

NOVA Lite® DAPI ANA Kit

Pour usage diagnostique *in vitro*

Complexité CLIA : élevée

RÉF **704320**

Rx Only

Utilisation prévue

La trousse de test NOVA Lite DAPI ANA Kit est un test indirect par immunofluorescence pour la détection qualitative et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-nucléaires de l'isotype IgG dans le sérum humain par microscopie à fluorescence manuelle ou à l'aide du microscope automatisé NOVA View Automated Fluorescent Microscope. La présence d'anticorps anti-nucléaires peut être utilisée conjointement à d'autres tests sérologiques et résultats cliniques pour faciliter le diagnostic du lupus érythémateux disséminé et d'autres pathologies rhumatismales systémiques. 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

Le terme « anticorps anti-nucléaires » (ANA) désigne une variété d'auto-anticorps qui réagissent avec des composants de noyaux de cellules, notamment l'ADN et l'ARN, mais aussi diverses protéines et ribonucléoprotéines ⁽¹⁾. Ces auto-anticorps sont souvent présents chez les patients souffrant de maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (MRAS), en particulier d'un lupus érythémateux disséminé (LED) ⁽¹⁻⁴⁾. L'immunofluorescence indirecte (IFI) constitue la méthode de référence en matière de test ANA ⁽⁵⁾. Les substrats généralement utilisés sont de fines coupes d'organes de rongeurs ou divers types de lignées cellulaires. Il fait généralement consensus que les substrats de lignées cellulaires sont préférables aux coupes d'organes car ces cellules à division rapide renferment de plus forts taux de certains antigènes cliniquement pertinents, notamment le centromère, le SS-A(Ro), la Scl-70 et le PCNA (cycline). Bien que le test ANA soit parfaitement adapté au dépistage du LED ^(2, 6), il ne s'agit en aucun cas d'un test spécifique. Les patients souffrant d'autres pathologies du tissu conjonctif, notamment du syndrome de Sjögren (SS), de connectivite mixte (MCTD), de polyarthrite rhumatoïde (PR), de sclérodermie généralisée (ScS), de maladies auto-immunes du foie (AIL) et de myopathie auto-immune (MAI), sont souvent positifs, mais de faibles titres en ANA peuvent aussi être observés dans d'autres états pathologiques, par exemple dans les maladies infectieuses, et au sein de la population en général, notamment chez les seniors ⁽⁶⁾. Jusqu'à 20 % des échantillons de sérum provenant de personnes saines produisent un résultat positif lors du dépistage des ANA ^(7, 8). Le substrat choisi pour la trousse de test NOVA Lite DAPI ANA Kit est une lignée cellulaire épithéliale (HEp-2) humaine fixée de manière optimale et le conjugué FITC (fluorescéine-5-isothiocyanate) est un IgG anti-humain purifié par affinité possédant une affinité spécifique vis-à-vis de Fc. Les paramètres de ces réactifs permettent au test NOVA Lite DAPI ANA Kit de détecter des auto-anticorps ayant une pertinence clinique (y compris le SS-A et la Scl-70), que d'autres tests ANA disponibles dans le commerce ne parviennent pas toujours à détecter. En outre, la spécificité du conjugué à base d'IgG élimine les faux positifs physiologiques dus à la présence normale d'auto-anticorps IgM faiblement titrés, souvent présents chez les personnes âgées, mais en bonne santé.

Principes du test

Les échantillons sont dilués jusqu'à un titre initial de 1/80 dans le diluant pour échantillons, avant d'être incubés avec le substrat d'antigène. Les anticorps non liés sont ensuite éliminés par rinçage. Le substrat est ensuite incubé avec le conjugué FITC-IgG anti-humain. Le conjugué contient également un colorant fluorescent bleu se liant à l'ADN, le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)⁽⁹⁾, qui doit être utilisé conjointement à NOVA View. Le colorant bleu n'est pas visible par microscopie à fluorescence classique à la longueur d'onde de détection de la fluorescence du FITC. Le réactif non lié est lavé, puis les lames sont recouvertes. Les lames colorées peuvent être lues et interprétées par microscopie à fluorescence classique, ou peuvent être analysées par NOVA View avant examen des clichés numériques par un utilisateur expérimenté. Les échantillons positifs aux ANA affichent une fluorescence vert pomme dans les zones du noyau de la cellule où l'auto-anticorps s'est lié. Certains sérums peuvent contenir des anticorps réagissant avec les antigènes cytoplasmiques et afficher une fluorescence vert pomme dans les zones du cytoplasme de la cellule où l'auto-anticorps s'est lié. Lorsque les lames sont analysées par NOVA View, des clichés numériques des zones représentatives du puits sont capturés. Ces clichés doivent être examinés et interprétés sur ordinateur par un utilisateur expérimenté. Dans le cadre de la microscopie à fluorescence manuelle, les échantillons positifs au 1/80e peuvent être titrés en réalisant une double dilution en série à partir de la première dilution de dépistage avec le diluant pour échantillons (c.-à-d. 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, etc.).

Réactifs

- Lames de substrat HEp-2 (cellule épithéliale humaine) ; 12 puits/lame, avec dessicatif.
- Conjugué FITC-IgG anti-humain (Fc) avec DAPI contenant de l'azote de sodium à 0,09 % ; prêt à l'emploi.
- Contrôle positif : profil titrable des ANA, sérum humain contenant des anticorps dirigés contre le noyau de HEp-2 dans un tampon, contenant de l'azote de sodium à 0,09 % ; prédilué, prêt à l'emploi.
- Contrôle négatif : contrôle négatif du système IFA, sérum humain dilué sans ANA, contenant de l'azote de sodium à 0,09 % ; prédilué, prêt à l'emploi.
- Concentré de PBS II (40x), suffisant pour réaliser 2000 mL de PBS II. Sert de diluant d'échantillon et de tampon de lavage.
- Support pour préparations microscopiques contenant de l'azote de sodium à 0,09 %
- Lamelles

Avertissements

1. Toutes les substances d'origine humaine utilisées pour préparer les contrôles du kit 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. Par conséquent, le profil titrable des ANA et le contrôle négatif du système IFA doivent être manipulés en prenant les mêmes précautions universelles que pour les substances potentiellement infectieuses ⁽¹⁰⁾.
2. L'azoture de sodium est utilisé comme conservateur dans certains composants de la trousse. 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. 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 personnelle approprié pour travailler avec les réactifs fournis.
4. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter toutes les législations environnementales nationales et locales relatives à l'élimination des déchets.

Précautions

1. La substitution par des composants autres que ceux fournis dans ce système peut entraîner une incohérence des résultats.
2. Un lavage incomplet ou inefficace des puits IFI peut provoquer un fond élevé.
3. L'adaptation du traitement des lames à 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.
4. Divers facteurs influent sur les performances du test, notamment la température 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.
5. Il est recommandé de respecter strictement le protocole.

Conditions de conservation

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 lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions.
2. Le tampon PBS II est stable pendant 4 semaines lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C.

Prélèvement des échantillons

- Ce test doit être réalisé avec des échantillons de sérum. L'ajout d'azoture ou de conservateurs aux échantillons de test peut fausser les résultats.
- Les échantillons ayant subi une contamination microbienne et thermo-traités ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les échantillons contenant jusqu'à 10 mg/dl de bilirubine, 200 mg/dl d'hémoglobine, 1000 mg/dl de triglycérides, 224 mg/dl de cholestérol ou 56 UI de facteur rhumatoïde IgM n'ont produit aucune interférence avec la trousse de test NOVA Lite DAPI ANA Kit.
- Suite au prélèvement, le sérum doit être séparé du caillot. Il est recommandé de conserver les échantillons dans les conditions suivantes :
 1. Le sérum peut être conservé jusqu'à 24 heures à température ambiante.
 2. Le sérum peut être conservé jusqu'à 7 jours entre 2 et 8 °C.
 3. Si le test n'est pas effectué dans les 7 jours, ou pour expédier le sérum, le 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.

Mode opératoire

Matériel fourni

Article fourni	Quantité
ANA HEp-2, QR Slide	20 x 12 puits
FITC IgG Conjugate with DAPI	1 x 15 mL
ANA Titratable Pattern	1 x 0,5 mL
IFA System Negative Control	1 x 0,5 mL
PBS II Concentrate (40x)	2 x 25 mL
Mounting Medium	1 x 7 mL
Coverslips	1 x 20

Matériel supplémentaire requis mais non fourni

- Micropipettes permettant d'administrer un volume de 10-1000 µL
- Eau distillée ou désionisée
- Pissettes en plastique ou pipettes de Pasteur
- Chambre humide
- Conteneurs de 1 L (pour diluer le PBS)
- Tube(s) de Coplin
- Microscope à fluorescence manuel 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 II (40X) : Diluer le concentré de PBS II (40X) selon un rapport 1:40 en ajoutant le contenu du flacon de concentré de PBS à 975 mL d'eau distillée ou désionisée et bien mélanger. Le tampon PBS II 1X sert à diluer les échantillons de patient et de tampon de lavage.
3. Diluer les échantillons de patient : Pour le dépistage initial, diluer les échantillons de patient selon un rapport de 1/80 avec le tampon PBS II 1X (par exemple, ajouter 10 µL de sérum à 790 µL de tampon PBS II 1X). Bien mélanger.

Procédure de test

1. Préparation des lames de substrat : laisser la lame de substrat atteindre la température ambiante avant de la retirer de son sachet. Étiqueter les lames avec un marqueur (si nécessaire) et les placer dans une chambre humide adaptée. Ajouter 1 goutte de contrôles positif et négatif non dilués respectivement dans les puits 1 et 2. Ajouter 30 ± 10 µl d'échantillon de patient dilué dans les puits restants.
2. Incubation des lames : incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes dans une chambre humide (une serviette en papier humidifiée est placée à plat au fond d'un conteneur en plastique ou en verre fermé pour maintenir des conditions d'humidité appropriées). Ne pas laisser le substrat sécher pendant la procédure de test.
3. Lavage des lames : après l'incubation, utiliser une pissette en plastique ou pipeter pour éliminer délicatement le sérum par rinçage à l'aide d'un tampon PBS II dilué. Orienter la lame et appliquer le tampon PBS de façon à limiter le débordement et la contamination d'échantillons d'un puits à l'autre. Éviter de diriger le flux directement sur les puits pour ne pas endommager le substrat. Placer les lames dans un tube de Coplin contenant un tampon PBS II pendant au moins 5 minutes.
4. Ajout du conjugué fluorescent : retirer les lames (une à la fois) du tube de Coplin. Tapoter le tampon PBS pour éliminer tout excès. Remettre la lame dans la chambre humide et recouvrir immédiatement chaque puits d'une goutte de conjugué FITC-IgG avec DAPI. Incuber les lames pendant 30 ± 5 minutes.
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 lamelle sur une serviette en papier.
 - b. Appliquer un support pour préparations microscopiques sur une ligne continue au fond de la lamelle.
 - c. 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.

Contrôle de qualité

- Le profil titrable des ANA et le contrôle négatif du système IFA doivent être intégrés dans chaque analyse pour s'assurer que tous les réactifs et toutes les procédures 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 de test soient considérés comme valides, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être remplis. Si l'un d'eux ne l'est pas, les résultats de test doivent être considérés comme non valides et il devra être répété.
 1. Le profil titrable des ANA non dilué doit produire une réaction ANA positive, avec un profil homogène d'une intensité ≥ 3+.
 2. Le contrôle négatif du système IFA doit produire une réaction ANA négative.
- Le profil titrable des ANA est adapté au titrage limite. Une fois le titrage limite déterminé par le laboratoire, la sensibilité analytique constante du test peut être contrôlée par une surveillance régulière de la limite du profil titrable des ANA. Chaque laboratoire doit déterminer son propre titrage limite en utilisant son matériel et son microscope, ainsi qu'en appliquant ses processus. Les titres obtenus peuvent varier d'un laboratoire à l'autre selon le microscope, la source lumineuse et l'agrandissement utilisés pour déterminer la limite.

Interprétation des résultats

Les lames sont examinées et les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope à fluorescence. Il est recommandé d'utiliser un objectif à grossissement 40x pour l'interprétation finale.

De façon alternative, les lames sont placées dans un appareil NOVA View avant d'être analysées par l'instrument. Les clichés numériques résultants doivent être examinés et interprétés sur ordinateur par un utilisateur expérimenté. Consulter le Manuel de l'utilisateur de Nova View pour plus de détails sur la lecture et l'interprétation des lames avec Nova View.

NOVA View identifie cinq profils caractéristiques : homogène, moucheté, centromère, nucléolaire, à points nucléolaires. Les profils IFI pouvant être mixtes, non caractéristiques et variables, il est possible que le logiciel ne puisse pas identifier de profil pour chacun des échantillons positifs. Dans ce cas, le profil est marqué comme « non reconnu ». Le profil final est alors déterminé par l'utilisateur.

- **Réaction négative** : un échantillon est considéré comme négatif si le noyau et le cytoplasme ne présentent aucune coloration spécifique. Les échantillons peuvent révéler divers degrés de coloration de fond en raison d'anticorps hétérophiles ou d'auto-anticorps non spécifiques de faible niveau dirigés contre des composants cytoplasmiques, tels que les protéines contractiles.
- **Réaction positive** : un échantillon est considéré comme positif si le noyau présente une coloration spécifique.
- **Niveau de réactivité** : il est recommandé de déterminer le degré de fluorescence ou l'intensité à l'aide des critères suivants :
 - 4+ Fluorescence vert pomme brillante
 - 3+ Fluorescence vert pomme claire
 - 2+ Fluorescence positive clairement distincte
 - 1+ Fluorescence la moins spécifique permettant de distinguer clairement la coloration nucléaire et/ou cytoplasmique de la fluorescence de fond.

- **Interprétation du profil :**

Différents profils de coloration nucléaire et/ou cytoplasmique peuvent apparaître selon les types et les quantités relatives d'auto-anticorps présents dans l'échantillon.

Les types de profils de coloration suivants peuvent être observés le plus fréquemment :

Homogène : coloration homogène du noyau, avec ou sans masquage apparent des nucléoles, avec coloration positive de la chromatine métaphase dans les cellules mitotiques.

Anticorps spécifiques : le plus fréquemment, anticorps contre dsDNA, ssDNA, chromatine, histones.

Association pathologique : suggère un LED ou d'autres pathologies du tissu conjonctif.

Moucheté : coloration granuleuse du noyau, généralement sans coloration fluorescente des nucléoles ni coloration de la chromatine métaphase dans les cellules mitotiques.

Anticorps spécifiques : le plus fréquemment, anticorps contre Sm, RNP, SS-A (Ro), SS-B (La). L'anticorps anti-Scl-70 produit généralement une coloration mouchetée fine et diffuse, souvent avec une coloration nucléolaire supplémentaire, mais également avec une coloration de la chromatine métaphase dans les cellules mitotiques.

Association pathologique : suggère un LED ou d'autres pathologies du tissu conjonctif.

Nucléolaire : vaste coloration mouchetée et grossière dans le noyau, généralement inférieure à 6 en nombre par cellule, avec ou sans mouchetures fines occasionnelles et coloration de la chromatine métaphase dans les cellules mitotiques.

Anticorps spécifiques : le plus fréquemment, anticorps contre la fibrillarine, l'ARN polymérase, PM/Scl, Th/To et d'autres antigènes nucléolaires.

Association pathologique : les titres élevés sont le plus souvent observés dans les cas de sclérodermie généralisée.

Centromère : profil de coloration mouchetée et discrète. Les mouchetures nucléaires sont très discrètes et s'observent dans certains multiples de 46, la chromatine métaphase des cellules mitotiques étant mouchetée et condensée.

Anticorps spécifiques : anticorps contre la protéine du centromère A ou B (CENP-A, CENP-B).

Association pathologique : très suggestif du syndrome CREST, variante de la sclérose généralisée. CREST est une forme de sclérose généralisée avec calcinose proéminente (C), phénomène de Raynaud (R), dysmotilité œsophagienne (E), sclérodactylie (S) et tégangiectasie (T).

Points nucléaires : quelques petites mouchetures discrètes dans le noyau, avec cellules mitotiques métaphases négatives. Le nombre de mouchetures discrètes peut varier (3 à 20 par cellule) en fonction de la spécificité vis-à-vis de l'antigène.

Anticorps spécifiques : anticorps contre Sp-100, PML, p80-coïline.

Association pathologique : très suggestif de la cirrhose biliaire primitive.

En présence comme en absence de coloration nucléaire, une coloration cytoplasmique peut être présente du fait d'anticorps dirigés contre les structures cytoplasmiques, comme les mitochondries, la protéine ribosomale P, l'histidyl-tARN synthétase (Jo-1), l'appareil de Golgi, entre autres.

Il est important d'avertir l'utilisateur de ne pas se fier aux profils pour déterminer la spécificité des auto-anticorps, sauf pour le profil centromère, qui est très caractéristique et bien défini.

Consulter le manuel de l'opérateur du NOVA View pour obtenir des informations sur l'interprétation des résultats à partir des clichés numériques générés par NOVA View.

Limites du test

1. L'ANA à titrage élevé est indicateur d'une pathologie du tissu conjonctif, mais ne doit pas être considéré comme diagnostique. Le résultat de test ANA doit être envisagé conjointement à d'autres résultats sérologiques et à l'ensemble des antécédents cliniques du patient, y compris les signes et symptômes.
2. Les profils ANA changent souvent lorsque l'échantillon est titré au point limite. Ce phénomène est dû à la chute des anticorps plus faiblement titrés au-dessous de la sensibilité du système car l'échantillon analysé est plus dilué.
3. Divers facteurs externes influent sur la sensibilité du test, notamment le type de microscope à fluorescence utilisé, la puissance de la source lumineuse et l'agrandissement choisi.
4. Il est recommandé d'utiliser un marqueur pour étiqueter les lames. L'utilisation de tout autre moyen d'inscription peut entraîner une coloration artificielle.
5. 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 non spécifique.
6. Les résultats de ce test doivent être utilisés conjointement aux résultats cliniques et à d'autres examens sérologiques.
7. Les caractéristiques de performances du test n'ont pas été établies pour d'autres matrices que le sérum.
8. L'appareil NOVA View doit uniquement être utilisé avec des échantillons de patients dilués au 1/80e.
9. La première détermination d'un titre par l'analyseur NOVAVIEW est donnée de façon estimative. Aussi, ce dernier peut être vérifié et validé en comparaison de la méthode initialement utilisée par le laboratoire. Cette vérification/validation est effectuée à la mise en place de la méthode.
10. NOVA View doit uniquement être utilisé avec des réactifs indiqués pour une utilisation avec le dispositif.
11. Tous les résultats obtenus à l'aide du logiciel doivent être confirmés par un utilisateur expérimenté.
12. NOVA View est réservé aux utilisateurs expérimentés travaillant en laboratoire clinique.

Précision

Un ensemble de 43 échantillons, représentant des réactions négatives et positives, les cinq profils (homogène, moucheté, centromère, nucléolaire, à points nucléolaires) et les niveaux de fluorescence entre 0 et 4+ a été testé en une ou deux analyses par jour, en triple ou en double, pendant cinq jours, en trois expériences distinctes. Toutes les lames ont été lues sur l'appareil NOVA View, et les clichés numériques ont été examinés par un utilisateur expérimenté. Les résultats ont été exprimés en niveaux de fluorescence (0 à 4+). De plus, pour 30 échantillons sur 43, les mêmes lames ont également été lues sur microscope à fluorescence manuel. Les répétitions d'analyse de chaque échantillon sont situées à ± 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.

Reproductibilité

Une cohorte de 120 échantillons sériques choisis est testée avec la trousse NOVA Lite DAPI ANA Kit chez Inova et sur deux sites cliniques externes. Les échantillons sont choisis de sorte à inclure tous les profils ANA caractéristiques, et divers niveaux d'intensité de fluorescence, depuis le faiblement positif jusqu'au hautement positif. Sur chaque site, les lames sont analysées sur NOVA View, et les clichés numériques obtenus sont interprétés par le même utilisateur, qui examine ensuite les mêmes lames par microscopie à fluorescence classique. La reproductibilité intersites est évaluée en calculant la concordance positive moyenne, la concordance négative moyenne et la concordance générale entre les résultats générés par NOVA View, le résultat des examens des clichés numériques et les résultats des examens manuels (classiques) pour les trois sites. La concordance est également calculée entre les méthodes au niveau de chaque site. Les résultats sont illustrés ci-dessous :

Examen manuel	Site n° 1 p/r Site n° 2	Site n° 1 p/r Site n° 3	Site n° 2 p/r Site n° 3
Concordance nég, moyenne en % (IC 95 %)	97,6 (94,3-100,0)	99,2 (97,4-100,0)	96,8 (93,1-99,3)
Concordance pos, moyenne en % (IC 95 %)	97,4 (94,0-100,0)	99,1 (97,0-100,0)	96,6 (92,7-99,2)
Concordance générale en % (IC 95 %)	97,5 (92,9-99,5)	99,2 (95,4-100,0)	96,87(91,7-99,1)

Examen sur NOVA View	Site n° 1 p/r Site n° 2	Site n° 1 p/r Site n° 3	Site n° 2 p/r Site n° 3
Concordance nég, moyenne en % (IC 95 %)	100 (100,0-100,0)	96,6 (93,3-99,3)	96,6 (93,3-99,3)
Concordance pos, moyenne en % (IC 95 %)	100 (100,0-100,0)	96,4 (92,4-99,2)	96,4 (92,4-99,2)
Concordance générale en % (IC 95 %)	100 (97,0-100,0)	96,7 (91,7-99,1)	96,7 (91,7-99,1)

Examen des clichés numériques	Site n° 1 p/r Site n° 2	Site n° 1 p/r Site n° 3	Site n° 2 p/r Site n° 3
Concordance nég, moyenne en % (IC 95 %)	95,9 (91,7-99,2)	95,4 (91,2-98,6)	92,9 (87,7-97,1)
Concordance pos, moyenne en % (IC 95 %)	95,8 (91,6-99,2)	94,5 (89,6-98,3)	92,0 (86,2-96,7)
Concordance générale en % (IC 95 %)	95,8 (90,5-98,6)	95,0 (89,4-98,1)	92,5 (86,2-96,5)

Concordance totale entre les méthodes en % (IC 95 %)	Site n° 1	Site n° 2	Site n° 3
Examen manuel p/r examen des clichés numériques	99,2 (95,4-100,0)	95,8 (90,5-98,6)	96,7 (91,7-99,1)
Examen manuel p/r NOVA View	99,2 (95,4-100,0)	96,7 (91,7-99,1)	96,7 (91,7-99,1)
Examen des clichés numériques p/r NOVA View	100 (97,0-100,0)	95,8 (90,5-98,6)	98,3 (94,1-99,8)

La concordance entre les profils est évaluée via des comparaisons deux à deux entre l'examen manuel, les résultats obtenus par NOVA View et l'examen des clichés numériques pour chaque site. Seuls les profils définitifs (homogène, moucheté, centromère, nucléolaire, à points nucléolaires) sont pris en compte pour la concordance entre profils. Les profils « non reconnus » dans NOVA View et les profils marqués comme « Autre » par l'utilisateur ne sont pas pris en compte pour les concordances.

Sur les 120 échantillons de la cohorte de reproductibilité, le Site n° 1 signale 57 échantillons positifs par examen manuel (méthode de référence), le Site n° 2, 60 et le Site n° 3, 56. Le tableau récapitulatif de la concordance entre profils est présenté ci-après.

Cohorte de reproductibilité n = 120	Nombre (%) d'échantillons avec concordance entre profils*		
	Site n° 1	Site n° 2	Site n° 3
Manuel p/r numérique	55 (96,5%)	57 (95,0%)	54 (96,4%)
Manuel p/r NOVA View	45 (78,9%)	50 (83,3%)	45 (80,4%)
Numérique p/r NOVA View	44 (77,2%)	48 (80,0%)	45 (80,4%)

*En pourcentage d'échantillons positifs par interprétation manuelle

Les niveaux d'intensité de fluorescence déterminés par examen manuel et examen des clichés numériques sont à ± une étape de dilution les uns des autres dans la comparaison intersites, comme indiqué ci-après :

Pourcentages d'échantillons avec niveaux situés à ± une étape de dilution les uns des autres	Site n° 1 p/r Site n° 2	Site n° 1 p/r Site n° 3	Site n° 2 p/r Site n° 3
Examen manuel	99,2	93,3	95,0
Examen des clichés numériques	96,6	87,5	91,7

Remarque : les différences d'interprétation des profils et de niveaux de fluorescence incluent une variabilité qui est liée à l'expérience et à la formation de l'utilisateur.

Valeurs attendues

Pour une population normale, le résultat prévu est « négatif ». Cependant, il a été décrit qu'une proportion variable de la population générale saine réagissait positivement au test ANA. ⁽⁶⁻⁸⁾ Soixante-quinze (75) échantillons sériques provenant de donneurs de sang apparemment sains ont été testés à l'aide de la trousse NOVA Lite DAPI ANA Kit. Sur les 75 échantillons, respectivement 4 (5,3 %), 5 (6,7 %) et 4 (5,3 %) résultats positifs sont obtenus par examen manuel, examen numérique et classification NOVA View, le niveau de fluorescence le plus élevé étant 2+.

Performance clinique

Dans une étude de validation clinique, 463 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	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs		
		NOVA View	Examen manuel	Examen numérique
Contrôle sain	75	4	4	5
VHB (positif à l'hépatite B)	20	1	5	3
VHC (positif à l'hépatite C)	5	2	0	2
VIH (positif au VIH)	5	2	0	2
Syphilis	5	3	0	3
LED (lupus érythémateux disséminé)	75	60	54	60
ScS (sclérose systémique)	20	19	19	19
SS (syndrome de Sjögren)	20	12	9	13
AIL (maladies auto-immunes du foie)	20	20	16	20
PR (polyarthrite rhumatoïde)	20	15	11	14
MCTD (connectivite mixte)	21	10	10	10
Myopathie auto-immune (MAI)	26	6	7	6
Fibromyalgie	25	6	9	6
Positif aux anti-MPO/anti-PR3	26	1	3	4
Maladie inflammatoire chronique intestinale/maladie de Crohn	20	8	9	8
Maladie thyroïdienne autoimmune/positif aux anti-TPO	24	2	4	3
Maladie cœliaque/positif aux anti-tTG	24	3	4	3
Lupus induit par le médicament (LIM)	25	4	5	5
Autre	7	1	2	1
Total	463	179	171	187

La sensibilité est calculée séparément pour le LED et pour la combinaison des maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (MRAS) (LED + ScS + SS + MCTD + MAI + LIM) et de la population atteinte de maladies auto-immunes du foie (AIL). La spécificité est calculée sur la population de contrôle totale à l'exclusion des sujets sains, selon l'interprétation par NOVA View, les résultats de l'examen des clichés numériques et les résultats de l'examen manuel (au microscope). La population de contrôle inclut les échantillons des patients atteints de PR.

Site n° 1 :

	Sensibilité en % (IC à 95 %)		Spécificité en % (IC à 95 %) (N = 174)
	LED (N = 75)	MRAS + AIL (N = 186)	
NOVA View	80,0 (69,2-88,4)	69,4 (62,2-75,9)	75,3 (68,2-81,5)
Examen manuel	72,0 (60,4-81,8)	62,9 (55,5-69,9)	74,1 (67,0-80,5)
Examen numérique	80,0 (69,2-88,4)	69,9 (62,8-76,4)	72,4 (65,1-78,9)

Les mêmes 463 échantillons sont également testés au niveau de deux sites cliniques externes. Les résultats sont répertoriés ci-dessous :

Site n° 2 :

	Sensibilité en % (IC à 95 %)		Spécificité en % (IC à 95 %) (N = 174)
	LED (N = 75)	MRAS + AIL (N = 186)	
NOVA View	72,0 (60,4-81,8)	62,9 (55,5-69,9)	77,0 (70,0-83,0)
Examen manuel	70,7 (59,0-80,6)	65,6 (58,3-72,4)	67,2 (59,7-74,2)
Examen numérique	73,3 (61,9-82,9)	62,98 (55,5-69,9)	75,3 (68,2-81,5)

Site n° 3 :

	Sensibilité en % (IC à 95 %)		Spécificité en % (IC à 95 %) (N = 174)
	LED (N = 75)	MRAS + AIL (N = 186)	
NOVA View	82,7 (72,2-90,4)	72,0 (65,0-78,4)	69,0 (61,5-75,7)
Examen manuel	82,7 (72,2-90,4)	71,0 (63,9-77,4)	67,2 (59,7-74,2)
Examen numérique	81,3 (70,7-89,4)	69,4 (62,2-75,9)	71,3 (63,9-77,9)

La concordance générale entre l'examen manuel, l'examen des clichés numériques et les résultats de NOVA View au niveau des trois sites de test est présentée ci-après :

Concordance totale entre les méthodes en % (N = 463)	Site n° 1	Site n° 2	Site n° 3
Examen manuel p/r NOVA View	89,6 (86,5-92,3)	89,8 (86,7-92,4)	87,0 (83,6-90,0)
Examen manuel p/r examen numérique	91,4 (88,4-93,8)	92,2 (89,4-94,5)	92,2 (89,4-94,5)
Examen numérique p/r NOVA View	97,0 (95,0-98,3)	96,3 (94,2-97,8)	92,2 (89,4-94,5)

La concordance entre les profils est évaluée via des comparaisons deux à deux entre l'examen manuel, les résultats obtenus par NOVA View et l'examen des clichés numériques. Seuls les profils définitifs (homogène, moucheté, centromère, nucléolaire, à points nucléolaires) sont pris en compte pour la concordance entre profils. Les profils « non reconnus » dans NOVA View et les profils marqués comme « Autre » par l'utilisateur ne sont pas pris en compte pour les concordances.

Sur les 463 échantillons cliniques, le Site n° 1 signale 171 échantillons positifs par examen manuel (méthode de référence), le Site n° 2, 190 et le Site n° 3, 209. Le tableau récapitulatif de la concordance entre profils est présenté ci-après.

Cohorte clinique n = 463	Nombre (%) d'échantillons avec concordance entre profils*		
	Site n° 1	Site n° 2	Site n° 3
Manuel p/r numérique	162 (94,7%)	174 (91,6%)	200 (95,7%)
Manuel p/r NOVA View	130 (76,0%)	164 (86,3%)	152 (72,7%)
Numérique p/r NOVA View	119 (69,6%)	168 (88,4%)	157 (75,1%)

*En pourcentage d'échantillons positifs par interprétation manuelle

Les niveaux d'intensité de fluorescence déterminés par examen des clichés numériques sont à ± une étape de dilution de ceux déterminés par examen manuel classique pour 96,3 %, 99,1 % et 99,6 % des échantillons au niveau des trois sites.

Les sérums de référence du CDC (Center of Disease Control and Prevention) pour les anticorps antinucléaires ^(11, 12) ont également été testés à l'aide de la trousse NOVA Lite DAPI ANA Kit. Tous les sérums de référence produisent le profil ANA attendu. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

CDC, sérum de référence ANA humain, ID	Profil ANA attendu	Anticorps spécifiques connus	Profil de fluorescence, examen manuel	Profil de fluorescence, examen des clichés numériques
Sérum de référence n° 1	Homogène/membranaire	nADN	Homogène	Homogène
Sérum de référence n° 2	Moucheté	SS-B/La	Moucheté	Moucheté
Sérum de référence n° 3	Moucheté	RNP, SS-B/La, SS-A/Ro	Moucheté	Moucheté
Sérum de référence n° 4	Moucheté	U1-RNP	Moucheté	Moucheté
Sérum de référence n° 5	Moucheté	Sm	Moucheté	Moucheté
Sérum de référence n° 6	Nucléolaire	Fibrillarine	Nucléolaire	Nucléolaire
Sérum de référence n° 7	S/O	SS-A/Ro	Moucheté	Moucheté
Sérum de référence n° 8	Centromère	Centromère	Centromère	Centromère
Sérum de référence n° 9	S/O	Scl-70	Homogène	Homogène

CDC, sérum de référence ANA humain, ID	Profil ANA attendu	Anticorps spécifiques connus	Profil de fluorescence, examen manuel	Profil de fluorescence, examen des clichés numériques
Sérum de référence n° 10	S/O	Jo-1	Négatif à ANA ; moucheté cytoplasmique	Négatif à ANA ; moucheté cytoplasmique
Sérum de référence n° 11	S/O	PM-Scl	Nucléolaire	Nucléolaire
Sérum de référence n° 12	S/O	Ribosomes P	Négatif*	Négatif*

**Les anticorps antiribosomes présentent des niveaux de détectabilité variables sur les cellules HEp-2*

Réactivité croisée

La réactivité croisée est examinée sur 114 échantillons inclus dans l'étude de validation clinique. Les échantillons proviennent de patients souffrant de maladie thyroïdienne auto-immune/présentant des anticorps anti-thyroïde peroxydase (TPO), souffrant de maladie cœliaque/présentant des anticorps anti-transglutaminase tissulaire (tTG), présentant des anticorps anti-myéloperoxydase (MPO) et anti-protéinase 3 (PR3), souffrant de maladie de Crohn/maladie inflammatoire chronique de l'intestin et souffrant de polyarthrite rhumatoïde.

Le nombre et la répartition de la population sont détaillés dans le Tableau ci-après, avec le taux de positivité ANA. Sur l'ensemble des 114 échantillons, le taux de positivité observé est de 25 % pour les résultats de NOVA View, de 27 % pour l'examen des clichés numériques et de 28 % pour l'examen manuel. Lorsque l'on exclut les échantillons de polyarthrite rhumatoïde, le taux de positivité est de 15 % pour les résultats de NOVA View, de 19 % pour l'examen des clichés numériques et de 21 % pour les examens manuels. Ce taux de positivité concordent avec les résultats attendus et la bibliographie publiée.⁽⁵⁻⁸⁾ Il a été précédemment décrit que le test ANA pouvait être positif en cas de PR. Les anticorps RA-33 sont présents chez jusqu'à 36 % des patients de PR, et des anticorps anti-histone ont également été identifiés dans le sérum de sujets atteints de PR.⁽¹³⁻¹⁶⁾

Réactivité croisée		Taux de positivité					
		NOVA View		Examen manuel		Examen numérique	
Type d'échantillon	Nombre	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Anti-MPO/anti-PR3	26	1	4%	3	12%	4	15%
Maladie inflammatoire chronique intestinale/maladie de Crohn	20	8	40%	9	45%	8	40%
Maladie thyroïdienne auto-immune	24	2	8%	4	17%	3	13%
Maladie cœliaque	24	3	13%	4	17%	3	13%
Polyarthrite rhumatoïde	20	15	75%	11	55%	14	70%
Total	114	29	25%	31	28%	32	27%

Concordance entre le test NOVA Lite DAPI et le dispositif de prédiction

Les résultats obtenus avec la trousse NOVA Lite DAPI ANA Kit, en utilisant une dilution du sérum au 1/80e, ont été comparés à ceux obtenus avec le dispositif de prédiction utilisant une dilution du sérum au 1/40e, et au conjugué d'IgG antihumain sans DAPI.

L'étude de comparaison a été menée sur 410 échantillons : 400 sérums cliniquement caractérisés et 10 échantillons présentant des profils ANA connus. Toutes les lames ont été interprétées par microscopie à fluorescence classique. L'interprétation incluait le classement en positif/négatif, l'interprétation des profils et l'évaluation 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 :

	Nombre d'échantillons	Nombre de positifs au 1/40e	Nombre de positifs au 1/80e
Contrôles apparemment sains	150	41	17
LED (lupus érythémateux disséminé)	100	85	81
SS (syndrome de Sjögren)	30	23	21
ScS (sclérose systémique)	30	20	15
Myopathie auto-immune (MAI)	10	9	7
MCTD (connectivite mixte)	20	12	12
Maladie infectieuse	30	6	4
PR (polyarthrite rhumatoïde)	30	20	17
Positif aux anticorps anti-centromères	5	5	5
Positif aux anticorps anti-mitochondries	5	4	5
Total	410	224	184

La concordance entre les deux méthodes est présentée ci-après :

	Concordance positive en % (IC 95 %)	Concordance négative en % (IC 95 %)	Concordance totale en % (IC 95 %)
Dilution au 1/80e p/r 1/40e	79.9 (74.1-85.0)	97.3 (91.5-100.0)	87.7 (84.2-90.8)

179 échantillons étaient positifs selon les deux méthodes. Le nombre de profils incohérents (en excluant les incohérences négatives/positives, mais en incluant les profils interprétés comme « autres ») était de cinq (2,2 % des échantillons ayant obtenu un résultat positif à la dilution au 1/40e).

Les niveaux d'intensité de fluorescence sont situés à ± un niveau les uns des autres pour 407 échantillons (99,5 %). La concordance entre niveaux est présentée dans la matrice ci-après :

Niveau de fluorescence dans la dilution au 1/80e	Niveau de fluorescence dans la dilution au 1/40e					
	0	1+	2+	3+	4+	Total
0	181	44	1	0	0	226
1+	3	35	31	0	0	69
2+	1	3	37	24	0	65
3+	0	0	0	14	11	25
4+	0	0	0	1	23	24
Total	185	82	69	39	34	409*

*Dans l'un des échantillons, le niveau n'a pas été consigné.

Sur les 410 échantillons, 45 étaient positifs au 1/40e et négatif au 1/80e. De plus, quatre échantillons négatifs au 1/40e étaient positifs au 1/80e. Sur les 45 échantillons, 28 provenaient de la population générale + les patients atteints de maladies infectieuses, et 3 présentaient un diagnostic de PR. Deux échantillons provenaient de patients atteints de MAI, deux de patients atteints du syndrome de Sjögren, cinq de LED et cinq de sclérose systémique. Tous ces échantillons présentaient un niveau d'intensité de fluorescence de 1+, à l'exception d'un échantillon de myosite qui présentait un niveau de 2+.

La prévalence des ANA dans la population générale saine (n = 150) était de 27,3 % lorsque les sérums étaient testés au 1/40e, et de 11,3 % lorsqu'ils étaient testés au 1/80e.

La spécificité et la sensibilité clinique générale sont présentées ci-après :












	Sensibilité en % (IC à 95 %)		Spécificité* en % (IC à 95 %) (N = 60)
	LED (N = 100)	MRAS (N = 190)	
Dilution au 1/40e	85,0 (76,5-91,4)	78,4 (71,9-84,0)	56,7 (43,2-69,4)
Dilution au 1/80e	81,0 (71,9-88,2)	71,6 (64,4-77,9)	65,0 (51,6-76,9)

MRAS : maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (inclut LED, ScS, SS, MCTD et MAI)

* Les échantillons de contrôle incluent les patients de PR et ceux souffrant de maladies infectieuses

NOVA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2018 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

Symboles utilizes

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour
	Consulter les instructions d'utilisation.

References

1. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology* 33: 167-239, 1982.
2. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P; Italian Society of Laboratory Medicine Study Group on the Diagnosis of Autoimmune Diseases. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:316-24.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 25: 1271-1277, 1982.
4. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725-1734
5. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1420–2.
6. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002 Aug;47(4):434-44.
7. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in healthy people: the tip of autoimmunity's iceberg? *Arthritis Res Ther* 2011;13:109.
8. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, Jusko TA, Walker NJ, Germolec DR, Whitt IZ, Crockett PW, Pauley BA, Chan JY, Ross SJ, Birnbaum LS, Zeldin DC, Miller FW. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2319-27.
9. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem.* 1995;70:220-33.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition.
11. Molden DP, Nakamura RM, Tan EM. Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity. *Am J Clin Pathol.* 1984;82:57-66.
12. Smolen JS, Butcher B, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin J, Kalden JR, Lahita R, Maini RN, Reeves W, Reichlin M, Rothfield N, Takasaki Y, van Venrooij WJ, Tan EM. Reference sera for antinuclear antibodies. II. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and western blotting. *Arthritis Rheum.* 1997;40:413-8.
13. Cordonnier C, Meyer O, Palazzo E, de Bandt M, Elias A, Nicaise P, Haïm T, Kahn MF, Chatellier G. Diagnostic value of anti-RA33 antibody, antikeratin antibody, antiperinuclear factor and antinuclear antibody in early rheumatoid arthritis: comparison with rheumatoid factor. *Br J Rheumatol.* 1996 Jul;35(7):620-4.
14. Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G, Scherak O, Graninger W, Thumb N, Smolen JS. Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989 Dec;32(12):1515-20.
15. Steiner G, Skriner K, Smolen JS. Autoantibodies to the A/B proteins of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex: novel tools for the diagnosis of rheumatic diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996 Dec;111(4):314-9.
16. Garcia-de la Torre I, Miranda-Mendez L. Studies of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1982 Jul-Aug;9(4):603-6.

Manufactured By:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 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/>

Authorized Representative in the EU:

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



624320FR

Juin 2018
Révision 7