

NOVA Lite[®] HEp-2 ANA Kits/Substrate Slides

Uniquement pour "Diagnostics *In-Vitro*"
Complexité de CLIA: Haut



REF

708100, 708101,
508100.20, 508100.80,
508105.10, 508100, 508105

Rx Only

Application

NOVA Lite HEp-2 est un test par immunofluorescence indirecte pour la détection et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-nucléaires (ANA) dans le sérum humain. La présence d'anticorps anti-nucléaires peut être utilisée conjointement avec d'autres tests sérologiques et résultats cliniques afin d'aider au diagnostic du Lupus Érythémateux Disséminé (LED) ou d'autres maladies rhumatismales ou des tissus conjonctifs.

Informations concernant le test

Le terme « anticorps anti-nucléaires » décrit divers autoanticorps qui réagissent avec les composants de noyaux cellulaires dont l'ADN, l'ARN et plusieurs protéines et ribonucléoprotéines.¹ Ces autoanticorps sont très souvent présents chez des patients atteints de maladies rhumatismales ou des tissus conjonctifs, en particulier le lupus érythémateux disséminé. Pratiquement tous les patients atteints de LED ont une réaction positive aux ANA. Cette sensibilité du diagnostic a donné suite à l'incorporation des tests de détection des ANA dans les Critères pour la Classification du lupus érythémateux disséminé lors de la modification de ceux-ci en 1982 par un sous-comité du Collège américain de rhumatologie (American College of Rheumatology).² Bien que le test de détection des ANA soit un excellent test de dépistage du LED (un résultat négatif exclut pratiquement le LED³ en évolution), il est loin d'être un test spécifique. Les patients atteints d'autres maladies des tissus conjonctifs telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérodermie et la dermatomyosite ont souvent une réaction positive et des titres ANA faibles peuvent être observés dans d'autres états des maladies et chez la population normale. Des résultats ANA positifs peuvent avoir lieu suite à des brûlures graves ou une infection virale et ont été notés chez des personnes normales et en bonne santé, surtout au sein des populations âgées. Du fait de ce manque de spécificité, il est recommandé que tous les échantillons ayant une réaction positive aux ANA soient titrés jusqu'à la dernière dilution et que des tests plus spécifiques soient effectués pour la détection des autoanticorps anti-ADN double brin (dsDNA) et des autoanticorps aux antigènes nucléaires solubles (ENA).

L'immunofluorescence indirecte est la méthode de référence pour les tests de détection d'ANA. Les substrats communément utilisés sont de fines coupes d'organes de rongeurs ou divers types de lignées cellulaires. En général, il est reconnu que les substrats de lignée cellulaire sont préférables aux coupes d'organe car ces cellules qui se divisent rapidement ont des niveaux plus élevés de certains antigènes cliniquement significatifs, y compris les centromères, SSA(Ro), Scl-70 et PCNA/Cycline.

En plus du type de substrat, trois autres facteurs sont essentiels à la performance d'un test de détection d'ANA : 1) le fixateur utilisé dans la préparation de la lame, 2) le rapport entre la fluorescéine et la protéine (F/P) et 3) la spécificité de la sous-classe d'immunoglobulines du conjugué. Il a été établi que certains fixateurs ou combinaisons de fixateurs peuvent détruire les antigènes nucléaires. Il est donc recommandé de ne pas les utiliser. La sensibilité et la coloration non-spécifique du fond d'un conjugué sont définies par le rapport F/P alors que la spécificité d'un conjugué pour une pathologie est définie par la réactivité de la sous-classe d'immunoglobuline. Quasiment tous les anticorps cliniquement importants affichent une spécificité de sous-classe IgG même en présence d'ANA IgM et IgA spécifique.⁴ Par contre, en général, les ANA détectés chez les donneurs de sang en bonne santé sont exclusivement des sous-classes IgM et IgA.⁵ De ce fait, un conjugué de type IgG est plus spécifique à la maladie. Le substrat sélectionné pour NOVA Lite HEp-2 ANA est de préférence une lignée cellulaire épithéliale humaine fixe (HEp-2) et le conjugué anti-IgG humain purifié par affinité possédant un rapport F/P choisi avec soin.

Ces paramètres de réactifs permettent au test NOVA Lite HEp-2 ANA de détecter les autoanticorps cliniquement significatifs (y compris SSA et Scl-70) qui ne sont pas détectés par d'autres tests de détection d'ANA disponibles sur le marché. Par ailleurs, la spécificité du conjugué IgG élimine les résultats physiologiques faussement positifs causés par des autoanticorps anti-IgM de faible titre que l'on détecte souvent chez les personnes plus âgées mais en bonne santé.

Principe du test

Dans la technique par immunofluorescence indirecte, les échantillons sont incubés avec l'antigène fixé sur la lame et les anticorps non liés sont éliminés au lavage. Le substrat est incubé avec un conjugué fluorescéine spécifique et le réactif non lié est ensuite éliminé au lavage. Lorsqu'ils sont vus à l'aide d'un microscope fluorescent, les échantillons ayant une réaction positive aux autoanticorps afficheront une fluorescence vert pomme qui correspond aux zones de la cellule ou des noyaux où l'autoanticorps s'est lié.

Contenu du coffret

1. HEp-2 substrate slides, 12 puits/lame ou 6 puits/lame

Les coffrets contiennent:

1. Lames HEp-2 (cellule épithéliale humaine) ; 12 puits/lame ou 6 puits/lame, avec dessiccateur
2. Anti-Human IgG Conjugate (chèvre), fluorescéine marquée dans du tampon contenant du bleu Evans et 0,09 % d'azide de sodium, 15 ml
3. ANA Titratable Endpoint Pattern Control, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué contenant des auto-anticorps anti-HEp-2, 0,5 ml
4. IFA System Negative Control, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué ne contenant aucun auto-anticorps anti-HEp-2, 0,5 ml
5. PBS II Concentrate (40x), suffisant pour 2 000 ml
6. Mounting Medium, 0,09 % d'azide de sodium, 7 ml
7. Coverslips

Avertissements

1. Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des coffrets contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.⁶
2. L'azide de sodium (NaN_3) est utilisé comme conservateur dans quelques composants de. NaN_3 est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Eviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.
3. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.
4. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce test (coffret) est destiné à un usage diagnostic in vitro.
2. Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.
3. Un lavage incomplet ou insuffisant du liquide dans les puits des lames entraînent des imprécisions et un bruit de fond élevé.
4. L'adaptation totale ou partielle de ce test aux automates de traitement d'échantillons ou de distribution de réactifs pourrait fournir des résultats différents de ceux obtenus par une méthode manuelle. Chaque laboratoire a la responsabilité de valider les limites raisonnables dans lesquels les résultats seront acceptés.
5. La variation des facteurs suivants influence la performance du test : la température des réactifs au démarrage du test, la puissance de la lampe du microscope, la précision et la reproductibilité du pipetage, le degré du lavage et la durée de l'incubation. Une grande attention est requise pour obtenir des résultats précis et reproductibles.
6. Au cours du temps, le conjugué anti-IgG humain pourrait changer de couleur à cause de son exposition à la lumière. Toutefois, ce changement de couleur n'affecte pas la performance du test.
7. Il est recommandé de suivre strictement le protocole. Chaque modification est au risque de l'utilisateur.

Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du lames et coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. La solution de tampon diluée reste stable quatre semaine à 2-8°C.

Echantillons

Ce test doit être réalisé avec du sérum comme échantillon. L'addition d'azide ou d'autres conservateurs aux échantillons peut affecter le bon déroulement de la procédure. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter.

Après prélèvement, le sérum doit être séparé du culot. Le document H18-A3 du CLSI (NCCLS) recommande les conditions suivantes de conservation: 1) Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. 2) Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. 3) Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Bien agiter les échantillons décongelés.

Procédure

Matériel fourni (coffret)

708100

- | | |
|----|-----------------------------------|
| 20 | 12-puit HEp-2 ANA Slide |
| 1 | 15mL FITC IgG Conjugate |
| 1 | 0,5 mL ANA Titratable Pattern |
| 1 | 0,5mL IFA System Negative Control |

- 2 25mL PBS II Concentrate (40x)
- 1 7mL Mounting Medium
- 1 20 Coverslips

708101

- 5 12-puit HEp-2 ANA Slide
- 1 4mL FITC IgG Conjugate
- 1 0,5 mL ANA Titratable Pattern
- 1 0,5mL IFA System Negative Control
- 1 25mL PBS II Concentrate (40x)
- 1 7mL Mounting Medium
- 1 10 Coverslips

Matériel fourni (Lames seules)

- 508100.20 20 x HEp-2 ANA Slide (12 puits)
- 508100.80 80 x HEp-2 ANA Slide (12 puits)
- 508105.10 10 x HEp-2 ANA Slide (6 puits)
- 508100 1 x HEp-2 ANA Slide (12 puits)
- 508105 1 x HEp-2 ANA Slide (6 puits)

Autre matériel nécessaire non fourni

- Micropipettes pouvant distribuer un volume de 15 à 1000 µl
- Eau distillée ou déionisée
- Pisettes ou pipettes Pasteur
- Chambre humide
- Récipient de 1 l (pour diluer le PBS II)
- Bocal Coplin
- Microscope à fluorescence avec excitatrice de 495 nm et filtre interférentiel de 515 nm

Méthode

Préparation du test

1. Amener tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
2. **Diluer le concentré PBS II** : IMPORTANT : diluer le concentré PBS II 1:40 en ajoutant le contenu de la bouteille de concentré PBS II à 975 ml d’eau distillée ou déionisée et bien mélanger. Le tampon PBS II est utilisé pour diluer les échantillons des patients et comme tampon de lavage. Le tampon dilué peut être conservé jusqu’à 4 semaines à une température comprise entre 2 et 8° C.
3. **Diluer les échantillons des patients** :
 - a. Dépistage initial : diluer les échantillons des patients 1:40 avec la solution tampon PBS II diluée (c’est-à-dire, ajouter 50 µl de sérum à 1,95 ml de solution tampon PBS II).
 - b. Titrage : diluer en série en double à partir de la dilution de dépistage initiale pour tous les échantillons positifs en utilisant la solution tampon PBS II (c’est-à-dire 1:80, 1:160,... 1:2560).

Exécution du test

1. **Préparation de la lame substrat** : laisser la lame atteindre la température ambiante avant de la retirer de sa pochette. Étiqueter la lame à l’aide d’un crayon et la placer dans une chambre humide adéquate. Ajouter une goutte (20 à 25 µl) du contrôle positif non dilué et du Contrôle négatif respectivement sur les puits 1 et 2. Ajouter une goutte (20 à 25 µl) de l’échantillon du patient sur les puits restants.
2. **Incubation de la lame substrat** : incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes dans une chambre humide (un essuie-tout humide placé à plat au fond d’un récipient de plastique ou de verre fermé permet de maintenir les conditions d’humidité appropriées). **Ne pas laisser le substrat se dessécher pendant la procédure d’analyse.**
3. **Lavage de la lame substrat** : après l’incubation, utiliser une pissette de plastique ou une pipette pour éliminer le sérum en rinçant délicatement avec la solution tampon PBS II diluée. Orienter la lame et le flot de solution tampon PBS II de façon à minimiser le débordement des échantillons entre les puits. **Ne pas diriger le flot directement dans les puits sous peine d’abîmer le substrat.** Si désiré, placez les lame dans une fiole de Coplin d’amortisseur dilué de PBS II pendant jusqu’à 5 minutes.
4. **Addition du conjugué fluorescent** : éliminer l’excès de la solution tampon PBS II en secouant la lame. Replacer la lame dans la chambre humide et recouvrir **immédiatement** chaque puits d’une goutte de conjugué fluorescent. Incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes.
5. **Lavage de la lame substrat** : répéter l’étape 3.
6. **Montage de la lame substrat** : les procédures pour le montage d’une lame à l’aide de lamelles couvre-objet varient d’un laboratoire à un autre ; toutefois, la procédure suivante est recommandée :
 - a. Placer une lamelle couvre-objet sur un essuie-tout.
 - b. Appliquer le milieu de montage en une ligne continue sur le bord inférieur de la lamelle couvre-objet.

- c. Éliminer l'excès de la solution tampon PBS II et placer le bord inférieur de la lame contre le bord de la lamelle couvre-objet. Abaisser avec précaution la lame sur la lamelle couvre-objet de façon à ce que le milieu de montage coule vers le bord supérieur de la lame sans former de bulles d'air.

Contrôle de qualité

Le contrôle positif ANA titrable et le contrôle négatif du système IFA devraient être testés sur chaque lame afin d'être certain que tous les réactifs et toutes les procédures ont été exécutées de façon appropriée. Un contrôle supplémentaire adéquat peut être préparé en utilisant des portions aliquotées d'échantillon de sérum humain provenant d'un groupe de personnes et en les conservant à $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Pour que les résultats des tests soient valides, tous les critères cités ci-dessous doivent être remplis. Si certains critères ne sont pas remplis, les résultats du test devraient être considérés comme invalides et l'analyse doit être répétée.

1. Le contrôle positif ANA titrable doit être $\geq 3+$.
2. Le contrôle négatif doit être négatif.

Interprétation des résultats

Réaction négative. Un échantillon est considéré négatif si une coloration spécifique est égale ou inférieure au témoin négatif du système IFA. Les échantillons peuvent afficher différents degrés de coloration de fond en raison des anticorps hétérophiles ou du faible niveau d'autoanticorps aux composants cytoplasmiques tels que les protéines contractiles.

Réaction positive. Un échantillon est considéré comme étant positif si une coloration nucléaire spécifique est notée et est supérieure au contrôle négatif du système IFA.

Déterminer le grade ou l'intensité de la fluorescence à l'aide des critères suivants :

- 4+ Fluorescence éclatante vert pomme
- 3+ Fluorescence vive vert pomme
- 2+ Fluorescence positive bien visible
- 1+ Fluorescence spécifique la plus basse possible qui permettra à la coloration nucléaire et/ou cytoplasmique d'être bien différenciée de la fluorescence de fond.

Interprétation de l'aspect. Différents marquages nucléaire ou cytoplasmique peuvent apparaître en fonction des types et quantités relatives d'autoanticorps présents dans l'échantillon. On peut voir les types d'image suivants :

Homogène : un marquage uni du noyau avec ou sans masquage apparent des nucléoles.

Antigènes nucléaires présents : ADN double brin, ADN simple-brin, histones

Association à des maladies : des titres élevés sont indicatifs du LED ; des titres bas sont indicatifs du LED ou d'autres maladies des tissus conjonctifs.

Périphérique : un marquage uni du noyau plus marqué autour de la partie extérieure de celui-ci, et donc un marquage moins intense vers le centre du noyau.

Antigènes nucléaires présents : ADN double brin, ADN simple-brin, DNP, histone

Association à des maladies : des titres élevés sont indicatifs du LED ; des titres bas sont indicatifs du LED ou d'autres maladies des tissus conjonctifs.

Moucheté : un marquage fin ou granuleux du noyau, le plus souvent sans marquage des nucléoles.

Antigènes nucléaires présents : Sm, RNP, Scl-70, SSA, SSB, et d'autres systèmes d'antigènes/anticorps qui ne sont pas encore caractérisés.

Association à des maladies : des titres élevés sont indicatifs du LED (anticorps anti-Sm), d'une maladie mixte des tissus conjonctifs (anticorps anti-RNP), de sclérodémie (anticorps anti-Scl-70), ou du syndrome de Sjögren – complexe siccatif (anticorps anti-SSB) ; des titres moins élevés peuvent être indicatifs d'autres maladies des tissus conjonctifs.

Nucléolaire : marquage de « tâches » au sein du noyau, souvent moins de 6 par cellule, avec ou sans fines granulation.

Antigènes nucléaires présents : 4-6S RNA et d'autres antigènes antinucléaires inconnus.

Association à des maladies : les titres élevés sont fréquents dans les cas de sclérodémie et du syndrome de Sjögren.

Centromère : un marquage discret et finement granulaire dans le noyau. Les fines granulations sont très discrètes et en général en un multiple de 46.

Antigènes nucléaires présents : centromère (kinétochore des chromosomes).

Association à des maladies : très indicatif du syndrome de CREST, une variante de la sclérodémie systémique progressive (SSP). CREST est une forme de SSP accompagnée d'une calcinose bien visible, du phénomène de Raynaud, de troubles de motilité de l'oesophage et d'une atteinte limitée de la peau (souvent limité aux doigts ou au visage), de tégumentocystose.

Mitochondrie : marquage de granulations discrètes dans le cytoplasme.

Antigènes présents : divers types d'antigènes mitochondriaux.

Association à des maladies : des titres élevés indiquent une cirrhose biliaire primitive.

Il est important de mettre l'utilisateur en garde contre le risque de ne pas se fier aux images observées pour déterminer la spécificité des autoanticorps, sauf pour les images très caractéristiques comme dans le cas de positivité des nucléoles ou des centromères. Étant donné que de nombreux autoanticorps ou des combinaisons de ces derniers peuvent donner lieu à des images homogènes ou mouchetées, il est recommandé d'effectuer des tests spécifiques de suivi des autoanticorps (tels que dans les cas des ADN double brin et ENA) sur ces échantillons.

Limites du test

1. Des ANA aux titres élevés sont indicatifs d'une maladie des tissus conjonctifs mais ne devraient pas tenir lieu de diagnostic. Le résultat des ANA devrait être considéré en combinaison avec d'autres résultats sérologiques ainsi qu'avec l'ensemble des antécédents cliniques du patient.
2. Les images positives des ANA changent souvent au fur et à mesure que l'échantillon est titré vers le point correspondant à la dernière dilution positive. Ce phénomène résulte du fait que les anticorps à titre peu élevé peuvent être masqués par les autoanticorps d'un titre plus élevé.
3. Une gamme de facteurs externes influencent la sensibilité du test y compris le type de microscope à fluorescence utilisé, la puissance et le nombre d'heures d'utilisation de l'ampoule, le grossissement utilisé, le système de filtration et l'observateur.
4. Si un filtre passe bande est utilisé au lieu d'un filtre interférentiel 515, on observera une coloration artéfactuelle accrue.
5. Utiliser uniquement un crayon pour étiqueter les lames. L'utilisation d'un instrument autre qu'un crayon risque de causer une coloration artéfactuelle.
6. Tous les bords Coplin utilisés pour laver les lames doivent être exempts de résidus de colorants. L'utilisation de bords de Coplin contenant des résidus de colorants risque de causer une coloration artéfactuelle.
7. Les résultats obtenus à l'aide de ce test devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autres tests sérologiques.
8. Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérums n'ont pas été établies.

Les lames vendues séparément sont classées comme « réactifs spécifiques d'analyte ». Les caractéristiques analytiques et de performances ne sont pas établies, sauf comme élément de la trousse NOVA Lite® HEp-2 ANA.












Performances

En utilisant le test kit NOVA Lite HEp-2 ANA, divers patients atteints d'une maladie des tissus conjonctifs ainsi que 200 donneurs de sang choisis au hasard ont été testés. Les résultats sont fournis ci-dessous :

Groupe de patients	Nombre	NOVA Lite HEp-2 ANA	Nombre de positif
LED	105		101
Lupus induit par les médicaments	24		24
Arthrite rhumatoïde	40		28
Sclérodermie	24		18
Dermatomyosite	14		10
Syndrome de Sjögren	14		12
Normaux	200		5

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

Références

1. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology* **33**: 167-239, 1982.
2. Tan EM, et al.: The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **25**: 1271-1277, 1982.
3. Casalo SP, Friou GJ and Myers LL: Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **7**: 379-390, 1964.
4. Gonzalez E and Rothfield N: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* **274**: 1333-1338, 1966.
5. Wiik A: Antinuclear factors in sera from healthy blood donors. *Acta Path Microbiology Scand.* **84**: 215-220, 1976.
6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2009

Fabricant:

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.) : 00+ 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

628100FR

Août 2019
Révision 25

