologiques de la population étudiée.

	Cohorte globale (n = 114)	Patients non AAV (n = 96)	Patients AAV (n = 18)
Age (années)	56,9 \pm 25	55,6 \pm 26	63,9 \pm 14
Sexe (homme/femme)	72/42	58/38	14/4
Signes cliniques, n (%)			
Fièvre	39 (34,2)	33 (34,4)	6 (33,4)
Atteinte rénale	84 (73,7)	69 (71,9)	15 (83,3)
- Hypertension	39 (34,2)	32 (33,3)	7 (38,9)
- IRA	61 (53,5)	53 (55,2)	8 (44,4)
- Protéinurie	75 (65,8)	62 (64,6)	13 (72,2)
- Hématurie	57 (50)	47 (49)	10 (55,6)
Atteinte respiratoire	49 (43)	38 (39,6)	11 (61,1)
- Dyspnée	41 (36)	33 (34,4)	8 (44,4)
- Hémoptysie	14 (12,3)	11 (11,5)	3 (16,7)
Arthrite	15 (13,2)	10 (10,4)	5 (27,8)
Purpura	20 (17,5)	17 (17,7)	3 (16,7)
Sinusite	6 (5,3)	2 (2,1)	4 (22,2)**
Péri/myocardite	5 (4,4)	4 (4,2)	1 (5,6)
Signes biologiques, n (%)			
Syndrome inflam	93 (81,6)	75 (78,1)	18 (100)
Anémie	88 (77,2)	73 (76)	15 (83,3)
Hyperéosinophilie	9 (7,9)	7 (7,3)	2 (11,1)
AAN*	28 (24,6)	22 (22,9)	6 (33,3)

*AAN = anticorps antinucléaires, titre > 1/200.
**p < 0,005.

Figure 1 – Logigramme de dépistage des ANCA en urgence et maladies associées.



classique d'AAV. Parmi les dix patients avec une AAV nouvellement identifiée, sept d'entre eux ont reçu un traitement immunosuppresseur selon les protocoles validés dans les 24 heures du résultat biologique. Pour six d'entre eux la confirmation histologique est survenue dans un délai de 24 heures. Pour les quatre derniers patients, les biopsies n'ont pas été contributives.

2.5. Discussion

Dans cette étude nous avons évalué la performance de la recherche en urgence des ANCA. À notre connaissance, une seule publication antérieure fait état d'un travail similaire [9]. Notre procédure de sélection des indications reposant sur un dialogue entre cliniciens et biologistes peut sembler moins sélective que les standards usuels de prescription des ANCA [6]. Quoiqu'il en

soit, compte tenu des signes cliniques affichés par les patients à la demande en urgence des ANCA (*tableau I*), nous supposons que notre procédure est valide pour sélectionner des patients atteints d'AAV. Parmi les signes cliniques, seule l'atteinte des sinus est significativement associée avec les AAV, confirmant la relative spécificité de l'atteinte ORL dans la GPA.

Nous retrouvons des ANCA par IFI chez 27,2 % des patients et des c/pANCA anti-PR3/MPO chez 13,2 %. Nous observons de bonnes valeurs de sensibilité et spécificité pour les patients avec la découverte d'une AAV. Seuls deux patients avec une EGPA n'ont pas d'ANCA, comme c'est le cas pour cette pathologie dans près de la moitié des cas [10]. L'utilisation de guides de prescription des ANCA approuvés par des conférences nationales ou internationales de consensus permet d'augmenter le taux de positivité des recherches sans risque de

Tableau II – Revue des études analysant l’apport de la recherche des ANCA au diagnostic d’AAV.

Référence	Filtre	n	IFI + n, (%)	MPO-/PR3-ANCA n, (%)	Sensibilité (%) IFI/ELISA	Spécificité (%) IFI/ELISA	VPP (%) IFI/ELISA	VNP (%) IFI/ELISA
[4]	oui	287	57 (26,9)	nd	nd/nd	nd/nd	73,7/nd	nd/nd
[11]	oui	nd	nd (30,3)	nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
[14]	non	615	nd	nd	64/59,3	91,5/96	55/70,8	94/93,3
[12]	non	497	nd	nd (4,8)	nd/81	nd/98	nd/54	nd/99
[15]	non	1127	110 (9,8)	21 (1,9)	nd/100	nd/99,9	nd/75	nd/100
[16]	non	10803	644 (6)	129 (1,2)	nd/nd	nd/nd	na/84,5	nd/nd
Étude présente	oui	114	31 (27,2)	15 (13,2)	83,3/83,3	83,5/100	38,5/100	97,6/98

Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative pour le diagnostic de AAV sont données en ne considérant que les échantillons positifs en IFI ou IFI + MPO ou PR3.
n, nombre; IFI, immunofluorescence indirecte; VPPV, valeur prédictive positive; VNP, valeur prédictive négative; nd, non disponible.

méconnaître des diagnostics d’AAV [11-13]. Dans notre étude nous retrouvons le même taux de positivité par IFI que dans ces études (**tableau II**), démontrant que notre pratique dans un contexte d’urgence reposant sur un dialogue clinicobiologique est aussi efficace que les guides cliniques publiés [11-16].

Dans les AAV, la détection et la mise en route du traitement rapides sont particulièrement critiques pour assurer la réparation *ad integrum* des organes atteints, notamment le rein. Pour ces pathologies de faible incidence, pouvant se présenter de manière protéiforme mais souvent de manière incomplète au début, le biologiste a besoin d’une stratégie avec des tests garantissant une bonne sensibilité pour ne pas méconnaître le diagnostic d’AAV et une bonne spécificité pour ne pas démarrer à tort un traitement immunosuppresseur lourd. Dans notre étude, eu égard à son caractère rétrospectif, l’impact du résultat de la recherche des ANCA en urgence est difficile à analyser. Le traitement immunosuppresseur standard des AAV a été initié dans les 24 heures suivant la demande d’ANCA en urgence pour sept des dix patients nouvellement étiquetés AAV, ce qui plaide pour une accélération de l’initiation du traitement. Pour quatre d’entre eux, il faut cependant pondérer cette hypothèse par le fait que la ponction biopsie rénale a été pratiquée dans la foulée avec une confirmation histologique de la glomérulonéphrite extracapillaire disponible en moins de 24 heures après la biologie. Pour ces quatre patients l’apport de la stratégie de prescription des ANCA en urgence peut être considéré comme substantiel, ce qui n’est pas le cas des quatre autres pour qui la biopsie a été plus tardive ou non contributive.

La principale limite de notre étude est notre incapacité à analyser les demandes d’ANCA en urgence refusées par les biologistes, situation peu fréquente au demeurant. Il serait cependant intéressant d’évaluer en prospectif

si notre stratégie décisionnelle ne nous amène pas à récuser des patients ayant au final une authentique AAV. Néanmoins cette question a déjà fait l’objet de l’étude de Arnold et coll. [11] qui ont, eux aussi, appliqué un algorithme clinique pour la décision de réalisation de la recherche des ANCA. Ces auteurs font la preuve qu’une telle approche est sûre, puisqu’aucun des patients pour qui la recherche des ANCA a été déclinée n’a développé d’AAV.

2.6. Conclusion

La recherche d’ANCA en urgence encadrée par un filtre de prescription reposant sur un dialogue entre clinicien et biologiste senior est opérationnelle pour le diagnostic des AAV.

3. Cas clinique

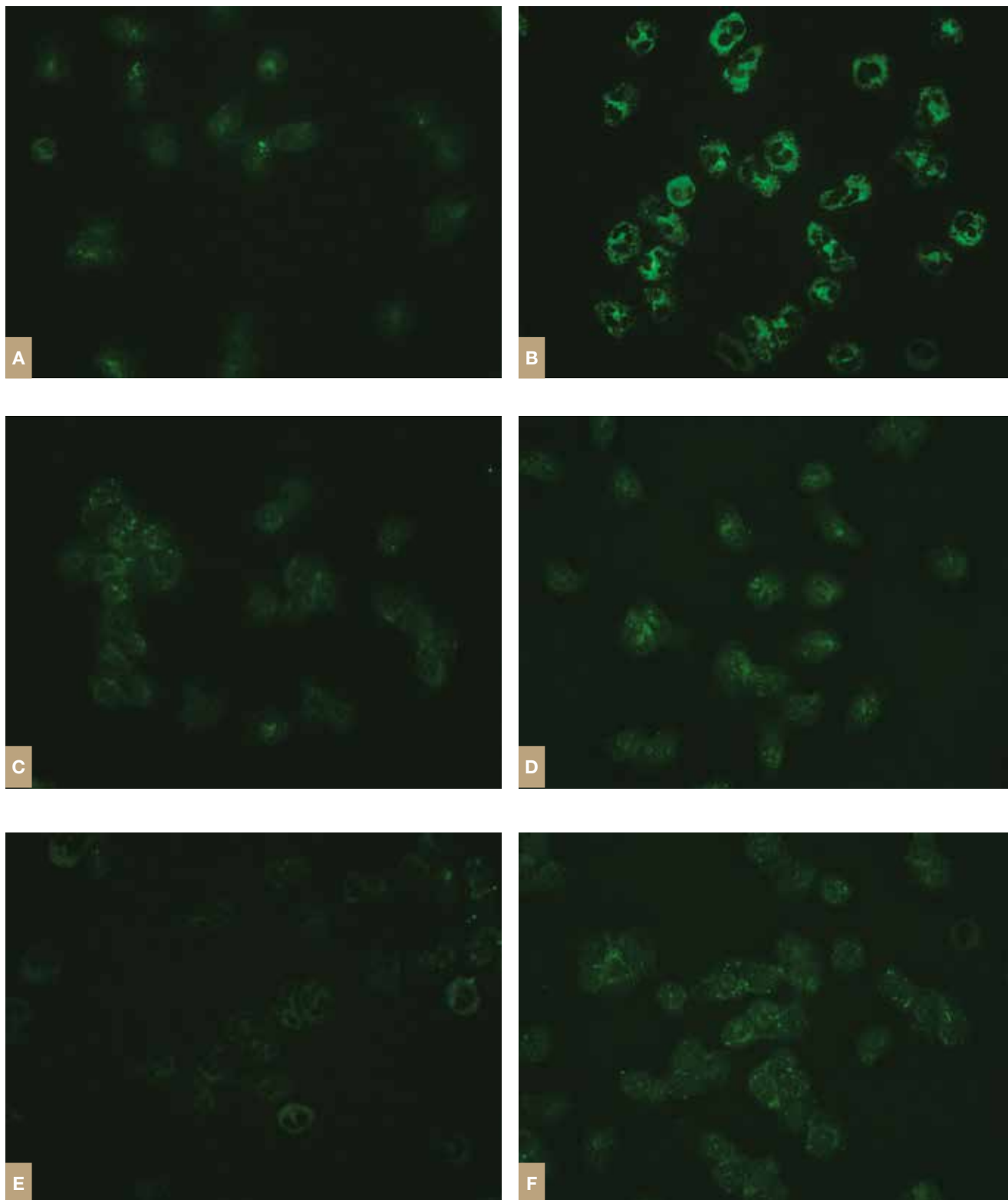
Pour finir, nous illustrerons par un cas clinique la difficulté de la certitude diagnostique devant une suspicion de vascularite nécrosante primitive.

Il s’agit d’une femme, née le 24 mars 1940, qui présente en décembre 2013 une glomérulonéphrite rapidement progressive. Ses antécédents médicaux sont multiples : i) coarctation de l’aorte, connue depuis au moins cinq ans, pour laquelle la patiente refuse toute intervention chirurgicale et qui est responsable d’une hypertension artérielle sévère ; ii) diabète de type deux, insulinorequérant ; iii) hypothyroïdie substituée ; iv) polyarthrite rhumatoïde traitée par méthotrexate et corticoïdes ayant entraîné une insuffisance corticotrope.

Elle est hospitalisée le 9 décembre 2013 dans un premier centre hospitalier général pour une altération de l’état général depuis environ un mois avec asthénie et anorexie. On lui découvre une anémie à 9 g/dL, normochrome

Figure 2 – Détection des ANCA par IFI.

Le sérum de la patiente est dilué au 1/20^e et incubé pendant 30 minutes sur des lames qui associent dans un même puits des frottis de polynucléaires neutrophiles humains fixés par l'éthanol, le formol et le méthanol et des cellules HEp-2 (Euroimmun™, distribué par BioAdvance). La deuxième étape repose sur une incubation de 30 minutes avec un antisérum anti-IgG marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine, suivi d'une lecture au microscope équipé en illumination. Seuls les polynucléaires fixés avec le formol donnent une faible fluorescence cytoplasmique granulaire (B) alors que ceux fixés par l'éthanol (A) et le méthanol (C) sont négatifs et identiques à ceux incubés avec un sérum humain normal (éthanol [D]; formol [E]; méthanol[F]).



normocytaire. Le myélogramme écarte les diagnostics de myélome et d'envahissement néoplasique. Une recherche de sang dans les selles revient positive, justifiant la programmation d'un examen endoscopique. Sur le plan thérapeutique, le méthotrexate est arrêté, la patiente reçoit trois concentrés globulaires et un traitement par érythropoïétine est initié. Une insuffisance rénale aiguë est découverte avec une créatininémie à 274 $\mu\text{mol/L}$ pour une antériorité à 90 $\mu\text{mol/L}$ en septembre 2013. L'échographie rénale ne montre pas d'obstacle et la protéinurie est à 1 g/jour. Devant des signes de surcharge, avec une prise de poids de huit kilogrammes, la patiente est d'abord transférée le 26 décembre, après arrêt du RAMIPRIL et majoration du furosémide, dans un deuxième centre hospitalier général, puis au bout de vingt-quatre heures dans le service de néphrologie du CHU d'Angers.

À l'examen clinique d'entrée, le poids est à 72 kilogrammes. La patiente est apyrétique, hypertendue à 196/69 mmHg. Le pouls est régulier à 71/mn. Il n'y a

pas de dyspnée ni de douleur thoracique. L'auscultation cardiaque retrouve le souffle systolique de coarctation aortique. Il existe des œdèmes des membres inférieurs, prenant le godet et remontant jusqu'aux genoux. L'auscultation pulmonaire est normale tout comme l'examen abdominal. Les pouls périphériques sont bien perçus et les aires ganglionnaires sont libres. Il n'y a pas de déformations articulaires. Il existe un purpura des membres inférieurs.

La biologie confirme l'insuffisance rénale rapidement progressive (créatininémie à 437 $\mu\text{mol/L}$, urée à 24,7 mmol/L, albuminémie à 22 g/L pour une protidémie à 78 g/L).

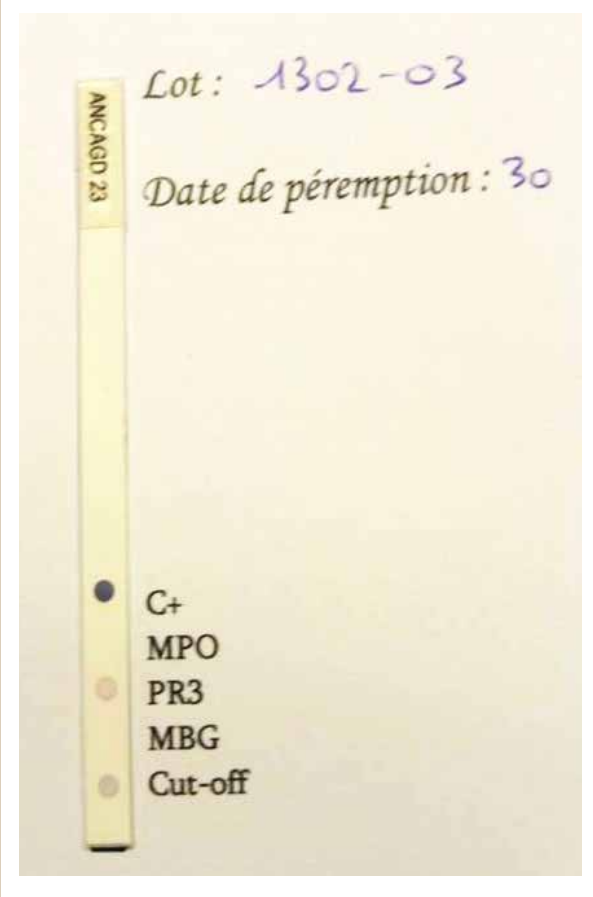
Devant ce tableau associant altération de l'état général, insuffisance rénale progressive et purpura, une demande d'ANCA en urgence est faite le 30 décembre. En IFI, seul le frottis de polynucléaires fixés par le formol donne indiscutablement une fluorescence cytoplasmique typique de cANCA (*figure 2*). Pour les résultats de la recherche des ANCA anti-PR3 par tests en phase solide, qui seront tous réalisés au vu de la confrontation des résultats de l'IFI avec ceux du premier (ALBIA), les résultats sont contrastés : l'ELISA de dépistage est positif à 1,458 (seuil de positivité supérieur à 1), l'immunodot est douteux juste au niveau du contrôle seuil (*figure 3*) et les deux derniers sont négatifs « forts » (0,5 pour l'ALBIA et 1,3 U/mL pour l'EliA). La conclusion du biologiste est : « présence de cANCA anti-PR3 de spécificité restreinte (réponse oligoclonale), expliquant la plus ou moins bonne réactivité dans les tests selon l'accessibilité des épitopes reconnus par les anticorps de la patiente ». Le lendemain la ponction biopsie rénale confirmera la présence d'une glomérulonéphrite extra-capillaire, cependant particulière par la présence de quelques dépôts d'IgM et de C3 avec infiltrat inflammatoire interstitiel parfois granulomateux. Le traitement immédiatement mis en route associe trois bolus de solumédrol relayés par une corticothérapie per os, sept échanges plasmatiques et du cyclophosphamide. L'amélioration de la fonction rénale est progressive, avec une créatininémie passant de 437 à 300 $\mu\text{mol/L}$ le 22 janvier à la sortie de la patiente.

Ce cas clinique illustre les difficultés à poser le diagnostic d'AAV. Cette patiente, recevant une immunosuppression pour sa polyarthrite rhumatoïde, a développé une AAV dont la réponse autoanticorps a été restreinte par les effets des corticoïdes et du méthotrexate [1]. Les cANCA n'ont pu être mis en évidence que parce qu'une batterie de tests a été réalisée. Les messages à retenir sont les suivants : i) pour l'IFI, il faut impérativement associer des frottis de PNN fixés par l'éthanol et le formol ; dans le cas présent, la seule recherche avec des frottis fixés par l'éthanol aurait conclu à la négativité ; ii) pour les tests en phase solide, au moindre doute, qui ne peut provenir que de la clinique, d'où l'importance du dialogue clinicobiologique, il ne faut pas hésiter à les multiplier : dans le cas présent, c'est bien parce que, en association avec un résultat suspect d'IFI, le résultat d'ALBIA n'était pas bien négatif que l'enquête a été poursuivie.

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Figure 3 – Immunodot pour la recherche des ANCA anti-MPO et anti-PR3 et des anticorps anti-membrane basale glomérulaire.

L'immunodot (D-tek, distribué par Diasorin) associe les antigènes myéloperoxydase (MPO), protéinase 3 (PR3) et membranes basales glomérulaires (MBG). Pour les ANCA anti-PR3, l'intensité du dot est juste au niveau de celui du contrôle seuil, donnant donc un résultat douteux.



Références

- [1] Beauvillain C, Jeannin P, Delneste Y, et al. Auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) : cibles antigéniques, méthodes diagnostiques. *EMC Biologie médicale* 2012; 7(2):1-14 [Article 90-30-0005-A].
- [2] Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65(1):1-11.
- [3] Subra jf, Michelet c, laporte j, et al. The presence of cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies (C-ANCA) in the course of subacute bacterial endocarditis with glomerular involvement, coincidence or association? *Clin Nephrol* 1998;49(1):15-8.
- [4] Sinclair D, Stevens JM. Role of antineutrophil cytoplasmic antibodies and glomerular basement membrane antibodies in the diagnosis and monitoring of systemic vasculitides. *Ann Clin Biochem* 2007; 44(Pt 5):432-42.
- [5] Luxton G, Langham R. ANCA serology in the diagnosis and management of ANCA-associated renal vasculitis. *Nephrology* 2008;13:S17-S23.
- [6] Savage J, Gillis D, Benson E, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111(4):507-13.
- [7] Beauvillain C, Delneste Y, Renier G, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how should the biologist manage them? *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35:47-58.
- [8] Csernok E. Relevance of ANCA techniques for ANCA testing. *Presse Med* 2013;42(4, cahier 2):582-4.
- [9] Aslam A, Newman TL, Misbah SA. Audit of the clinical usefulness of a rapid qualitative ELISA screen for antimyeloperoxidase and anti-proteinase 3 antibodies in the assessment of patients with suspected vasculitis. *J Clin Pathol* 2003;56(10):775-7.
- [10] Beauvillain C, Jeannin P, Delneste Y, et al. ANCA et vascularites: diagnostic et physiopathologie. *EMC Biologie médicale* 2012;7(2):1-13 [Article 90-30-0005-B].
- [11] Arnold DF, Timms A, Luqmani R, et al. Does a gating policy for ANCA overlook patients with ANCA associated vasculitis? An audit of 263 patients. *J Clin Pathol* 2010;63:678-80.
- [12] Mandl LA, Solomon DH, Smith EL, et al. Using antineutrophil cytoplasmic antibody testing to diagnose vasculitis: can test-ordering guidelines improve diagnostic accuracy? *Arch Intern Med* 2002;162:1509-14.
- [13] Sinclair D, Saas M, Stevens JM. The effect of a symptom related "gating policy" on ANCA requests in routine clinical practice. *J Clin Pathol* 2004;57:131-4.
- [14] Russell KA, Wiegert E, Schroeder DR, et al. Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies under actual clinical testing conditions. *Clin Immunol* 2002;103(2):196-203.
- [15] Robinson PC, Steele RH. Appropriateness of antineutrophil cytoplasmic antibody testing in a tertiary hospital. *J Clin Pathol* 2009;62:743-45.
- [16] Tsvieriotis K, Tsirogianni A, Pipi E, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies testing in a large cohort of unselected Greek patients. *Autoimmune Dis* 2011:article 626495.