

NOVA Lite® DAPI ANCA (Formalin) Kit

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Complexité CLIA : Elevée



REF 704337

Rx Only

Utilisation prévue

La trousse de test NOVA Lite DAPI ANCA (Formalin) Kit est un test indirect par immunofluorescence pour la détection qualitative et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) des isotypes 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'ANCA, associée à d'autres résultats sérologiques, radiologiques, histologiques et cliniques, aide à diagnostiquer les vascularites associées aux ANCA. Dans le cas où les résultats sont obtenus à l'aide de l'appareil NOVA View, un utilisateur expérimenté doit les confirmer. Le test ANCA Formalin n'est pas destiné à être utilisé seul, mais en association avec le test ANCA Ethanol.

Résumé et explication du test

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) sont un groupe d'anticorps dirigés vers certains antigènes dans les granules primaires des granulocytes neutrophiles. Leur présence est fortement associée à un groupe de petites vascularites des petits vaisseaux, que l'on appelle les vascularites associées aux ANCA (AAV)¹. Le groupe de la classification AAV inclut la granulomatose avec polyangéite (GPA) (anciennement granulomatose de Wegener), la polyangéite microscopique (MPA) et la granulomatose éosinophilique avec polyangéite (EGPA) (anciennement syndrome de Churg-Strauss)¹. La présentation clinique de groupe de maladies liées varie considérablement, ce qui mène souvent à des problèmes de diagnostic. Les complications les plus graves sont une glomérulonéphrite rapidement progressive et un affaiblissement rénal. Un diagnostic précoce est important, car la thérapie immunsuppressive a un effet majeur sur la fonction rénale².

Lors d'une détection par un test d'immunofluorescence indirecte (IIF) en utilisant des granulocytes neutrophiles fixés à l'éthanol comme substrat, on observe généralement deux profils majeurs : la fluorescence cytoplasmique ou C-ANCA et la fluorescence périnucléaire ou P-ANCA. La fluorescence C-ANCA a été décrite pour la première fois en 1982 et en 1985 dans le sérum de patients atteints d'une glomérulonéphrite nécrosante segmentaire³, et de GPA⁴. La coloration C-ANCA typique produit un profil cytoplasmique granulaire avec une accentuation interlobulaire sur les neutrophiles fixés à l'éthanol⁵. On a identifié la cible antigénique principale des C-ANCA comme la protéinase 3 (PR3), une sérine-protéase située dans les granules primaires (azurophiles) des neutrophiles.

La fluorescence P-ANCA a été rapportée en 1988 chez des patients atteints de vascularite systémique⁶. Il s'agit d'une coloration périnucléaire avec ou sans extension nucléaire sur un substrat de granulocytes neutrophiles fixés à l'éthanol⁵. On détecte typiquement ce type de profil chez les patients atteints de MPA et chez environ 40 % des patients atteints d'EGPA. La cible antigénique principale de P-ANCA est la myéloperoxydase (MPO). La MPO, de manière semblable à la PR3, se situe dans les granules primaires (azurophiles) des granulocytes neutrophiles. Pendant la fixation à l'éthanol des granulocytes neutrophiles, toutefois, la MPO chargée positivement migre vers le noyau chargé négativement, ce qui provoque un profil P-ANCA, alors que la PR-3 reste dans les granules.

Si les neutrophiles sont traités à l'aide d'un agent fixatif de liaison transversale tel que le formaldéhyde, la migration de la MPO est empêchée, et toutes les protéines des granules cytoplasmiques restent dans le cytoplasme^{5,7}. Par la suite, des échantillons positifs anti-MPO produisent une coloration cytoplasmique granulaire sur les neutrophiles fixés au formaldéhyde, de manière similaire aux échantillons positifs anti-PR3.

De nombreux échantillons envoyés pour un test ANCA peuvent être positifs aux anticorps antinucléaires (ANA). Les anticorps aux antigènes nucléaires peuvent interférer avec l'interprétation des profils IIF⁸. Il est essentiel de distinguer les profils vérifiables C-ANCA et P-ANCA l'un de l'autre et des ANA. Pour ce faire, on utilise une combinaison de plaques de neutrophiles fixés à l'éthanol et au formaldéhyde. Les échantillons C-ANCA vérifiables produisent une coloration cytoplasmique sur les substrats fixés à l'éthanol et au formaldéhyde, tandis que les échantillons P-ANCA vérifiables produisent un profil périnucléaire sur les neutrophiles fixés à l'éthanol et une coloration cytoplasmique sur les substrats fixés au formaldéhyde. La fixation au formaldéhyde détruit / modifie également la plupart des antigènes nucléaires. Par conséquent, les échantillons positifs ANA deviennent souvent négatifs, ou présentent une fluorescence fortement réduite sur le substrat de neutrophiles fixés au formaldéhyde⁷. Les ANCA atypiques ont également tendance à devenir négatifs sur les substrats fixés au formaldéhyde⁷.

L'International Consensus Statement on Testing and Reporting ANCA recommande de procéder à des tests IIF sur tous les nouveaux patients, puis à un test de confirmation des échantillons positifs IIF avec un essai spécifique à un antigène (MPO et PR3) pour la vérification. Idéalement, les tests ANCA doivent inclure des tests de tous les échantillons avec un essai IIF et un essai spécifique à l'antigène^{5,7}.

Principes du test

Les échantillons du patient sont dilués à 1:20 dans un diluant pour échantillon, incubé avec le substrat de neutrophile (antigène), et les anticorps non liés sont rincés. Le substrat est ensuite incubé avec le conjugué FITC-IgG anti-humain. Le conjugué contient également le 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 interprétées par microscopie à fluorescence manuelle, ou peuvent être analysées par NOVA View avant examen des clichés numériques par un utilisateur expérimenté. Les échantillons positifs affichent une fluorescence vert pomme correspondant aux zones où l'auto-anticorps et le complexe du conjugué sont liés.

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.

Réactifs

1. ANCA (Formalin Fixed Human Neutrophil) Slide - 12 puits/plaque, avec dessiccatif.
2. FITC IgG Conjugate with DAPI : contenant de l'IgG anti-humain (Fc) et 0,09 % d'azoture de sodium ; prêt à l'emploi.
3. cANCA Positive : contenant du sérum humain contenant des anticorps dirigés contre l'antigène PR3 dans un tampon, contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % ; prédilué, prêt à l'emploi.
4. pANCA Positive : contenant du sérum humain contenant des anticorps dirigés contre l'antigène MPO dans un tampon, contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % ; prédilué, prêt à l'emploi.
5. IFA System Negative Control : sérum humain dilué négatif pour les ANCA ; contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % ; prédilué, prêt à l'emploi.
6. PBS II Concentrate (40x) : suffisant pour réaliser 2 000 mL de PBS II 1X. Sert de diluant des échantillons et de tampon de lavage.
7. Mounting Medium : contenant de l'azoture de sodium à 0,09 %
8. Lamelles

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. Par conséquent, le contrôle pANCA positif, cANCA positif et négatif du système IFA doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses¹⁰.
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. 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 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.
4. 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.
5. Il est recommandé de respecter strictement le protocole.

Conditions d'entreposage

1. Conserver tous les réactifs du kit 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. Le tampon PBS II dilué peut être conservé pendant 4 semaines entre 2 et 8 °C.
3. Le conjugué d'IgG-FITC avec DAPI, le contrôle pANCA positif, le contrôle cANCA positif et le contrôlé négatif du système IFA sont stables pendant 8 semaines après ouverture lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8 °C à condition qu'ils n'aient pas atteint la date d'expiration se trouvant sur l'étiquette.

Prélèvement des échantillons

- Cette procédure doit être réalisée 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.
- 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 entre 2 et 8 °C jusqu'à 14 jours.
 3. Si le test n'est pas effectué dans les 14 jours, ou pour expédier le sérum, congelez-le à -20 °C ou moins. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 3 fois. Agitez bien les échantillons congelés après décongélation et avant le test.

Procédure

Matériel fourni

Article fourni	Quantité
ANCA (Formalin Fixed Human Neutrophils) Slide	20 x 12 puits
FITC IgG Conjugate with DAPI	1 x 15 mL
cANCA Positive	1 x 0,5 mL
pANCA Positive	1 x 0,5 mL
IFA System Negative Control	1 x 0,5 mL
PBS II Concentrate (40x)	2 x 25 mL

Article fourni	Quantité
Mounting Medium	1 x 7 mL
Lamelles	1 x 20

Matériel supplémentaire requis mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Conteneur de 1 L (pour diluer le PBS II)
- Micropipettes et pointes jetables
- Chambre humide
- Pissettes en plastique ou pipettes de Pasteur
- Tube(s) de Coplin
- Olympus CX31 avec LED FRAEN (bleu 480 nm) ou un microscope équivalent et/ou le NOVA View® Automated Fluorescent 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 : diluer le concentré de PBS II selon un rapport 1:40 en ajoutant le contenu du flacon de concentré de PBS II 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 : dépistage initial : diluer les échantillons de patient selon un rapport de 1:20 avec le tampon PBS II 1X (par exemple, ajouter 10 µL de sérum à 190 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 (20-25 µL) 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 II 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 dilué pendant 1 à 5 minutes.
4. Ajout du conjugué fluorescent : retirer les lames (une à la fois) du tube de Coplin. Tapoter le tampon PBS II 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 plaques pendant 30 + 5 minutes supplémentaires dans l'obscurité.
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 II 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 la qualité

Un contrôle positif (cANCA positif ou pANCA positif) et le contrôle négatif du système IFA doivent être inclus dans chaque analyse afin de s'assurer que tous les réactifs et procédures produisent les résultats escomptés. D'autres sérum de contrôle adaptés peuvent être préparés en aliquotant des échantillons de sérum humain poolés et en les conservant à ≤ -20 °C. Les résultats du test sont considérés comme étant valides si les critères répertoriés ci-dessous sont respectés. 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 contrôle cANCA positif non dilué doit produire une réaction positive avec un profil cytoplasmique $\geq 3+$.
2. Le contrôle pANCA positif non dilué doit produire une réaction positive avec un profil cytoplasmique $\geq 3+$.
3. Le contrôle négatif du système IFA doit produire une réaction ANCA négative.

Interprétation des résultats

Les lames sont examinées et les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope fluorescent. 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 sont examinés et interprétés sur ordinateur. 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 le profil cytoplasmique et nucléaire sur les granulocytes fixés au formaldéhyde. Comme les profils IIF peuvent être mixtes, non caractéristiques et variables, il se peut que le logiciel signale que ces profils sont « Non reconnus ». 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.

Réaction positive : un échantillon est considéré comme positif si une coloration granulaire cytoplasmique spécifique est observée. Il est possible d'observer occasionnellement une coloration nucléaire avec les échantillons positifs aux ANA.

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 distinctive |
| 1+ | Fluorescence la moins spécifique permettant de distinguer clairement la coloration du cytoplasme de la fluorescence de fond. |

Interprétation du profil :

Coloration cytoplasmique : une fluorescence cytoplasmique mouchetée et grossière, souvent avec une coloration accentuée entre les lobes nucléaires, est caractéristique des anticorps réagissant à la PR3 et à la MPO.

Coloration nucléaire ou périnucléaire : les échantillons positifs aux ANA peuvent présenter une fluorescence nucléaire faible sur les granulocytes neutrophiles fixés au formaldéhyde. La plupart des antigènes nucléaires étant détruits pendant la formation du formaldéhyde, les échantillons positifs aux ANA seront négatifs ou présenteront une fluorescence nucléaire nettement réduite par rapport aux granulocytes neutrophiles fixés à l'éthanol.

LIMITES DU TEST

1. **Les résultats positifs de l'IIF doivent être confirmés par des essais en phase solide spécifiques aux antigènes (MPO et PR3)⁵.**
2. Un ANCA à titre élevé suggère une vascularite associée aux ANCA, mais ne doit pas être considéré comme un diagnostic en lui-même. Le résultat de test ANCA doit être envisagé conjointement à d'autres résultats sérologiques et à l'ensemble des antécédents cliniques du patient, y compris les signes et symptômes.
3. Le test ANCA Formalin n'est pas destiné à être utilisé seul, mais avec le test ANCA Ethanol.
4. Les échantillons positifs aux ANA peuvent présenter une fluorescence nucléaire faible sur les granulocytes neutrophiles fixés au formol.
5. Les échantillons peuvent comporter plus d'un anticorps, c'est-à-dire ANA et ANCA.
6. 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.
7. Il est recommandé d'utiliser un marqueur pour étiqueter les lames. L'utilisation de tout autre moyen d'inscription peut entraîner une coloration artificielle.
8. 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.
9. Les caractéristiques de performances du test n'ont pas été établies pour d'autres matrices que le sérum.
10. L'appareil NOVA View doit uniquement être utilisé avec des échantillons de patients dilués à 1:20.
11. NOVA View doit uniquement être utilisé avec des réactifs indiqués pour une utilisation avec le dispositif.
12. Tous les résultats obtenus à l'aide du logiciel doivent être confirmés par un utilisateur expérimenté.
13. NOVA View est réservé aux utilisateurs expérimentés travaillant en laboratoire clinique.
14. Tout rapport de fluorescence positive de neutrophiles émis avant que les résultats ELISA soient disponibles devrait indiquer que la fluorescence positive seule n'est pas spécifique pour le diagnostic de la granulomatose avec polyangéite (GPA) ou de la polyangéite microscopique (MPA).
15. Les décisions de traitement ne doivent pas être uniquement basées sur les résultats ANCA.

Performance de précision

Quatre échantillons négatifs et 22 échantillons positifs, y compris des échantillons P-ANCA et C-ANCA, ont été testés lors de 10 cycles avec trois répliques.

Toutes les lames ont été lues sur l'appareil NOVA View, et les clichés numériques ont ensuite été examinés par un utilisateur expérimenté. Les résultats ont été exprimés en niveaux de fluorescence (0 à 4+). De plus, les mêmes lames ont également été lues sur microscope à fluorescence manuel.

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.

Les résultats de l'étude de précision ci-dessus sont résumés dans les tableaux ci-dessous.

Échantillon	Spécificité	n	Résultat obtenu								
			Résultats sur NOVA View			Résultats manuels			Résultats numériques		
			Moyenne LIU	% Négatif	% Positif	Plage de degrés (0-4+)	% Négatif	% Positif	Plage de degrés (0-4+)	% Négatif	% Positif
1	Anti-MPO	30	788,8	0,0 %	100,0 %	4	0,0 %	100,0 %	4	0,0 %	100,0 %
2	Anti-MPO	30	218,7	0,0 %	100,0 %	2-3	0,0 %	100,0 %	2-3	0,0 %	100,0 %
3	Anti-MPO	30	127,4	0,0 %	100,0 %	2	0,0 %	100,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %
4	Anti-MPO	30	17,4	93,0 %	7,0 %	1	0,0 %	100,0 %	1	0,0 %	100,0 %
5	S/O	30	2,0	100,00 %	0,0 %	0	100,00 %	0,0 %	0	100,0 %	0,0 %
6	Anti-PR3	30	1104,9	0,0 %	100,0 %	4	0,0 %	100,0 %	4	0,0 %	100,0 %
7	Anti-PR3	30	491,2	0,0 %	100,0 %	3	0,0 %	100,0 %	3-4	0,0 %	100,0 %
8	Anti-PR3	30	131,4	0,0 %	100,0 %	2	0,0 %	100,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %
9	Anti-PR3	30	128,5	0,0 %	100,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %
10	S/O	30	2,8	100,00 %	0,0 %	0	100,00 %	0,0 %	0	100,0 %	0,0 %
11	S/O	30	2,0	100,00 %	0,0 %	0	100,00 %	0,0 %	0	100,0 %	0,0 %
12	Anti-MPO	30	406,7	0,0 %	100,0 %	3-4	0,0 %	100,0 %	3-4	0,0 %	100,0 %

Résultat obtenu											
			Résultats sur NOVA View			Résultats manuels			Résultats numériques		
Échantillon	Spécificité	n	Moyenne LIU	% Négatif	% Positif	Plage de degrés (0-4+)	% Négatif	% Positif	Plage de degrés (0-4+)	% Négatif	% Positif
13	Anti-MPO	30	263,8	0,0 %	100,0 %	2	0,0 %	100,0 %	2-3	0,0 %	100,0 %
14	Anti-MPO	30	517,7	0,0 %	100,0 %	3-4	0,0 %	100,0 %	3-4	0,0 %	100,0 %
15	Anti-PR3	30	1095,0	0,0 %	100,0 %	4	0,0 %	100,0 %	4	0,0 %	100,0 %
16	S/O	30	2,0	100,00 %	0,0 %	0	100,00 %	0,0 %	0	100,0 %	0,0 %
17	Anti-MPO	30	28,8	80,0 %	20,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %	0-1	16,7 %	83,3 %
18	Anti-MPO	30	32,5	43,3 %	56,7 %	1-2	0,0 %	100,0 %	0-1	3,3 %	96,7 %
19	Anti-PR3	30	16,8	90,0 %	10,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %	0-1	56,7 %	43,3 %
20	Anti-MPO	30	36,7	30,0 %	70,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %	1	0,0 %	100,0 %
21	Anti-MPO	30	22,9	76,7 %	23,3 %	1	0,00 %	100,0 %	0-1	13,3 %	86,7 %
22	Anti-MPO	30	24,3	86,7 %	13,3 %	1-2	0,0 %	100,0 %	0-1	3,3 %	96,7 %
23	Anti-PR3	30	26,9	70,0 %	30,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %	0-1	13,3 %	86,7 %
24	Anti-PR3	30	20,3	86,7 %	13,3 %	1	0,0 %	100,0 %	0-1	16,7 %	83,3 %
25	Anti-PR3	30	34,0	50,0 %	50,0 %	1-2	0,0 %	100,0 %	0-1	10,0 %	90,0 %
26	Anti-PR3	30	35,7	36,7 %	63,3 %	1-2	0,00 %	100,0 %	0-1	3,3 %	96,7 %

Résultat obtenu											
Échantillon	Spécificité	n	Moyenne LIU	Intra-analyse		Entre analyses		Sur plusieurs jours		Total (dans le laboratoire)	
				Écart type	CV en %	Écart type	CV en %	Écart type	CV en %	Écart type	CV en %
1	Anti-MPO	30	788,8	64,4	8,2 %	66,3	8,4 %	59,6	7,6 %	110,0	13,9 %
2	Anti-MPO	30	218,7	37,7	17,2 %	14,5	6,6 %	5,8	2,6 %	40,8	18,7 %
3	Anti-MPO	30	127,4	29,4	23,1 %	11,4	9,0 %	8,3	6,5 %	32,6	25,6 %
4	Anti-MPO	30	17,4	9,7	56,1 %	0,0	0,0 %	4,1	23,8 %	10,6	61,0 %
5	S/O	30	2,0	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %
6	Anti-PR3	30	1104,9	170,5	15,4 %	0,0	0,0 %	71,7	6,5 %	185,0	16,7 %
7	Anti-PR3	30	491,2	43,4	8,8 %	8,1	1,7 %	42,7	8,7 %	61,5	12,5 %
8	Anti-PR3	30	131,4	26,6	20,3 %	0,0	0,0 %	13,8	10,5 %	30,0	22,8 %
9	Anti-PR3	30	128,5	20,1	15,7 %	29,7	23,1 %	0,0	0,0 %	35,9	27,9 %
10	S/O	30	2,8	1,4	51,1 %	0,0	0,0 %	0,6	20,5 %	1,6	55,1 %
11	S/O	30	2,0	0,2	9,0 %	0,1	2,6 %	0,0	0,0 %	0,2	9,3 %
12	Anti-MPO	30	406,7	48,5	11,9 %	10,4	2,6 %	50,9	12,5 %	71,1	17,5 %
13	Anti-MPO	30	242,9	38,4	15,8 %	7,0	2,9 %	20,0	8,2 %	43,8	18,0 %
14	Anti-MPO	30	517,7	69,0	13,3 %	28,9	5,6 %	0,0	0,0 %	74,8	14,4 %
15	Anti-PR3	30	1095,0	187,2	17,1 %	0,0	0,0 %	44,4	4,1 %	192,4	17,6 %
16	S/O	30	2,0	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %
17	Anti-MPO	30	28,8	7,8	27,2 %	23,3	81,0 %	0,0	0,0 %	24,6	85,5 %
18	Anti-MPO	30	32,5	7,5	23,2 %	9,0	27,7 %	0,0	0,0 %	11,7	36,1 %
19	Anti-PR3	30	16,8	8,3	49,7 %	4,3	25,6 %	0,0	0,0 %	9,4	55,9 %
20	Anti-MPO	30	36,7	6,8	18,4 %	7,2	19,6 %	0,0	0,0 %	9,9	26,9 %
21	Anti-MPO	30	22,9	5,5	23,8 %	5,6	24,4 %	0,6	2,4 %	7,8	34,2 %
22	Anti-MPO	30	24,3	11,3	46,5 %	6,7	27,5 %	0,0	0,0 %	13,1	54,0 %
23	Anti-PR3	30	26,9	13,0	48,5 %	0,0	0,0 %	0,0	0,0 %	13,0	48,5 %
24	Anti-PR3	30	20,3	7,7	38,1 %	0,0	0,0 %	5,8	28,6 %	9,7	47,6 %
25	Anti-PR3	30	34,0	17,1	50,4 %	8,0	23,6 %	0,0	0,0 %	18,9	55,7 %
26	Anti-PR3	30	35,7	13,2	37,0 %	14,1	39,4 %	0,0	0,0 %	19,3	54,1 %

Reproductibilité

Une cohorte de 287 échantillons caractérisés cliniquement a été testée avec la trousse NOVA Lite DAPI ANCA (Formalin) Kit chez Inova (site 1) et sur deux sites cliniques externes. 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 entre les résultats générés par NOVA View, le résultat des examens des clichés numériques et les résultats des examens manuels pour les trois sites. Les résultats sont illustrés ci-dessous :

NOVA View, n=287	Concordance positive (%) (I.C. à 95 %)	Concordance négative (%) (I.C. à 95 %)	Concordance totale (%) (I.C. à 95 %)
Site 1 par rapport au Site 2	88,8 (81,8 - 93,3)	97,1 (93,3 - 98,7)	93,7 (90,3 - 96,0)
Site 1 par rapport au Site 3	92,2 (85,9 - 95,9)	95,3 (91,0 - 97,6)	94,1 (90,7 - 96,3)
Site 2 par rapport au Site 3	96,3 (90,9 - 98,6)	93,9 (89,3 - 96,5)	94,8 (91,6 - 96,8)

Examen manuel, n=287	Concordance positive (%) (I.C. à 95 %)	Concordance négative (%) (I.C. à 95 %)	Concordance totale (%) (I.C. à 95 %)
Site 1 par rapport au Site 2	81,9 (74,6 - 87,4)	98,0 (94,2 - 99,3)	90,2 (86,3 - 93,2)
Site 1 par rapport au Site 3	86,2 (79,5 - 91,0)	96,0 (91,5 - 98,1)	91,3 (87,5 - 94,0)
Site 2 par rapport au Site 3	92,2 (85,9 - 95,9)	89,5 (84,0 - 93,2)	90,6 (86,7 - 93,5)

Examen numérique, n=287	Concordance positive (%) (I.C. à 95 %)	Concordance négative (%) (I.C. à 95 %)	Concordance totale (%) (I.C. à 95 %)
Site 1 par rapport au Site 2	85,5 (78,5 - 90,5)	98,7 (95,4 - 99,6)	92,7 (89,1 - 95,2)
Site 1 par rapport au Site 3	90,8 (84,7 - 94,7)	98,7 (95,4 - 99,6)	95,1 (92,0 - 97,1)
Site 2 par rapport au Site 3	97,4 (92,5 - 99,1)	94,2 (89,7 - 96,8)	95,5 (92,4 - 97,3)

Performance clinique

Dans une étude de validation clinique, 653 échantillons ont été testés pour évaluer la performance clinique du dosage. La composition de la cohorte et le nombre de résultats positifs sont répertoriés dans le tableau ci-après :

Diagnostic	N	Pos NOVA View	Pos manuel	Pos numérique
Vascularite associée aux ANCA (AAV)*	185	113 (61 %)	139 (75 %)	134 (72 %)
Caractérisée positive MPO/PR3	59	56 (95 %)	59 (100 %)	58 (98 %)
Maladie infectieuse	40	4 (10 %)	6 (15 %)	5 (13 %)
Maladie thyroïdienne autoimmune	15	6 (40 %)	6 (40 %)	7 (47 %)
Néphropathie chronique (NPC)	18	0 (0 %)	1 (6 %)	1 (6 %)
Dermatite	12	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Diabète de type II	20	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)
Maladie cœliaque	61	5 (8 %)	4 (7 %)	3 (5 %)
Maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC)	20	0 (0 %)	2 (10 %)	2 (10 %)
Polyarthrite rhumatoïde	35	6 (17 %)	5 (14 %)	5 (14 %)
Maladie de Crohn	11	3 (27 %)	2 (18 %)	2 (18 %)
Rectocolite ulcéro-hémorragique	15	0 (0 %)	2 (13 %)	1 (7 %)
Allergie	7	0 (0 %)	1 (14 %)	2 (29 %)
Apparemment sains	89	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Sclérose systémique progressive	25	1 (4 %)	3 (12 %)	2 (8 %)
Sinusite	18	0 (0 %)	1 (6 %)	0 (0 %)
Lupus érythémateux disséminé	23	4 (17 %)	9 (39 %)	5 (22 %)
Total	653			

*Les échantillons de vascularites associées aux ANCA spécifiques testés sont décrits dans le tableau ci-dessous

Diagnostic	N	Pos NOVA View	Pos manuel	Pos numérique
GPA	113	67 (59 %)	83 (73 %)	80 (71 %)
MPA	21	12 (57 %)	15 (71 %)	15 (71 %)
eGPA	12	2 (17 %)	3 (25 %)	3 (25 %)
AAV non différenciés	39	32 (82 %)	38 (97 %)	36 (93 %)

Les contrôles sains et les échantillons caractérisés de manière analytique sans diagnostic clinique ont été exclus des calculs de sensibilité clinique et de spécificités réalisés avec les résultats d'interprétation numérique.

Numérique :

	Sensibilité (%) (I.C. à 95 %)	Spécificité (%) (I.C. à 95 %)
GPA	70,8 (61,8-78,4)	91,3 (87,6-93,9)
MPA	71,4 (50,0-86,2)	91,3 (87,6-93,9)
eGPA	25,0 (8,9-53,2)	91,3 (87,6-93,9)
AAV	67,1 (59,1-74,2)	91,3 (87,6-93,9)

Manuel :

	Sensibilité (%) (I.C. à 95 %)	Spécificité (%) (I.C. à 95 %)
GPA	73,5 (64,6-80,7)	89,7 (85,9-92,6)
MPA	71,4 (50,0-86,2)	89,7 (85,9-92,6)
eGPA	16,7 (4,7-44,8)	89,7 (85,9-92,6)
AAV	68,5 (60,6-75,5)	89,7 (85,9-92,6)

NOVA View :

	Sensibilité (%) (I.C. à 95 %)	Spécificité (%) (I.C. à 95 %)
GPA	38,7 (28,5-50,0)	98,7 (96,6-99,5)
MPA	47,1 (26,2-69,0)	98,7 (96,6-99,5)
eGPA	16,7 (4,7-44,8)	98,7 (96,6-99,5)
AAV	37,5 (28,8-47,1)	98,7 (96,6-99,5)

Réactivité croisée

On sait que les ANA et les autres anticorps anticellules peuvent interférer avec la détection des ANCA en provoquant une coloration nucléaire et / ou cytoplasmique. Par conséquent, la réactivité croisée a été examinée en testant 25 échantillons positifs aux ANA, et on a découvert une réactivité croisée avec 24 %, 32 % et 24 % des échantillons positifs aux ANA sur les lames fixées au formaldéhyde par l'interprétation du logiciel NOVA View, l'interprétation manuelle et l'interprétation des images numériques, respectivement.

De plus, la réactivité croisée est examinée sur n=151 échantillons inclus dans l'étude de validation clinique.

Les échantillons provenaient de patients atteints de maladie thyroïdienne autoimmune, de maladie cœliaque, de polyarthrite rhumatoïde et de maladies infectieuses. Le nombre et la répartition de la population sont détaillés dans le Tableau ci-après, avec le taux de positivité Formalin ANCA. La réactivité croisée avec l'interprétation du logiciel NOVA View, l'interprétation manuelle et l'interprétation des images numériques était de 14 %, 14 % et 13 % sur cette cohorte d'échantillons. On suppose que la cause principale de réactivité croisée montrée dans cette population est le résultat des ANA dans les échantillons.

Diagnostic	N	Pos NOVA View	Pos manuel	Pos numérique
Maladie infectieuse	40	4	6	5
Maladie thyroïdienne autoimmune	15	6	6	7
Maladie cœliaque	61	5	4	3
Polyarthrite rhumatoïde	35	6	5	5
Total	151	21	21	20

Diagnostic	N	Pos NOVA View	Pos manuel	Pos numérique
Maladie infectieuse	40	10%	15%	13%
Maladie thyroïdienne autoimmune	15	40 %	40 %	47 %
Maladie cœliaque	61	8%	7%	5%
Polyarthrite rhumatoïde	35	17%	14%	14%
Total	151	14%	14%	13%

Valeurs attendues

Pour une population normale, le résultat prévu est « négatif ».

Les valeurs attendues ont été analysées sur 89 échantillons provenant de sujets apparemment sains : 29 femmes, 54 hommes, 6 de sexe inconnu, avec un âge moyen de 45,7 ans (plage de 18 à 68).

Aucun résultat positif n'a été observé avec le test Formalin ANCA, quelle que soit la méthode d'interprétation

Comparaison des méthodes

Dans l'étude de comparaison des méthodes, on a testé 267 échantillons, y compris des échantillons de la validation clinique. Ces échantillons ont été testés avec le test NOVA Lite DAPI ANCA (Formalin) Kit et le dispositif de référence. Les résultats obtenus à l'aide de l'interprétation du logiciel NOVA View, de l'interprétation manuelle et de l'interprétation des images numériques ont été comparés à l'interprétation manuelle du dispositif de référence. Les résultats sont résumés dans le Tableau ci-dessous :

n=267	Concordance positive (%) (I.C. à 95 %)	Concordance négative (%) (I.C. à 95 %)	Concordance totale (%) (I.C. à 95 %)
manuel p/r manuel	94,4 (89,8-97,0)	90,5 (83,4-94,7)	92,9 (89,2-95,4)
manuel p/r numérique	79,0 (72,1-84,6)	99,0 (94,8-99,8)	86,9 (82,3-90,4)
manuel p/r NOVA View	72,2 (64,9-78,5)	97,1 (91,9-99,0)	82,0 (77,0-86,2)

Symboles utilisés

	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 <n> Tests
	Consulter les instructions d'utilisation.
	Ne pas réutiliser
	Risques biologiques
	Contrôle
	Carton en papier recyclable

Références

1. Jennette, J. C., et al. (2013). 2012 revised international Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis & Rheumatism*, 65(1), 1-11.
2. Goeken, J. A. (1991). Antineutrophil cytoplasmic antibody—a useful serological marker for vasculitis. *Journal of Clinical Immunology*, 11(4), 161-174.
3. Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F., & Ryan, G. B. (1982). Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology?. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 285(6342), 606.
4. Van der Woude, F. J., Lobatto, S., Permin, H., Van der Giessen, M., Rasmussen, N., Wiik, A., ... & The, T. H. (1985). Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *The Lancet*, 325(8426), 425-429.
5. Savige, J., et al. (1999). International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *American Journal of Clinical Pathology*, 111(4), 507-513.
6. Falk, R. J., & Jennette, J. C. (1988). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *New England Journal of Medicine*, 318(25), 1651-1657.
7. Savige, J., et al. (2003). Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies Quality Control Guidelines, Comments, and Recommendations for Testing in Other Autoimmune Diseases. *American journal of clinical pathology*, 120(3), 312-318.
8. Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, Davies D, Nikoloutsopoulos T, Sturgess A, Neil J, Pollock W, Dunster K, Hendale M. (1998). A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol*. 51(8), 568-75.
9. Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220-233.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition.

NOVA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2020 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

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

624337FR

Janvier 2020
Révision 3

