

Reagents

Pour usage diagnostique *in vitro*. Complexité CLIA : modérée

RÉF

701263

Rx Only

Utilisation prévue

QUANTA Flash Ro52 est un immunodosage par chimiluminescence destiné à la mesure semi-quantitative des autoanticorps IgG anti-Ro52 dans le sérum humain. La présence de ces autoanticorps anti-Ro52 peut être utilisée en association avec des résultats cliniques et d'autres tests de laboratoire pour faciliter le diagnostic du lupus érythémateux systémique, du syndrome de Sjögren, de la sclérodémie généralisée et de la myopathie inflammatoire idiopathique.

Résumé et explication du test

Les anticorps anti-Ro (SS-A), décrits pour la première fois dans le cadre du lupus érythémateux systémique (LES) et du syndrome de Sjögren (SS), constituent la principale spécificité des antigènes nucléaires solubles (ENA) identifiée par les laboratoires¹. Deux types d'anticorps anti-Ro ont été décrits : anti-Ro 52 kDa (SS-A 52) et anti-Ro 60 kDa (SS-A 60). Chacun est dirigé contre un antigène différent. Ces autoanticorps ont tout d'abord été considérés comme un système uniforme. Cependant, des études récentes ont démontré que Ro60 et Ro52 n'appartenaient pas à un complexe macromoléculaire stable et que les anticorps correspondants présentaient des associations cliniques différentes.² L'antigène Ro52 a récemment été identifié comme une protéine TRIM21.³

Les autoanticorps Ro52 sont souvent présents dans les sérums de patients souffrant d'un SS (40-70 %) ou d'un LES (20-40 %). De plus, les anticorps anti-Ro possèdent tous deux une importance diagnostique spécifique concernant le bloc cardiaque congénital. Le bloc auriculo-ventriculaire congénital (BAVC) isolé est fortement corrélé à la présence chez la mère d'anticorps anti-Ro et anti-SSB (La) ; les risques relatifs maximum de BAVC sont observés chez les enfants de mères présentant des anticorps anti-protéines SS-B 52 kDa et 48 kDa.⁴

Les anticorps anti-Ro52 ne sont pas toujours détectés par les dosages sérologiques du Ro courants. Il faut noter qu'il est possible de manquer l'une des réactivités individuelles, vis-à-vis de Ro52 ou Ro60, dans un dosage Ro ELISA classique avec mélange des deux antigènes. Environ 20 % des échantillons positifs à Ro52 ou Ro60 ne sont pas détectés en cas de mélange des deux antigènes.^{2,5} Il est donc important de doser individuellement chaque anticorps spécifique.

Bien que les anticorps anti-Ro52 soient principalement présents conjointement aux anticorps anti-Ro60 chez les patients souffrant d'un LES ou du SS, une fréquence élevée d'anticorps anti-Ro52 isolés a été décrite chez des patients souffrant d'une sclérodémie généralisée et d'une myopathie inflammatoire idiopathique (MII).⁵⁻⁷ La prévalence d'anticorps anti-Ro52 dans le cas d'une sclérodémie généralisée et d'une myosite est considérablement plus élevée que celle des anticorps anti-Ro60. La prévalence globale des anticorps anti-Ro52 a atteint 27 % dans une étude portant sur 1010 patients souffrant de sclérodémie généralisée.⁵ Dans cette même étude, les anticorps anti-Ro52 étaient présents dans 92 % des échantillons du groupe de sclérodémie généralisée, défini par la présence d'anticorps anti-Ro60.⁵ Les anticorps anti-Ro52 isolés (sans anticorps anti-Ro60) sont présents chez 20 à 37 % des patients atteints de MII. Cependant, dans les sérums de MII positifs aux anticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétase (anti-Jo1), le taux d'anticorps anti-Ro52 était bien plus élevé (58 %).⁷ De plus, la coexistence d'anticorps anti-Ro52 et anti-Jo-1 semble être un facteur prédictif d'une maladie pulmonaire interstitielle relativement sévère chez les patients souffrant d'une MII.^{8,9}

Principes du test

L'antigène Ro52 recombinant purifié est revêtu sur des billes paramagnétiques, stockées sous forme lyophilisée dans la cartouche de réactifs. Lorsque la cartouche de test est prête à être utilisée pour la première fois, une solution tampon est ajoutée au tube contenant les billes préservées pour les remettre en suspension avec le tampon. Elle est ensuite chargée sur l'appareil BIO-FLASH®.

L'appareil dilue un échantillon de sérum patient dans une cuvette en plastique jetable selon le rapport 1:23. De petites quantités de sérum de patient dilué, les billes de Ro52 et le tampon de dosage sont tous placés dans une seconde cuvette, puis mélangés. Cette cuvette est incubée à 37 °C. Les billes sont ensuite magnétisées et lavées plusieurs fois. Puis, l'anticorps IgG antihumain conjugué à l'isoluminol est ajouté à la cuvette et incubé à 37 °C. De nouveau, les billes sont magnétisées et lavées plusieurs fois. Le conjugué d'isoluminol produit une réaction lumineuse lorsque les réactifs « déclencheurs » sont ajoutés dans la cuvette. Le système optique BIO-FLASH mesure la lumière produite par cette réaction en unités de luminescence relatives (RLU). Les RLU sont proportionnelles à la quantité de conjugué d'isoluminol lié, qui lui-même est proportionnel à la quantité d'anticorps anti-Ro52 liée au Ro52 sur les billes.

Le test QUANTA Flash Ro52 utilise une courbe maîtresse prédéfinie spécifique au lot qui est chargée dans l'appareil par le biais du code-barres de la cartouche de réactifs. Selon les résultats obtenus en testant deux étalons, une courbe d'étalonnage spécifique à l'appareil est générée. Le logiciel s'en sert pour calculer les unités de chimiluminescence (CU) à partir des valeurs RLU obtenues pour chaque échantillon.

Réactifs

1. La QUANTA Flash Ro52 Reagent Cartridge contient les réactifs suivants pour 50 dosages :
 - a. Billes paramagnétiques enduites de Ro52, lyophilisées.
 - b. Assay Buffer : de couleur rose, contenant une solution saline tamponnée Tris, du Tween 20, des stabilisateurs de protéines et des conservateurs.
 - c. Tracer IgG: anticorps IgG antihumain marqué à l'isoluminol, contenant du tampon, des stabilisateurs de protéines et un conservateur.
2. Resuspension Buffer, 1 flacon : de couleur rose, contenant du tampon, des stabilisateurs de protéine et des conservateurs.

Avertissements

1. Le tampon de dosage contient un produit chimique (chloramphénicol à 0,02 %) répertorié par l'État de Californie comme provoquant le cancer.
2. L'azoture de sodium est utilisé comme conservateur. Il s'agit d'un poison qui peut être toxique en cas d'ingestion ou d'absorption oculaire ou cutanée. Cette substance peut réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques potentiellement explosifs. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations et les éviers.
3. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser un équipement de protection individuelle approprié.
4. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les réglementations environnementales locales, nationales et internationales en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce produit est destiné à un usage diagnostique *in vitro*.
2. Ce test doit uniquement être utilisé dans l'appareil BIO-FLASH.

3. Il est recommandé de respecter strictement le protocole de remise en suspension.
4. Une fois ouverte, cette cartouche de réactifs doit être conservée dans le carrousel de réactifs de l'appareil. Veiller à éviter les éclaboussures de réactifs la première fois que la cartouche de réactifs est placée dans l'appareil.
5. La contamination des réactifs par produit chimique peut être due à un nettoyage ou un rinçage inadaptés de l'appareil. Les résidus de produits chimiques courants en laboratoire, tels que le formol, l'eau de Javel, l'éthanol ou les détergents, peuvent provoquer des interférences avec le test. Veiller à suivre la procédure de nettoyage de l'appareil recommandée dans le manuel de l'utilisateur du BIO-FLASH.

Conditions de conservation

1. Conserver les cartouches de réactifs non ouvertes et le tampon de remise en suspension entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. Les cartouches de réactifs ouvertes doivent être conservées à l'intérieur de l'appareil. Le logiciel BIO-FLASH surveille la date de péremption (en cours d'utilisation) des cartouches de réactifs à bord de l'appareil, de même que la date de péremption du lot de réactifs (lors du stockage). Le système n'autorise pas l'utilisation d'une cartouche dont la date de péremption est dépassée.

Prélèvement, préparation et manipulation des échantillons

Ce test doit être réalisé sur des échantillons de sérum. Les échantillons ayant subi une contamination microbienne, thermo-traités ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Aucune interférence n'a été détectée avec un taux d'hémoglobine atteignant 200 mg/dl, de triglycérides atteignant 1000 mg/dl, de cholestérol atteignant 224,3 mg/dl, de bilirubine atteignant 10 mg/dl et d'IgM anti-FR atteignant 500 UI/ml.

Suite au prélèvement, le sérum doit être séparé du caillot. Il est recommandé de conserver les échantillons dans les conditions suivantes :

1. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 48 heures à température ambiante.
2. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 14 jours entre 2 et 8 °C.
3. Si le test n'est pas effectué dans les 14 jours, ou pour expédier l'échantillon, congeler à -20 °C ou moins. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 3 fois. Bien agiter les échantillons congelés après décongélation et avant le test.

Procédure

Matériels fournis

- 1 QUANTA Flash Ro52 Reagent Cartridge
- 1 Resuspension Buffer
- 1 Pipette de transfert

Matériel supplémentaire requis mais non fourni

Appareil BIO-FLASH avec ordinateur

BIO-FLASH System Rinse (réf. : 3000-8205)

BIO-FLASH Triggers (réf. : 3000-8204)

BIO-FLASH Cuvettes (réf. : 3000-8206)

QUANTA Flash Ro52 Calibrators (réf. : 701261)

QUANTA Flash Ro52 Controls (réf. : 701262)

Utilisation de l'analyseur par chimiluminescence BIO-FLASH

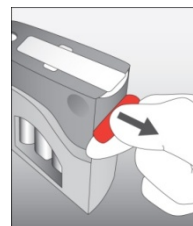
1. Consulter le manuel de l'utilisateur joint au système BIO-FLASH pour obtenir des instructions détaillées sur le fonctionnement de l'analyseur par chimiluminescence BIO-FLASH et du logiciel BIO-FLASH. Pour toute information complémentaire et pour résoudre les problèmes liés à ce test, contacter le service technique d'Inova Diagnostics, Inc. à l'adresse ou au numéro de téléphone indiqués à la fin de cette notice.
2. Pour vider le conteneur de déchets solides, ouvrir le tiroir de déchets. Retirer le conteneur et jeter les cuvettes usagées. Remettre le conteneur de déchets solides en place, fermer le tiroir de déchets, puis cliquer sur **Yes** dans la fenêtre **Empty Waste Drawer**.
3. Pour remplacer les déclencheurs, cliquer sur le bouton **Bulks Inventory F9** (en haut à droite).
 - a. À l'écran **Inventory – Bulks**, cliquer sur le bouton **Triggers** à gauche. Une nouvelle fenêtre, intitulée **Add Triggers – Remove old bottles** apparaît.
 - b. Ouvrir le tiroir de déchets et le retirer de l'appareil BIO-FLASH. Éliminer les cuvettes éventuellement présentes dans le tiroir de déchets secs. Cliquer sur **Yes** dans la fenêtre **Empty Waste Drawer**. Retirer les flacons de déclencheur de leur support et cliquer sur le bouton **Next**. Dévisser les anciens flacons de déclencheur de leur capuchon et les remplacer par de nouveaux. Veiller à procéder un flacon à la fois et à faire correspondre les couleurs des capuchons (blanc avec blanc et rouge avec rouge).
 - c. Suivre les instructions de la nouvelle fenêtre **Add Triggers – Add Trigger 2 bottle**. Une fois le code-barres accepté, placer le Déclencheur 2 sur le support blanc. Cliquer sur **Next**.
 - d. Suivre les instructions de la fenêtre **Add Triggers – Add Trigger 1 bottle**. Une fois le code-barres accepté, placer le Déclencheur 1 sur le support rouge. Cliquer sur **Finish**. Remettre le tiroir de déchets en place et le fermer.
4. Pour remplacer le conteneur de rinçage du système, cliquer sur le bouton **Bulks Inventory F9** (en haut à droite). À l'écran **Inventory – Bulks**, cliquer sur le bouton **Sys. Rinse**. Dans la nouvelle fenêtre **Add System Rinse – Remove bottles**, cliquer sur **Next**. Suivre les instructions de la nouvelle fenêtre **Add System Rinse – Add bottle**. Une fois le code-barres accepté, cliquer sur **Finish** si nécessaire.
5. Pour vider le conteneur de déchets liquides, cliquer sur le bouton **Fluid Waste** à l'écran **Inventory – Bulks**. Retirer les déchets liquides et les éliminer. Cliquer sur **Next**. Une fois le flacon vide remplacé, cliquer sur **Finish**.

Méthode

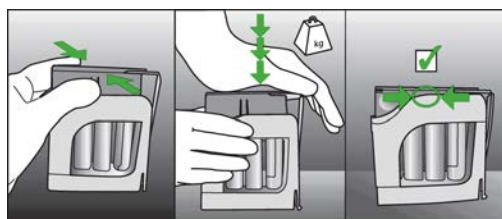
Préparation de la cartouche de réactifs

Lors de la première utilisation de la cartouche de réactifs, respecter les instructions suivantes pour l'installer correctement dans l'appareil BIO-FLASH. Remarque : ne pas utiliser la cartouche de réactifs en cas de détérioration visible.

1. Placer la cartouche de réactifs sur une surface solide. Maintenir la cartouche de réactifs en place d'une main. De l'autre main, saisir fermement la languette rouge, située à l'arrière de la cartouche de réactifs, et tirer pour la retirer complètement.

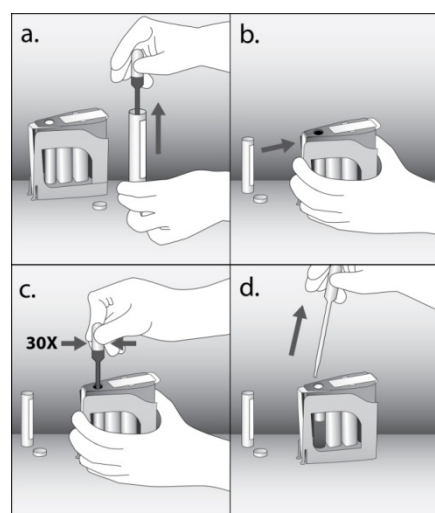


2. Appuyer sur les deux ailettes situées sur les côtés du capuchon perceur (partie grise) et appliquer une pression sur la partie supérieure de la cartouche de réactifs jusqu'à ce qu'elle s'enclenche en position verrouillée. Les ailettes ne doivent plus être visibles. **NE PAS RETOURNER LA CARTOUCHE UNE FOIS OUVERTE.**



3. Remettre les microparticules de Ro52 en suspension :

- a. Retirer le capuchon du flacon de tampon de remise en suspension et aspirer le liquide dans la pipette de transfert fournie. Tout le contenu du flacon sera utilisé.
- b. Faire glisser le clapet du couvercle de la cartouche de réactifs en position ouverte en appuyant légèrement sur le côté étroit de la cartouche, tout en la maintenant dans cette position. Transférer avec précaution l'ensemble du contenu du flacon dans le tube de réactif à microparticules, à travers l'orifice unique situé en haut de la cartouche de réactifs.
- c. Mélanger le contenu du tube de réactif à microparticules en aspirant et en distribuant le liquide au moins 30 fois. Si des agrégats de billes sont visibles, continuer à mélanger la solution 30 fois supplémentaires. S'il est impossible de remettre les microparticules en suspension, **NE PAS UTILISER LA CARTOUCHE.**
- d. Veiller à distribuer tout le liquide avant de retirer la pipette du tube et de l'éliminer.



4. Retirer la pastille adhésive de la partie supérieure de la cartouche de réactifs pour faire apparaître les trois autres orifices.
5. Placer la cartouche de réactifs dans une fente ouverte du carrousel de réactifs de l'appareil BIO-FLASH.

Étalonnage du test

1. Chaque nouveau lot de cartouches de réactifs doit être étalonné avant la première utilisation. Le logiciel ne permet pas d'utiliser un nouveau lot avant qu'il ne soit étalonné.
2. Se reporter à la section intitulée **QUANTA Flash® Ro52 Calibrators 701261** de cette notice pour obtenir des instructions détaillées sur l'étalonnage de la cartouche de réactifs.
3. Une fois l'étalonnage validé, le lot de cartouches de réactifs en ayant fait l'objet est prêt à l'emploi.

Programmation et analyse des échantillons

1. Appuyer sur le bouton **Worklist** en haut de l'écran, puis sélectionner l'onglet **Racks** en bas.
2. Sélectionner le portoir d'échantillons à utiliser en le mettant en surbrillance à l'écran ou en scannant son code-barres avec le lecteur manuel. Scanner le nom de l'échantillon ou le saisir, puis sélectionner le type d'échantillon, le type de conteneur (tube/cupule) et sélectionner Ro52 dans le volet de dosages. Recommencer ces étapes pour tous les échantillons.
3. Charger les échantillons dans les positions sélectionnées du portoir, puis charger ce dernier dans le carrousel d'échantillons de l'appareil.
4. Si tous les matériaux requis sont à bord de l'appareil, l'icône de démarrage apparaît en vert en haut de l'écran. Appuyer sur l'icône **Start F4** pour débiter le test.

Contrôle de la qualité

Les QUANTA Flash Ro52 Controls (vendus séparément sous la référence Inova 701262) contiennent à la fois des contrôles Ro52 positifs et négatifs. Se reporter à la section intitulée **QUANTA Flash® Ro52 Controls 701262** de la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la saisie des informations requises de chaque contrôle dans le logiciel, ainsi que sur l'analyse des contrôles. Il est recommandé d'analyser les contrôles une fois par jour où le dosage est utilisé. Les utilisateurs doivent toutefois tenir compte des exigences réglementaires locales/nationales en vigueur.

Calcul des résultats

Une courbe maîtresse à six points est générée par Inova pour chaque nouveau lot de QUANTA Flash Ro52. Ses paramètres sont codés dans le code-barres de chaque cartouche de réactifs. Lors de l'étalonnage, une courbe d'étalonnage spécifique à l'appareil est créée d'après la courbe maîtresse et permet de convertir les unités RLU en unités CU. La réactivité des anticorps dirigés contre les Ro52 peut ensuite être classée conformément au tableau ci-dessous.

<u>Réactivité</u>	<u>CU</u>
Négatif	<20
Positif	≥20

La réactivité en unités CU est directement liée au titre de l'autoanticorps présent dans l'échantillon patient. Les augmentations et diminutions de concentrations d'autoanticorps patients sont reflétées par les hausses et chutes correspondantes en unités CU, qui sont proportionnelles à la quantité d'anticorps.

La plage de mesure analytique du dosage (déterminée par les points les plus bas et les plus élevés de la courbe maîtresse) s'échelonne de 2,3 CU à 1685,3 CU, ce qui correspond à la plage linéaire du dosage. Si le résultat d'un patient est inférieur à 2,3 CU, le système BIO-FLASH indique

« <2,3 CU ». Dans la mesure où cette valeur est inférieure à 20 CU, elle est considérée comme négative. Si le résultat d'un patient est supérieur à 1685,3 CU, le système BIO-FLASH indique « >1685,3 CU ». Ce résultat est considéré comme positif. Le logiciel BIO-FLASH possède une option de réexécution automatique. Si cette option est choisie, l'appareil recommence automatiquement le dosage d'un échantillon dont le résultat est supérieur à 1685,3 CU, après avoir décuplé la dilution par 35 pour que la valeur mesurée tombe dans la plage de mesure analytique. Le résultat final est calculé par le logiciel en tenant compte du facteur de dilution complémentaire. La valeur la plus élevée pouvant être mesurée est 1685,3 CU, la valeur la plus élevée pouvant être reportée est donc 58 985 CU.

Interprétation des résultats

Il est conseillé à chaque laboratoire de vérifier la plage de référence fournie par le fabricant et d'établir sa propre plage normale selon ses contrôles et son groupe de patients, mais aussi en fonction des procédures qu'il a établies.

Il est suggéré d'inclure la déclaration suivante aux résultats rapportés par le laboratoire : « Les résultats suivants ont été obtenus avec un test CIA Inova QUANTA Flash Ro52. Les valeurs obtenues avec des méthodes de test de fabricants différents ne doivent pas être utilisées de façon interchangeable. »

Limites du test

1. Certains patients atteints de LES, de SS, de sclérodémie généralisée et de MII ne sont pas positifs aux anticorps anti-Ro52. Dans nos études de validation, 36 % des patients LES, 44 % des patients SS, 16 % des patients avec sclérodémie généralisée et 40 % des MII ont été positifs aux anticorps anti-Ro52.
2. Les résultats de ce test doivent être utilisés conjointement aux résultats cliniques et à d'autres examens sérologiques.
3. Si les billes revêtues de Ro52 ne sont pas correctement remises en suspension, les valeurs risquent d'être inférieures à celles obtenues avec des billes correctement remises en suspension.
4. Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été établies pour d'autres matrices que le sérum.

Seuil (plage de référence)

Le seuil du test a été déterminé en analysant 155 échantillons issus d'un groupe de patients de référence constitué de 115 donneurs de sang apparemment sains (15 hommes et 100 femmes, âgés de 19 à 69 ans), 8 échantillons positifs à l'hépatite virale (6 hommes et 2 femmes, âgés de 19 à 44 ans), 5 échantillons positifs à la syphilis (1 homme et 4 femmes, âgés de 27 à 57 ans), 5 échantillons positifs au VIH (4 hommes et 1 femme, âgés de 28 à 51 ans) et 22 échantillons positifs à la PR (aucune donnée d'âge ni de sexe disponible). Le seuil a été déterminé au 97^{ème} centile des résultats obtenus sur les sujets de référence. Il a été défini sur une valeur de 20 CU.

Valeurs attendues

La valeur attendue au sein de la population normale est « négatif ». Les concentrations en autoanticorps anti-Ro52 ont été mesurées chez une cohorte de 111 donneurs de sang apparemment sains (21 hommes et 90 femmes, âgés de 17 à 60 ans) à l'aide du dosage QUANTA Flash Ro52. Avec le seuil de 20 CU, aucun échantillon n'était positif au QUANTA Flash Ro52. La concentration moyenne était de 8,3 CU et les valeurs s'étendaient de < 2,3 à 19,3 CU.

Traçabilité

Il n'existe aucun sérum étalon international permettant de standardiser les tests des anticorps anti-Ro52.

Les sérums de référence IS2105 ANA #7, IS2073 ANA #2 et IS2187 ANA #10 du CDC (Center for Disease Control and Prevention) ont été testés ; leurs concentrations respectives étaient de 32,4 CU, 40,7 CU et 443,7 CU.

Sensibilité et spécificité cliniques

Au total, 600 échantillons ont été utilisés dans le cadre de l'étude de validation clinique, y compris 131 patients LES, 91 patients souffrant du syndrome de Sjögren, 80 patients atteints de sclérodémie généralisée et 65 patients présentant une myopathie inflammatoire idiopathique. Au total, 233 échantillons de patients présentant d'autres maladies ont été intégrés en guise de contrôles. Les échantillons de 14 patients souffrant d'un syndrome secondaire des antiphospholipides (SAPL) ont été exclus des calculs de sensibilité et de spécificité car leur diagnostic primaire est inconnu.

La sensibilité et la spécificité cliniques du SS (n=91), du LES (n=131), de la sclérodémie généralisée (n=80) et de la MII (n=65) ont été calculées. Elles sont récapitulées dans les quatre tableaux ci-dessous :

Tableau 1 - Sensibilité et spécificité cliniques du QUANTA Flash Ro52 pour le LES :

Analyse clinique du LES N=350		Diagnostic			Analyse (confiance à 95 %)
		LES	Contrôles (hors SS, sclérodémie généralisée et MII)	Total	
QUANTA Flash Ro52	Positif	47	7	54	Sensibilité = 35,9 % (27,7-44,7 %)
	Négatif	84	212	296	Spécificité = 96,8 % (93,5-98,7 %)
	Total	131	219	350	

Tableau 2 - Sensibilité et spécificité cliniques du QUANTA Flash Ro52 pour le SS :

Analyse clinique du SS N=310		Diagnostic			Analyse (confiance à 95 %)
		SS	Contrôles (hors LES, sclérodémie généralisée et MII)	Total	
QUANTA Flash Ro52	Positif	40	7	47	Sensibilité = 44,0 % (33,6-54,8 %)
	Négatif	51	212	263	Spécificité = 96,8 % (93,5-98,7 %)
	Total	91	219	310	

Tableau 3 - Sensibilité et spécificité cliniques du QUANTA Flash Ro52 pour la sclérodémie généralisée :

Analyse clinique de la sclérodémie généralisée N=299		Diagnostic			Analyse (confiance à 95 %)
		Sclérodémie généralisée	Contrôles (hors SS, LES et MII)	Total	
QUANTA Flash Ro52	Positif	13	7	20	Sensibilité = 16,3 % (8,9-26,2 %)
	Négatif	67	212	279	Spécificité = 96,8 % (93,5-98,7 %)
	Total	80	219	299	

Tableau 4 - Sensibilité et spécificité cliniques du QUANTA Flash Ro52 pour la MII :

Analyse clinique de la MII N=283		Diagnostic			Analyse (confiance à 95 %)
		MI	Contrôles (hors SS, sclérodémie généralisée et LES)	Total	
QUANTA Flash Ro52	Positif	26	7	33	Sensibilité = 40,0 % (28,0-52,9 %)
	Négatif	39	211	250	Spécificité = 96,8 % (93,5-98,7 %)
	Total	65	218	283	

Tableau 5 - Répartition du groupe de contrôles pathologiques utilisé dans l'étude de validation :

Groupe de patients	N	Négatif	Positif
Maladie thyroïdienne autoimmune	20	20	0
Vascularite	17	17	0
Rectocolite ulcéro-hémorragique	20	20	0
Maladie de Crohn	20	20	0
Arthrose	20	19	1
SAPL primaire	15	15	0
SAPL secondaire*	14	8	6
Maladie cœliaque	11	11	0
Polyarthrite rhumatoïde	50	48	2
Maladie de Behçet	1	1	0
Hépatite C	6	5	1
Hépatite B	6	6	0
VIH	5	5	0
Syphilis	5	5	0
CMV	11	10	1
EBV (avec ou sans autre infection)	12	10	2
Total	233	220	13

* Patients souffrant potentiellement d'un LES

Comparaison des méthodes avec dispositif de référence

L'analyse de comparaison des méthodes portait sur 319 échantillons issus de l'étude de validation clinique, ainsi que 27 échantillons supplémentaires caractérisés par un motif moucheté sur les cellules HEp-2 déterminé par IFI des ANA. Ces échantillons ont été testés avec le test QUANTA Flash Ro52 et le test ELISA de référence. Les données sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 6

Méthode de comparaison (N=346)		Ro52 ELISA			Pourcentage de concordance (confiance à 95 %)
		Négatif	Positif	Total	
QUANTA Flash Ro52 CIA	Négatif	209	25	234	Concordance pos. = 80,3 % (72,3 - 86,8 %)
	Positif	10	102	112	Concordance nég. = 95,4 % (91,8 - 97,8 %)
	Total	219	127	346	Concordance générale = 89,9 % (86,2 - 92,9 %)

Précision et reproductibilité

En termes de précision, la performance du test QUANTA Flash Ro52 a été évaluée en analysant 9 échantillons de sérum conformément au document EP5-A2 du CLSI, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Procedures - Approved Guideline, avec des échantillons testés en double, deux fois par jour, pendant 21 jours. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel d'évaluation des méthodes Analyse-it pour Excel. Les données intra-analyse, inter-analyses et sur plusieurs jours ainsi que la précision totale sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7

			Intra-analyse		Inter-analyses		D'un jour à l'autre		Total	
Échantillon	N	Moyenne (CU)	Écart type	CV (%)	Écart type	CV (%)	Écart type	CV (%)	Écart type	CV (%)
1	84	14.0	0.5	3.4%	0.4	3.2%	0.4	3.0%	0.8	5.5%
2	84	20.5	0.7	3.4%	0.6	3.1%	1.2	5.8%	1.5	7.4%
3	84	27.2	1.0	3.6%	0.7	2.6%	1.5	5.5%	1.9	7.1%
4	84	18.8	0.6	3.4%	0.4	2.1%	0.9	4.6%	1.1	6.1%
5	84	140.5	8.3	5.9%	2.0	1.5%	8.4	6.0%	12.0	8.5%
6	84	343.3	8.6	2.5%	6.2	1.8%	17.0	4.9%	20.0	5.8%
7	84	638.2	29.1	4.6%	0.0	0.0%	38.7	6.1%	48.5	7.6%
8	84	1081.3	48.7	4.5%	30.6	2.8%	50.7	4.7%	76.7	7.1%
9	84	1537.5	68.2	4.4%	65.3	4.2%	79.4	5.2%	123.4	8.0%

Plage de mesure analytique

La limite de détection de ce dosage est de 402 RLU, soit moins que la plage de mesure analytique du dosage (2,3 CU). Cette limite a été déterminée en accord avec la recommandation EP17-A du CLSI, avec une proportion de faux positifs (alpha) inférieure à 5 % et de faux négatifs (bêta) inférieure à 5 %, d'après la réalisation de 240 dosages, avec 120 mesures sur des blancs et 120 mesures sur des échantillons à faible concentration, sur deux lots de réactifs. La limite de détection est de 319 RLU.

La linéarité de la plage de mesure analytique a été évaluée par une étude conforme au document EP6-A du CLSI (Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline). Quatre échantillons de sérum présentant diverses concentrations en anticorps anti-Ro52 ont été dilués en série pour obtenir des valeurs qui couvrent la plage de mesure analytique. Les taux d'anticorps obtenus ont été reportés sur un graphique par rapport aux taux prévus. Ces quatre échantillons ont présenté une linéarité de dilution individuelle et ont produit les résultats suivants avec la régression linéaire :

Tableau 8

Échantillon	Plage de test (CU)	Pente (IC à 95 %)	R²
1	239,2 à 1618,2	0,97 (0,93 à 1,01)	1.00
2	37,2 à 370,4	1,01 (0,99 à 1,04)	1.00
3	11,0 à 104,2	1,02 (0,99 à 1,04)	1.00
4	3,8 à 17,0	0,92 (0,86 à 0,98)	0.99
Tous les échantillons combinés	3,8 à 1618,2	0,97 (0,96 à 0,97)	1.00

QUANTA Flash[®] Ro52

Calibrators

Pour usage diagnostique *In Vitro*.

RÉF **701261**

Rx Only

Utilisation prévue

Les QUANTA Flash Ro52 Calibrators sont conçus pour une utilisation avec les QUANTA Flash Ro52 Reagents pour le dosage des autoanticorps IgG anti-Ro52 dans le sérum humain. Chaque étalon fournit un point de référence pour la courbe d'étalonnage qui sert à calculer les valeurs des unités.

Résumé et principes du test

Le dosage immunologique par chimiluminescence (CIA) QUANTA Flash Ro52 utilise une courbe maîtresse prédéfinie spécifique au lot stockée dans le code-barres de la cartouche de réactifs. Les QUANTA Flash Ro52 Calibrators sont destinés à produire une courbe d'étalonnage spécifique à l'appareil à partir des paramètres de la courbe maîtresse, le point de décision reposant sur les caractéristiques de performance et l'évaluation clinique du test CIA QUANTA Flash Ro52. Avant l'affectation de valeurs, les étalons sont testés sur plusieurs appareils, avec plusieurs lots de réactifs.

Réactifs

1. QUANTA Flash Ro52 Calibrator 1 : deux (2) tubes à code-barres contenant 0,3 ml de réactif prédilué, prêt à l'emploi. Étalons contenant des anticorps humains anti-Ro52 dans des stabilisateurs et des conservateurs.
2. QUANTA Flash Ro52 Calibrator 2 : deux (2) tubes à code-barres contenant 0,3 ml de réactif prédilué, prêt à l'emploi. Étalons contenant des anticorps humains anti-Ro52 dans des stabilisateurs et des conservateurs.

Avertissements

1. Toutes les substances d'origine humaine utilisées pour préparer les étalons de ce produit ont été testées et se sont avérées négatives aux anticorps anti-VIH, HBsAg et VHC par des méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut toutefois garantir que le VIH, le VHB et le VHC ou d'autres agents infectieux sont absents. Les étalons QUANTA Flash Ro52 doivent donc être manipulés de la même manière que les substances potentiellement infectieuses.¹⁰
2. Utiliser un équipement de protection individuelle approprié pour travailler avec les réactifs fournis.
3. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les réglementations environnementales locales, nationales et internationales en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce produit est destiné à un usage diagnostique *in vitro*.
2. Les QUANTA Flash Ro52 Calibrators sont conçus pour être utilisés avec le test QUANTA Flash Ro52.
3. Ne pas transférer les réactifs d'étalons dans des tubes secondaires. L'appareil utilise les codes-barres apposés sur les tubes pour mettre en correspondance les étalons avec le type de test approprié.
4. Une fois le tube d'étalon ouvert, il est utilisable jusqu'à 8 heures en restant débouché à bord de l'appareil, mais le réactif doit ensuite être jeté.
5. La contamination des réactifs par produit chimique peut être due à un nettoyage ou un rinçage inadaptés de l'appareil. Les résidus de produits chimiques courants en laboratoire, tels que le formol, l'eau de Javel, l'éthanol ou les détergents, peuvent provoquer des interférences avec le test. Veiller à suivre la procédure de nettoyage de l'appareil recommandée dans le manuel de l'utilisateur du BIO-FLASH.

Conditions de conservation

1. Conserver les étalons non ouverts entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. Les étalons ouverts doivent être éliminés après 8 heures à bord de l'appareil sans bouchon.

Procédure

1. Chaque nouveau lot de cartouches de réactifs doit être étalonné avant la première utilisation. Le logiciel ne permet pas d'utiliser un nouveau lot avant qu'il ne soit étalonné.
2. Chaque étalon doit être mélangé délicatement avant utilisation pour garantir son homogénéité. Éviter la formation de mousse car les bulles peuvent interférer avec la détection du niveau de liquide des appareils. Retirer le capuchon de chaque tube d'étalon et les placer tous les deux dans un portoir d'échantillons, les codes-barres pointant à travers les espaces du portoir. Placer le portoir d'échantillons dans le carrousel de l'appareil BIO-FLASH et fermer la porte. L'appareil lit les codes-barres sur les tubes d'étalons, puis identifie la cartouche de réactifs à utiliser. Consulter le manuel de l'utilisateur joint au système BIO-FLASH pour obtenir des instructions détaillées sur le fonctionnement de l'analyseur par chimiluminescence BIO-FLASH et le logiciel BIO-FLASH.
3. L'appareil analyse chaque étalon en triple. Une fois les étalons analysés, le logiciel doit valider l'étalonnage. À l'écran **Instrument Summary**, cliquer sur le bouton fléché **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Sélectionner **Calibration Ctrl-F3**. Dans la fenêtre Calibration, mettre le test souhaité en surbrillance, puis cliquer sur **Details**.
4. Dans la nouvelle fenêtre **Calibration Details**, sélectionner l'étalonnage qui vient d'être effectué. La courbe maîtresse apparaît en lignes pointillées, alors que la courbe d'étalonnage est représentée par une ligne pleine. Si les résultats de l'étalonnage sont valides, un bouton de validation apparaît dans l'angle inférieur gauche de l'écran. Cliquer sur le bouton **Validate Calibration**.
5. Une fois l'étalonnage validé, le lot de cartouches de réactifs en ayant fait l'objet est prêt à l'emploi. Il est recommandé de tester les QUANTA Ro52 Controls (vendus séparément sous la référence 701262) après avoir étalonné un lot de cartouches de réactifs.

Traçabilité

Il n'existe aucun sérum étalon international permettant de standardiser les tests des anticorps anti-Ro52.

Les sérums de référence IS2105 ANA #7, IS2073 ANA #2 et IS2187 ANA #10 du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ont été testés ; leurs concentrations respectives étaient de 32,4 CU, 40,7 CU et 443,7 CU.

Limites

Ces étalons sont conçus pour 4 étalonnages. Le temps total pendant lequel les tubes d'étalons peuvent rester sans capuchon à l'intérieur du système ne doit pas dépasser 8 heures. Si les étalons restent à bord de l'appareil sans capuchon au-delà de la période préconisée, ils doivent être éliminés. L'utilisation du même tube d'étalon pendant plus de 8 heures peut entraîner un mauvais étalonnage du test et donc fournir des résultats erronés.

Controls

Pour usage diagnostique *in vitro*.

RÉF

701262

Rx Only

Utilisation prévue

Les QUANTA Flash Ro52 Controls sont conçus pour une utilisation avec les réactifs QUANTA Flash Ro52, pour le contrôle qualité du dosage des autoanticorps IgG anti-Ro52 dans le sérum humain.

Résumé et principes du test

Les QUANTA Flash Ro52 Controls se composent d'un contrôle négatif et d'un contrôle positif. Chacun contient une quantité différente d'anticorps anti-Ro52. Les contrôles négatif et positif sont utilisés pour surveiller les performances analytiques du test CIA QUANTA Flash Ro52.

Réactifs

1. QUANTA Flash Ro52 Negative Control : deux (2) tubes à code-barres contenant 0,5 ml de réactif prêt à l'emploi. Contrôles contenant des anticorps humains anti-Ro52 dans des stabilisateurs et des conservateurs.
2. QUANTA Flash Ro52 Positive Control : deux (2) tubes à code-barres contenant 0,5 ml de réactif prêt à l'emploi. Contrôles contenant des anticorps humains anti-Ro52 dans des stabilisateurs et des conservateurs.

Avertissements

1. Toutes les substances d'origine humaine utilisées pour préparer les contrôles de ce produit ont été testées et se sont avérées négatives aux anticorps anti-VIH, HBsAg et VHC par des méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut toutefois garantir que le VIH, le VHB et le VHC ou d'autres agents infectieux sont absents. Les contrôles QUANTA Flash Ro52 doivent donc être manipulés de la même manière que les substances potentiellement infectieuses.¹⁰
2. Utiliser un équipement de protection individuelle approprié pour travailler avec les réactifs fournis.
3. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les réglementations environnementales locales, nationales et internationales en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce produit est destiné à un usage diagnostique *in vitro*.
2. QUANTA Flash Ro52 Controls sont conçus pour être utilisés avec le test QUANTA Flash Ro52.
3. Ne pas transférer les réactifs de contrôle dans des tubes secondaires. Les codes-barres apposés sur les tubes permettent à l'appareil d'identifier le contrôle.

4. Une fois ouvert, chaque tube de contrôle est utilisable jusqu'à 15 fois, avec une durée moyenne à bord de l'appareil de 10 minutes par utilisation, pour un total de 2 heures et 30 minutes.
5. La contamination des réactifs par produit chimique peut être due à un nettoyage ou un rinçage inadaptés de l'appareil. Les résidus de produits chimiques courants en laboratoire, tels que le formol, l'eau de Javel, l'éthanol ou les détergents, peuvent provoquer des interférences avec le test. Veiller à suivre la procédure de nettoyage de l'appareil recommandée dans le manuel de l'utilisateur du BIO-FLASH.

Conditions de conservation

1. Conserver les contrôles non ouverts entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. Les contrôles ouverts peuvent être utilisés jusqu'à 15 fois, avec une durée moyenne à bord de l'instrument de 10 minutes par utilisation. Le temps total pendant lequel les tubes de contrôles peuvent rester sans capuchon à l'intérieur de l'appareil ne doit pas dépasser 2 heures et 30 minutes. Au-delà, ils doivent être éliminés.
3. Pour une stabilité optimale, retirer les contrôles du système immédiatement après utilisation, et les conserver entre 2 et 8 °C, rebouchés, dans leur flacon d'origine.

Procédure

Créer de nouveaux matériels CQ pour le test Ro52 :

1. Avant d'utiliser des QUANTA Flash Ro52 Controls pour la première fois, le nom, le lot, la date de péremption, la valeur (ou dose) et les informations sur l'écart type cible doivent être entrés dans le logiciel.
2. À l'écran **Instrument Summary**, cliquer sur le bouton fléché **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Sélectionner **QC Ctrl-F2**. Cliquer sur le bouton **New QC Material**.
3. Une fiche de données spécifique au lot est jointe à chaque kit de contrôle. Commencer par saisir le nom, le numéro de lot et la date de péremption figurant sur la fiche dans le logiciel. Ensuite, cliquer sur le bouton **Add Assay**. À l'écran suivant, vérifier que la case **Show All Assays** est cochée. Sélectionner le test Ro52 dans la liste, puis cliquer sur **Add**. Pour finir, saisir la dose cible et l'écart type cible. Cliquer sur **Save**. Effectuer cette procédure pour les deux contrôles.

Créer un nouveau lot de matériels CQ existants :

1. Avant d'utiliser un nouveau lot de contrôles QUANTA Flash Ro52 pour la première fois, le lot, la date de péremption, la valeur (ou dose) et les informations sur l'écart type cible doivent être entrés dans le logiciel.
2. À l'écran **Instrument Summary**, cliquer sur le bouton fléché **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Sélectionner **QC Ctrl-F2**. Mettre le test Ro52 en surbrillance dans la colonne de gauche. Ensuite, mettre le matériel de contrôle approprié en surbrillance à droite (« Ro52N » pour le contrôle négatif ou « Ro52P » pour le contrôle positif). Cliquer sur le bouton **New QC Lot**.
3. Une fiche de données spécifique au lot est jointe à chaque kit de contrôle. Entrer les informations de cette fiche de données dans le logiciel. Elles doivent inclure le numéro de lot, la date de péremption, la dose cible et l'écart type cible. Si nécessaire, cliquer sur le bouton **Add Assay**. À l'écran suivant, vérifier que la case **Show All Assays** est cochée. Sélectionner le test Ro52 dans la liste, puis cliquer sur **Add**. Cliquer sur **Save**. Effectuer cette procédure pour les deux contrôles.

Il est recommandé d'utiliser les QUANTA Flash Ro52 Controls une fois par jour où le test est utilisé.

Chaque contrôle doit être mélangé délicatement avant utilisation pour garantir son homogénéité. Éviter la formation de mousse car les bulles peuvent interférer avec la détection du niveau de liquide des appareils. Retirer le capuchon de chaque tube de contrôle et les placer tous les deux dans un portoir d'échantillons, les codes-barres pointant à travers les espaces du portoir. Placer le portoir d'échantillons dans le carrousel de l'appareil BIO-FLASH et fermer la porte. L'appareil lit les codes-barres sur les tubes de contrôle, puis identifie la cartouche de réactifs à utiliser. Consulter le manuel de l'utilisateur joint au système BIO-FLASH pour obtenir des instructions détaillées sur le fonctionnement de l'analyseur par chimiluminescence BIO-FLASH et le logiciel BIO-FLASH.

Traçabilité

Il n'existe aucun sérum étalon international permettant de standardiser les tests des anticorps anti-Ro52.

Les sérums de référence IS2105 ANA #7, IS2073 ANA #2 et IS2187 ANA #10 du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ont été testés ; leurs concentrations respectives étaient de 32,4 CU, 40,7 CU et 443,7 CU.

Limites

Ces contrôles sont conçus pour 15 utilisations. L'étiquette apposée sur chaque tube de contrôle possède une rangée de 15 cases pouvant être cochées afin de suivre le nombre d'utilisations. Le temps total pendant lequel les tubes de contrôles peuvent rester sans capuchon à l'intérieur de l'appareil ne doit pas dépasser 2 heures et 30 minutes. Au-delà, ils doivent être éliminés.

Bibliographie

1. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA: **Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists.** *Arch Pathol Lab Med.* 2000, **124(1)**:71-81.
2. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M: **Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system.** *Autoimmun Rev.* 2009, **8(7)**:632-637.
3. Ghillani P, André C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P, Goulvestre C, Gleizes A, Dragon-Durey MA, Alyanakian MA, Chretien P, Chollet-Martin S, Musset L, Weill B, Johanet C: **Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study.** *Autoimmun Rev.* 2011, **10(9)**: 509-513.
4. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, Bollani S, Saibeni S, Puttini PS: **Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies.** *Autoimmun Rev.* 2011, **10(3)**:150-154.
5. Parker JC, Burlingame RW, Bunn CC: **Prevalence of antibodies to Ro-52 in a serologically defined population of patients with systemic sclerosis.** *J Autoimmune Dis.* 2009,**6**:2.
6. Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A, Grøndal G, Hietarinta M, Isenberg D, Kalden JR, Lundberg I, Moutsopoulos H, Roux-Lombard P, Vencovsky J, Wikman A, Seelig HP, van Engelen BG, van Venrooij WJ: **Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis.** *Ann. Rheum. Dis.* 2001, **60(2)**:116-123.
7. Rutjes SA, Vree Egberts WT, Jongen P, Van Den Hoogen F, Pruijn GJ, Van Venrooij WJ. **Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy.** *Clin Exp Immunol.* 1997, **109(1)**:32-40.
8. La Corte R, Lo Mo Naco A, Locaputo A, Dolzani F, Trotta F: **In patients with antisynthetase syndrome the occurrence of anti-Ro/SSA antibodies causes a more severe interstitial lung disease.** *Autoimmunity* 2006, **39(3)**: 249-253.
9. Vancsa A, Csipo I, Nemeth J, Devenyi K, Gergely L, Danko K: **Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients.** *Rheumatol. Int.* 2009, **29(9)**: 989-994.
10. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition.** Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2009.

Symboles utilisés



Dispositif médical de diagnostic *In Vitro*



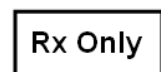
Fabricant



Conformité aux normes européennes



Représentant autorisé



Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.



Contenu suffisant pour < n > tests



Consulter le mode d'emploi



Contrôle positif



Limite de température



Contrôle négatif



Ne pas réutiliser



Étalon 1



Risques biologiques



Étalon 2



Code du lot



Carton en papier recyclable



Référence catalogue



Haut



Date de péremption

QUANTA Flash est une marque d'Inova Diagnostics Inc. BIO-FLASH est une marque déposée de Biokit S.A. © 2016

Fabriqué par :

Inova Diagnostics, Inc.

9900 Old Grove Road

San Diego, CA 92131

États-Unis d'Amérique

Service technique (États-Unis et Canada uniquement) : 877-829-4745

Service technique (en dehors des États-Unis) : 1 858-805-7950

support@inovadx.com

Représentant européen agréé :

Medical Technology Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80

D-66386 St. Ingbert, Allemagne

Tél. : +49-6894-581020

Fax : +49-6894-581021

www.mt-procons.com

621260FR

Octobre 2016

Révision 2

