

NOVA Lite® DAPI EMA Kit

DESTINÉ À L'EXPORTATION EXCLUSIVEMENT.

NE PAS VENDRE AUX ÉTATS-UNIS.

Pour usage diagnostique *in vitro*



REF 704265

Utilisation prévue

La trousse NOVA Lite DAPI EMA Kit est un test indirect par immunofluorescence pour la détection qualitative et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-endomysium des isotypes IgA dans le sérum humain par microscopie à fluorescence manuelle ou à l'aide du microscope automatisé NOVA View Automated Fluorescence Microscope. La présence d'anticorps anti-endomysium, associée à d'autres résultats sérologiques, radiologiques, histologiques et cliniques, aide à diagnostiquer la maladie cœliaque. Dans le cas où les résultats sont obtenus à l'aide de l'appareil NOVA View, un utilisateur expérimenté doit les confirmer.

Résumé et explication du test

Dans le cadre de plusieurs études, il a été signalé que le test des IgA anti-endomysium présente une très haute sensibilité et une très grande spécificité pour la maladie cœliaque (CD)^{1,2}. Les anticorps anti-endomysium sont dirigés contre les fibres ayant l'aspect de la réticuline dans le tissu conjonctif, autour des fibres du muscle lisse des voies intestinales de primates, et ciblent la transglutaminase tissulaire en tant qu'antigène. Ces anticorps sont détectés par le conjugué IgA-FITC anti-humain fourni. Il convient de noter que, pour les patients atteints de CD, la fréquence de déficience en IgA s'élève à 2-3 %, ce qui est beaucoup plus élevé que la fréquence de 0,2 % relevée au sein de la population normale. Une telle déficience en IgA peut générer un résultat négatif pour le test IgA EMA³. Par conséquent, il convient de réaliser un test d'immunoglobuline IgA quantitatif.

Principes du test

Cette trousse utilise une technique d'immunofluorescence indirecte³ dans le cadre de laquelle les échantillons de patient et les contrôles appropriés sont incubés avec les coupes de tissu. Les anticorps non liés sont lavés, puis le conjugué marqué à la fluorescéine qui convient est appliqué. Le conjugué non lié est lavé comme précédemment. Les lames sont examinées au microscope à fluorescence et les échantillons positifs présentent une fluorescence vert pomme dans les zones où l'auto-anticorps s'est lié.

Réactifs

1. Monkey Oesophagus Slide, 10 puits/lame, avec dessiccatif.
2. FITC IgA Conjugate with DAPI, contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % Prédiilués, prêts à l'emploi.
3. Endomysial (Celiac) Positive, 1 flacon de tampon contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % et des anticorps dirigés contre les antigènes endomysial dans du sérum humain, prédiilué et prêt à l'emploi.
4. IFA System Negative Control, 1 flacon de tampon contenant de l'azoture de sodium à 0,09 %, sans anticorps dirigés contre les antigènes endomysial dans du sérum humain, prédiilué et prêt à l'emploi.
5. PBS II Concentrate (40x)
6. Mounting Medium II
7. Coverslips

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 l'absence de VIH, de VHB et de VHC ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, les contrôles positif d'endomysium (cœliaque) et négatif du système IFA doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses⁸.
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 par la peau ou les yeux. Cette substance peut réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques potentiellement explosifs. Rincer les éviers (s'ils sont utilisés pour éliminer le réactif) avec de grands volumes d'eau pour éviter l'accumulation d'azoture.
3. Utiliser un équipement de protection individuelle approprié pour travailler avec les réactifs fournis.
4. Nettoyer immédiatement les éclaboussures de réactifs. Respecter toutes les législations environnementales nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce produit est à usage diagnostique *in vitro*.
2. La substitution par des composants autres que ceux fournis dans ce système peut entraîner une incohérence des résultats.
3. Un lavage incomplet ou inefficace des puits IFA peut provoquer un fond élevé.
4. L'adaptation de ce test pour une utilisation en tout ou partie avec des passeurs d'échantillons automatiques et d'autres dispositifs de manipulation de liquides peut générer des différences dans les résultats des tests par rapport à ceux obtenus en utilisant la procédure manuelle. Il appartient à chaque laboratoire de vérifier que les résultats de tests produits par sa procédure automatisée se situent dans des limites acceptables.
5. Divers facteurs influent sur les performances du test, notamment la température de départ des réactifs, la puissance de la source lumineuse du microscope, la précision et la reproductibilité de la technique de pipetage, le soin apporté au lavage et les durées d'incubation pendant le test. Prêter une attention particulière à la cohérence pour obtenir des résultats précis et reproductibles.
6. Il est recommandé de respecter strictement le protocole.

Conditions d'entreposage

1. Conserver tous les réactifs de la trousse entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. Une fois les lames retirées d'un sachet, elles doivent être utilisées immédiatement.
3. Le tampon PBS dilué peut être conservé jusqu'à un mois entre 2 et 8 °C.
4. Le conjugué de la trousse doit être conservé à l'abri de la lumière naturelle, fluorescente ou UV, si possible.

Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sang doivent être prélevés par ponction veineuse, un caillot doit se former naturellement et le sérum doit être séparé aussi vite que possible pour éviter une hémolyse. Le sérum peut être conservé jusqu'à 7 jours entre 2 et 8 °C avant le test ou, pour une conservation prolongée, aliquoté et conservé à -20 °C ou une température inférieure⁷. NE PAS congeler et décongeler les sérum plusieurs fois. Éviter d'utiliser des sérum lipémiques, hémolysés ou contaminés par voie microbienne car les titres risquent d'être diminués ou les profils de coloration peu clairs.

Procédure

Matériel fourni

25 x Monkey Oesophagus Slide
1 x 2mL Endomysial (Celiac) Positive, prédilué
1 x 2mL IFA System Negative Control, prédilué
2 x 15mL FITC IgA Conjugate w/ DAPI
2 x 25mL PBS II Concentrate (40x)
2 x 14mL Mounting Medium II
25 Coverslips

Matériel supplémentaire requis, mais non fourni

Eau distillée ou désionisée pour diluer le PBS II concentrate
Récipient de 1 L (minimum) pour le PBS II buffer dilué
Micropipettes et embouts jetables pour la distribution des échantillons de patients
Chambre humide pour les étapes d'incubation
Pissette ou pipettes de Pasteur pour le lavage des lames avec le tampon PBS II
Tube de Coplin
Microscope à fluorescence et/ou NOVA View[®] Automated Fluorescence Microscope

Méthode

Avant de commencer

1. Ramener tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20-26 °C) et bien mélanger.
2. **Diluer le concentré de PBS** : IMPORTANT : diluer le concentré de PBS II avec de l'eau distillée ou désionisée (1 volume de concentré de PBS II + 39 volumes d'eau distillée ou désionisée) et bien mélanger. Le tampon PBS sert à diluer les échantillons de patient et fait office de tampon de lavage. Le tampon dilué peut être stocké au maximum 4 semaines à 2-8 °C. N'utiliser toute la quantité de PBS II fourni dans la trousse que si l'ensemble des éléments la composant doivent être utilisés dans le mois.
3. **Diluer les échantillons de patient** :
 - a. Dépistage initial : diluer les échantillons de patient selon un rapport 1:10 avec un tampon PBS dilué (ajouter 20 µL de sérum à 180 µL de tampon PBS).
 - b. Titrage : pour tous les échantillons positifs, effectuer 2 dilutions en série à partir de la dilution de dépistage initial avec un tampon PBS dilué (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, etc.). Par exemple : prélever 100 µL de dilution 1:10, mélanger avec 100 µL de PBS pour produire une dilution 1:20. Recommencer pour les autres dilutions.

Procédure de test

1. **Préparation des lames de substrat** : laisser la ou les lames de substrat atteindre la température ambiante avant de les retirer de leur sachet. Étiqueter les lames comme il convient avec un marqueur et les placer dans une chambre humide. Ajouter 50 µL de contrôles positif et négatif non dilués dans les puits 1 et 2. Ajouter 50 µL d'échantillon de patient dilué dans les puits restants.
2. **Incubation des lames** : laisser incuber la lame pendant 30 minutes en chambre humide. Placer une serviette en papier humidifiée au fond de la chambre permet de maintenir l'humidité. **Ne pas laisser le substrat sécher pendant la procédure de test**. L'incubation doit être à température ambiante (20-26 °C).
3. **Lavage des lames** : une fois la période d'incubation écoulée, retirer les lames de la chambre humide et les rincer rapidement avec le tampon PBS II en utilisant une pissette en plastique ou une pipette pour éliminer délicatement le sérum à l'aide d'un tampon PBS dilué. Orienter la lame et appliquer le tampon PBS de façon à limiter le débordement d'échantillons d'un puits à l'autre. **Éviter de diriger le flux directement sur les puits pour ne pas endommager le substrat**. Placer immédiatement les lames dans un tube de Coplin contenant un tampon PBS dilué, puis agiter ou mélanger pendant 5 à 10 minutes.
4. **Ajout du conjugué fluorescent** : secouer le tampon PBS pour éliminer tout excès. Remettre la lame dans la chambre humide et recouvrir **immédiatement** chaque puits d'une goutte de conjugué fluorescent. **Ne pas laisser les puits découverts pendant plus de 15 secondes**. Incuber les lames pendant 30 minutes supplémentaires dans la chambre humide sombre.
5. **Lavage des lames** : répéter l'étape 3.

6. **Lamelle** : les procédures de recouvrement varient d'un laboratoire à l'autre, mais la procédure suivante est recommandée pour le traitement manuel des lames :
 - a. Placer une ou des lamelles sur une serviette en papier.
 - b. Appliquer un support pour préparations microscopiques sur une ligne continue au fond de la lamelle.
 - c. Retirer une lame à la fois du tube de Coplin. Tapoter le tampon PBS pour éliminer l'excès et faire effleurer le bord inférieur de la lame avec le bord de la lamelle. Abaisser doucement la lame sur la lamelle de manière à ce que le support pour préparations microscopiques s'écoule sur le bord supérieur de la lame sans que des bulles d'air ne se forment ou ne soient piégées. Si des bulles d'air se forment, ne pas tenter de les éliminer car cela pourrait abîmer le substrat. Essuyer l'excès de support du bord de la lamelle.
7. Observer les lames au microscope à fluorescence. Les lames prêtes peuvent être conservées jusqu'à 3 jours entre 2 et 8 °C, dans l'obscurité, sans perte significative de fluorescence.

Contrôle de la qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés à chaque fois que des échantillons sont testés pour vérifier que les réactifs fonctionnent correctement. D'autres sérums de contrôle adaptés peuvent être préparés en aliquotant des échantillons de sérum humain poolés et en les conservant à ≤ -20 °C. Pour que les résultats du test soient considérés valides, le contrôle positif doit produire une coloration vert pomme vive des fibres ayant l'aspect de la réticuline dans le tissu conjonctif, autour des fibres du muscle lisse. Le contrôle négatif doit produire une coloration vert sombre de tout le tissu, sans fluorescence discernable. Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrits, le test n'est pas valide et doit être recommandé.

Interprétation des résultats

Les résultats sont signalés positifs ou négatifs pour la coloration ayant l'aspect de la réticuline du tissu conjonctif entourant les fibres du muscle lisse⁴. Voir la cinquième référence pour observer des exemples photographiques en couleur de ce profil.

Remarque : chaque laboratoire doit établir le seuil à partir duquel un résultat positif est considéré cliniquement significatif.

Limites du test

1. Les échantillons inactivés par la chaleur, hémolysés, ayant subi une contamination microbienne ou partiellement défibrinés peuvent produire une coloration de fond élevée et compliquer l'interprétation. Se munir d'un échantillon frais et recommencer le test. L'ajout de 2 % de sérum albumine ou de bovin au tampon PBS utilisé pour diluer les échantillons peut réduire la coloration de fond des échantillons douteux.
2. La source lumineuse, les filtres et le système optique de différents modèles de microscope à fluorescence influent sur la sensibilité du test. La performance du microscope est fortement influencée par le bon entretien, notamment le centrage de la lampe à vapeur de mercure et le remplacement de cette lampe après la durée recommandée.
3. L'œsophage de singe est un tissu autofluorescent, et ce quel que soit le procédé de production des lames de tissu utilisé par le fabricant. Cette fluorescence est maximale dans la lamina propria et dans les régions sous-mucosales. Une attention toute particulière doit donc être portée à l'interprétation des échantillons présentant une faible coloration positive sur la muqueuse musculaire, à savoir au niveau de l'endomysium et du muscle lisse.
4. Les anticorps antinucléaires (ANA), antimitochondries (AMA), antimuscle lisse (ASMA) et antimuscle strié peuvent réagir avec le substrat d'œsophage. Leur présence doit être confirmée sur des substrats appropriés.
5. Des réactions croisées dues à la présence d'anticorps anti-groupe sanguin A et B peuvent être observées car la muqueuse de l'œsophage peut contenir des substances de certains groupes sanguins⁶. Chez certains patients, la coloration peut être identique à celle des anticorps anti-pemphigus, bien que les anticorps anti-groupe sanguin colorent aussi les capillaires du muscle de l'œsophage.
6. Les puits étant proches les uns des autres sur les lames de 10 puits, il est possible d'observer des contaminations croisées entre les échantillons et les contrôles. Veiller à les éviter, notamment pendant les étapes de lavage.
7. Seul, ce test ne doit pas être considéré comme diagnostique. Tous les autres facteurs, y compris les antécédents cliniques des patients et d'autres résultats de tests sérologiques ou de biopsie, doivent également être pris en compte.
8. Utiliser exclusivement un marqueur pour étiqueter les lames. L'utilisation de tout autre moyen d'inscription peut entraîner une coloration artificielle.
9. Tous les tubes de Coplin utilisés pour le lavage des lames doivent être exempts de résidus de colorant. L'utilisation de tubes de Coplin contenant des résidus de colorant peut provoquer une coloration artificielle.
10. Les caractéristiques de performance du test n'ont pas été établies pour d'autres matrices que le sérum.
11. L'adaptation des réactifs pour IFA d'autres fabricants n'a pas été évaluée, mais leur utilisation ne doit pas systématiquement être exclue.

Caractéristiques de performance

Précision

Un total de huit échantillons, représentant des réactions négatives et positives (niveaux de fluorescence entre 0 et 4+), ont été testés dans trois réplicats, deux fois par jour pendant sept jours. Toutes les lames ont été lues sur l'appareil NOVA View, et les clichés numériques ont été examinés par un utilisateur expérimenté. Toutes les lames ont également été interprétées par microscopie manuelle par le même utilisateur. Les résultats ont été exprimés en niveaux de fluorescence (0 à 4+).

Les répétitions d'analyse de chaque échantillon sont situées à \pm un niveau de fluorescence les unes des autres au sein de chaque analyse (répétabilité) et entre analyses et jours d'analyse (reproductibilité) pour l'interprétation numérique et l'interprétation manuelle des clichés.

Valeurs attendues

Pour une population normale, le résultat prévu est « négatif ». Cent neuf (109) échantillons séries provenant de donneurs de sang apparemment sains ont été testés à l'aide de la trousse NOVA Lite DAPI EMA Kit. Les 109 échantillons ont été signalés négatifs suite à une interprétation manuelle et numérique.

Performance clinique

Dans une étude de validation clinique, 538 échantillons ont été testés pour évaluer la performance clinique du dosage. La composition de la cohorte et le nombre de tests positifs sont répertoriés dans le tableau ci-après :

Type d'échantillon (diagnostic)	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	
		Examen manuel	Examen numérique
Gastrite auto-immune (GAI)	15	0	0
Hépatite auto-immune (HAI)	19	0	0
Dermatite herpétiforme (DH)	18	7	6
Maladie cœliaque (CD)	173	-	-
- Avec régime sans gluten	83	30	30
- Avec gluten	90	78	78
Maladie de Crohn (CrD)	49	0	0
Rectocolite ulcéro-hémorragique (UC)	20	0	0
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	5	0	0
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	20	0	0
Cholangite sclérosante primitive (CSP)	10	0	0
Syphilis (SYPH)	15	0	0
Lupus érythémateux disséminé (LED)	20	1	1
Sclérodermie systémique (ScS)	20	0	0
Polyarthrite rhumatoïde (RA)	20	0	0
Thyroïdite auto-immune (AT)	25	0	0
Donneurs de sang sains	109	0	0
Total	538	-	-

La sensibilité et la spécificité ont été calculées pour les interprétations manuelle et numérique des clichés. Pour chaque type d'examen, les calculs ont été réalisés pour les populations consommant du gluten et soumises à un régime sans gluten (sujets sains non inclus lors des calculs de sensibilité / spécificité).

		Sensibilité en % (IC à 95 %)	Spécificité en % (IC à 95 %)
Examen manuel	Avec gluten :	86,7 % (78,1 % à 92,2 %)	96,9 % (94,0 % à 98,4 %)
	Sans gluten :	36,1 % (26,6 % à 46,9 %)	96,9 % (94,0 % à 98,4 %)
Examen numérique	Avec gluten :	86,7 % (78,1 % à 92,2 %)	97,3 % (94,5 % à 98,7 %)
	Sans gluten :	36,1 % (26,6 % à 46,9 %)	97,3 % (94,5 % à 98,7 %)

Les concordances positive, négative et générale entre les examens manuels et numériques des clichés pour les 538 échantillons (sujets sains compris) sont représentées dans le tableau ci-dessous.

	Concordance positive (%) (IC à 95 %)	Concordance négative (%) (IC à 95 %)	Concordance générale (%) (IC à 95 %)
Examen manuel p/r examen numérique	98,3 % (93,9 % à 99,5 %)	99,8 % (98,7 % à 100,0 %)	99,4 % (98,4 % à 99,8 %)

Comparaison des méthodes avec dispositif de référence

Les résultats obtenus avec la trousse NOVA Lite DAPI EMA Kit ont été comparés à ceux obtenus avec le dispositif de prédiction utilisant un conjugué d'IgG sans DAPI.

L'étude de comparaison a été menée en utilisant 269 échantillons de patient caractérisés cliniquement : Toutes les lames ont été interprétées par le biais de la microscopie par fluorescence traditionnelle, et les lames de la trousse NOVA Lite DAPI EMA Kit ont été analysées à l'aide de l'instrument NOVA View. L'interprétation (manuelle et numérique) a inclus le classement en positif/négatif et l'évaluation de la fluorescence des échantillons positifs sur une échelle allant de 1+ à 4+.

La distribution de la cohorte et la fréquence de résultats positifs sont répertoriées dans le tableau ci-après :

Type d'échantillon	n
Maladie de Crohn (CrD)	24
Lupus érythémateux disséminé (LED)	12
Thyroïdite auto-immune (AT)	13
Rectocolite ulcéro-hémorragique (UC)	15
Sclérodermie systémique (ScS)	10
Gastrite auto-immune (GAI)	8
Hépatite auto-immune (HAI)	16
Polyarthrite rhumatoïde (RA)	12
Cholangite sclérosante primitive (CSP)	5
Dermatite herpétiforme (DH)	15
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	8
Syphilis (SYPH)	7
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	3
Maladie cœliaque (CD)	53
Donneurs de sang sains	68
Total	269

La concordance générale est représentée ci-dessous :

	Concordance positive (%) (IC à 95 %)	Concordance négative (%) (IC à 95 %)	Concordance générale (%) (IC à 95 %)
Manuel (prédiction) p/r manuel (NOVA Lite DAPI EMA Kit)	100,0 % (90,8 % - 100,0 %)	98,3 % (95,6 % - 99,3 %)	98,5 % (96,2 % - 99,4 %)
Manuel (prédiction) p/r numérique (NOVA Lite DAPI EMA Kit)	94,7 % (82,7 % - 98,5 %)	98,3 % (95,6 % - 99,3 %)	97,8 % (95,2 % - 99,0 %)

NOVA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2019 Inova Diagnostics, Inc.
Tous droits réservés

Symboles utilisés

IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
CE	Conformité aux normes européennes
EC REP	Représentant européen agréé
	Limite de température
LOT	Code du lot
REF	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour
	Consulter les instructions d'utilisation.

Références

1. Sacchetti L, Ferrajolo A et al. (1996): Diagnostic value of various serum antibodies detected by diverse methods in childhood coeliac disease. Clinical Chemistry **42**: 11; 1838 – 1842.
2. Sategna-Guidetti C et al. (1995): Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium and anti-jejunum antibodies, in adult celiac sprue. J. Clin. Gastroenterol. **20** (1) 17 – 21.
3. Weller, T H, Coons, A H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
4. Hallstrom, O. (1989): Comparison of IgA class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease dermatitis herpetiformis Gut. **30**: 1225-1232.
5. Bradwell A R et al. (1999): Advanced atlas of autoantibody patterns on tissues. Pub: The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
6. Szulman A E. (1962): The histological distribution of blood group substances A and B in man. J. Exp. Med. **115**: 977
7. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition

Fabricant:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America
Technical Service (U.S. & Canada Only) : 1 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Australian Sponsor:

Werfen Australia Pty Ltd
59-61 Dickson Avenue
Artarmon NSW 2064 Australia
Tel. +61 2 9098 0200 / 1300 369 132
<http://au.werfen.com/>

Représentant Autorisé:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

624265FR

Avril 2019
Révision 3

