



FR

ANA HEP-2

REF FA2500A

IVD

Rx Only



UTILISATION PRÉVUE

ANA HEP-2 est un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection qualitative et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-nucléaires IgG dans le sérum humain par microscopie à fluorescence manuelle ou avec le microscope automatisé dIFine®. La présence d'anticorps antinucléaires peut être utilisée en conjonction avec d'autres tests sérologiques et résultats cliniques pour faciliter le diagnostic du lupus érythémateux disséminé et d'autres maladies rhumatismales systémiques.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFA) a été largement utilisé pour détecter la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) dans le sérum de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) et d'autres troubles du tissu conjonctif cliniquement similaires (1 - 5). En outre, les ANA peuvent être associés à de nombreux syndromes lupiques induits par des médicaments (6 - 7) qui imitent cliniquement la forme spontanée du LED. La technique IFA a été adaptée au test des ANA par plusieurs chercheurs (8 - 9) en suivant les méthodes de base décrites à l'origine par Coons (10). Les ANA sont principalement composés d'anticorps IgG, mais des ANA IgA et IgM peuvent également être détectés (11). Il est désormais reconnu que de nombreuses sources de matériel nucléaire peuvent être utilisées comme substrat pour les tests ANA. Bien que la plupart des recherches initiales sur les ANA aient été effectuées à l'aide de coupes de tissus de foie ou de rein de rat ou de souris, l'utilisation de substrats de culture de cellules de tissus embryonnaires humains ou animaux a fourni un substrat alternatif fiable et facile à interpréter pour les tests ANA. La lignée cellulaire HEP-2 est dérivée d'un carcinome épidermique du larynx humain. L'utilisation du substrat des cellules HEP-2 dans l'IFA a augmenté la sensibilité de la détection des auto-anticorps et a contribué au diagnostic des maladies auto-immunes systémiques et à la description de nouvelles maladies, grâce à la possibilité de détecter plus de 100 antigènes dans leur noyau et leur cytoplasme. Il existe plusieurs schémas différents d'immunofluorescence nucléaire et cytoplasmique. **dIFine® a été programmé pour suggérer huit schémas ANA courants. Ces huit schémas et leur base peuvent être évalués par dIFine® et le lecteur manuel est le suivant :**

- Homogène (AC-1)** - La coloration homogène ou diffuse du noyau correspond à des auto-anticorps dirigés contre l'ADN natif (ADNn), les histones et/ou la désoxyribonucléoprotéine (DNP) (12, 13). Les chromosomes des cellules mitotiques (cellules en division) sont des indicateurs importants d'un schéma homogène car ils se colorent comme des masses de forme irrégulière avec une périphérie plus intensément colorée.
- tacheté (AC-2, AC-4 et AC-5)** - Le motif tacheté est le motif ANA le plus fréquemment observé. Les anticorps anti-centromère peuvent donner un motif uniforme « véritablement tacheté » dans les cellules qui ne sont pas en cours de division. Un motif tacheté dense peut être observé avec des anticorps anti-n-RNP, Sm et SSB/La.

schéma finement tacheté, chromosome négatif (AC-4) : De nombreux petits points de fluorescence uniformément dispersés dans le noyau. Le nucléole n'est généralement pas coloré. Les cellules mitotiques peuvent présenter quelques mouchetures dans leur cytoplasme, mais les chromosomes sont négatifs.

schéma tacheté grossier, chromosome négatif (AC-5) : Des points de fluorescence de taille moyenne sont dispersés dans les noyaux avec des marges nucléaires distinctes. Des points de fluorescence de taille plus importante peuvent également être observés, mais ils sont trop nombreux et de taille trop variable pour être identifiés comme un motif nucléolaire. Les chromosomes des cellules mitotiques sont négatifs.

Nucléaire dense finement tacheté (AC-2) : Nombreuses taches fines avec une distribution dense dans le noyau, à l'exclusion des nucléoles. Associé aux anticorps anti-DFS70, qui peuvent apparaître chez des individus sains et ont des implications limitées en termes de maladies auto-immunes.

Harmon et al (17) ont démontré que des échantillons de sérum contenant des anticorps anti-SSA/Ro hautement monospécifiques donnaient un motif de test IF-ANA de mouchetures nucléaires discrètes sur une grande variété de cellules humaines et de noyaux de tumeurs. Ces échantillons de sérum contenant des anti-SSA/Ro monospécifiques n'ont produit qu'une très faible coloration cytoplasmique des cellules du substrat. Un schéma distinct, large et variable de 3 à 10 grandes taches dans le noyau a été décrit. Ces patients présentant de grandes taches variables ont des syndromes rhumatismaux indifférenciés avec des anticorps IgM anti-histone FH-3 (18).
- Centromère (AC-3)** - *Tâche discrète, chromosome positif (spécificité du centromère)* : Les chromosomes seront positifs dans les cellules mitotiques ; en fait, les mouchetures discrètes seront uniquement regroupées dans la masse chromosomique, démontrant clairement les différentes étapes de la mitose. Le schéma du centromère a été reconnu comme étant associé au syndrome de CREST, qui est une variante plus légère de la sclérose systémique progressive (SSP). Le schéma du centromère présente des points

discrets et uniformes de mouchetures fluorescentes disséminées dans le noyau. Les cellules mitotiques seront positives, démontrant un regroupement des centromères dans les chromosomes selon des dispositions différentes en fonction du stade mitotique.

4. **Nucléolaire homogène (AC-8)** - Le schéma nucléolaire montre une coloration homogène ou tachetée du nucléole. Ce schéma est souvent associé à une fluorescence terne et homogène dans le reste du noyau. Les chromosomes des cellules mitotiques sont négatifs. Le schéma nucléolaire suggère la présence d'auto-anticorps dirigés contre PM/Sci-75, PM/Sci-100, Th/To, B23/nucléophosmine, nucléoline, No55/SC65. La fluorescence nucléolaire apparaît comme homogène, groupée ou tachetée, en fonction de l'antigène auquel l'auto-anticorps réagit. Les anticorps anti-nucléolaires sont principalement présents dans le sérum des patients atteints de sclérodémie, de lupus érythémateux disséminé, du syndrome de Sjögren ou du phénomène de Raynaud (19).
5. **Points nucléaires multiples (AC-6)** - Un petit nombre de points nucléaires allant de 6 à 20 est le plus souvent associé à la cholangite biliaire primitive.
6. **Membrane nucléaire (AC-11)** - *Membrane antinucléaire (lamines nucléaires)* : Le schéma de la membrane antinucléaire apparaît comme une bordure autour du noyau et ressemble à un schéma en bordure ; cependant, il se distingue du schéma en bordure par le fait que le stade chromosomique en métaphase est négatif. Il est important de signaler cet auto-anticorps car il est reconnu comme étant associé à une maladie hépatique auto-immune.
7. **Cytoplasmique (ribosomique) (AC-19)** - Le schéma ribosomique se caractérise par de nombreuses taches cytoplasmiques dont la concentration est la plus élevée autour du noyau. Il se distingue du schéma mitochondrial par des taches plus petites et une densité plus élevée. La signification de ce schéma est inconnue.
8. **Cytoplasmique (mitochondrial) (AC-21)** - Le schéma présente de façon caractéristique de nombreuses taches cytoplasmiques avec une concentration maximale dans la zone péri-nucléaire. Ce schéma peut être observé dans les cellules en interphase et en mitose. La signification clinique de l'AMA est le plus souvent une association avec la cholangite biliaire primitive, en particulier lorsque le titre de l'AMA est élevé.

Les schémas supplémentaires énumérés ci-dessous ne peuvent pas être identifiés à l'aide de dIFine® et doivent être interprétés par un opérateur qualifié, conformément aux normes de nomenclature de l'ICAP.

schémas nucléaires supplémentaires

1. **Schéma de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA) (AC-13)** : Le schéma de l'antigène nucléaire de la cellule proliférante est observé sous la forme d'une moucheture nucléaire fine à régulière dans 30 à 60 % des cellules en interphase, et d'une coloration négative de la région chromosomique des cellules mitotiques. Le PCNA est spécifique des patients atteints de LED mais n'est pas détecté dans d'autres maladies du tissu conjonctif.
2. **Schéma du centriole (AC-24)** : Le schéma du centriole se caractérise par deux points distincts de fluorescence dans le noyau des cellules mitotiques ou un point distinct de fluorescence dans la cellule au repos. La signification de ce schéma n'est pas connue, mais il a été observé dans le PSS.
3. **Schéma des fibres fusiformes (AC-25)** : *Chromosome positif* : Le schéma des fibres du fuseau est propre aux cellules en cours de mitose où seul l'appareil du fuseau est fluorescent. Ce schéma a l'aspect d'une « toile d'araignée » s'étendant du centriole aux centromères. Ce schéma évoque des auto-anticorps dirigés contre les microtubules et sa signification n'est pas claire.
4. **Schéma du corps intermédiaire (AC-27)** : Le schéma du corps intermédiaire est une région densément colorée près du sillon de clivage des cellules en télophase, c'est-à-dire dans la zone où les deux cellules filles se séparent. La signification clinique de ce schéma est inconnue ; cependant, ce schéma a été reconnu chez certains patients atteints de sclérose systémique.

Autres schémas cytoplasmiques

1. *Cytoplasme fibrillaire linéaire semblable à l'actine (AC-15)* : Ce schéma cytosquelettique se caractérise par un aspect fibreux ou en « toile d'araignée » dans toute la cellule. Il a été associé à une maladie auto-immune du foie (anti-muscle lisse).
2. *Schéma lysosomal (AC-18)* : Le schéma lysosomal est observé sous la forme de quelques taches discrètes peu espacées dans le cytoplasme. Ce schéma est observé dans le cytoplasme des cellules en interphase et en mitose. La signification clinique est inconnue.
3. *Polar/Golgi-like (AC-22)* : Le schéma de l'appareil de golgi est caractérisé par une coloration cytoplasmique positive concentrée sur un seul côté de la région périnucléaire. La signification clinique est incertaine, mais des rapports dans la littérature ont suggéré une association avec le LED et le syndrome de Sjögren.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Le test ANA HEP-2 est conçu pour détecter la présence d'ANA circulant dans les sérums humains. Le test utilise un substrat de culture de cellules tissulaires et de l'immunoglobuline de chèvre anti-humaine ajustée pour une utilisation optimale et exempte de toute coloration de fond non spécifique. La réaction se déroule en deux étapes :

1. La première étape est l'incubation de l'échantillon où tout ANA présent dans l'échantillon du patient peut se lier au substrat cellulaire, formant un complexe antigène-anticorps. Les autres composants sériques sont ensuite éliminés par lavage.
2. La deuxième étape est l'incubation du conjugué, au cours de laquelle l'immunoglobuline anti-humaine marquée au FITC peut réagir avec toute immunoglobuline humaine qui s'est liée au substrat pendant l'incubation de l'échantillon. Il se forme ainsi un complexe antigène-anticorps-conjugué stable à l'endroit où l'anticorps initial du patient s'est fixé sur le substrat cellulaire. L'excès de conjugué est ensuite éliminé par lavage. Les résultats du test peuvent être visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence correctement

équipé ou de dIFine®. Toute réaction positive apparaît sous la forme d'une coloration fluorescente vert pomme à l'intérieur de la cellule. Si l'échantillon ne contient pas d'ANA spécifique, il n'y aura pas de coloration nucléaire distincte de la cellule.

RÉACTIFS

Matériaux fournis :

Chaque kit contient les composants suivants en quantités suffisantes pour effectuer le nombre de tests indiqué sur l'étiquette de l'emballage. **REMARQUE : Le conjugué et les contrôles contiennent une combinaison de procline (0,05 % v/v) et d'azoture de sodium (<0,1 % w/v) comme conservateurs. Zorba-NS® contient de l'azoture de sodium (<0,1% p/v) comme conservateur.**

SLD	1	Lames de substrat ANA HEp-2 : Vingt lames de 12 puits avec buvard absorbant et sachet déshydratant.
CONJ	2	Conjugué : Anticorps chèvre anti-IgG humaine marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Contient du tampon phosphate avec de la BSA et du contre-colorant. Trois flacons ambrés, contenant 3,5 ml. Prêt à l'emploi.
CTRL +	3	ANA (homogène) Contrôle positif (sérum humain) : Produit une coloration positive vert pomme, homogène, du noyau cellulaire. Un flacon de 0,5 ml à bouchon rouge. Prêt à l'emploi.
CTRL -	4	Contrôle négatif (sérum humain) : Ne produit pas de coloration nucléaire détectable. Un flacon de 0,5 ml à bouchon vert. Prêt à l'emploi.
DIL SPE	5	Diluant pour échantillons Zorba-NS® : Quatre flacons de 25 ml à bouchon vert. Prêt à l'emploi.
BUF PBS	6	Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) : pH 7,2 ± 0,2. Vider le contenu de chaque sachet de tampon dans un litre d'eau distillée ou désionisée. Mélanger jusqu'à ce que tous les sels soient bien dissous. Quatre sachets suffisent pour préparer 4 litres.
MNTMED	7	Milieu de montage (glycérol tamponné) : Deux flacons de 3,0 ml à bouchon blanc.
COVGLS	8	Verre de protection. Paquet de vingt-quatre, 24 x 60 mm, épaisseur 1.

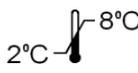
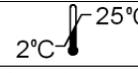
REMARQUES :

1. Les composants suivants ne dépendent pas du numéro de lot du kit et peuvent être utilisés de manière interchangeable avec les kits Sebia IFA, à condition que les numéros de produits soient identiques : Zorba-NS® (N° de produit : FA025S), milieu de montage (N° de produit : FA0009S), PBS (N° de produit : 0008S), et verre de protection (N° de produit : S8008)

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

1. Microscope automatisé diFine® ou microscope à fluorescence correctement équipé.
2. Pipette(s) capable(s) de pipeter des volumes compris entre 10 et 200 µL.
3. Embouts de pipette à usage unique.
4. Petits tubes à essai, plaques de dilution ou similaires pour la préparation des dilutions d'échantillons.
5. Lave-lames ou grand plat de coloration avec plaque magnétique pour le lavage des lames entre les étapes d'incubation.
6. Eau distillée ou désionisée.
7. Cylindre gradué de 1 litre.
8. Minuterie de laboratoire pour contrôler les étapes de l'incubation.
9. Bassin d'élimination, gants jetables et désinfectant (par exemple : 10 % d'eau de Javel - 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Kit non ouvert.
	Milieu de montage, conjugué, lames, Zorba-NS®, lames*, contrôles positifs et négatifs.
	PBS réhydraté (stable pendant 30 jours).
	Sachets de phosphate salé tamponné (PBS).
*Une fois ouvertes, les lames doivent être utilisées le jour même. Les autres réactifs prêts à l'emploi, à l'exception du PBS, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée.	

PRÉCAUTIONS

1. Pour le diagnostic *In Vitro*.
2. Respecter les précautions habituelles lors de la manipulation des réactifs de laboratoire. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un médecin. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs. Éliminer les déchets en respectant les lois locales, régionales et fédérales.
3. Les puits de la lame ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, considérez la lame comme du **matériel potentiellement bio-dangereux** et manipulez-la en conséquence.
4. Les contrôles sont des **matières potentiellement bio-dangereuses**. Les matières premières à partir desquelles ces produits ont été dérivés se sont révélées négatives pour l'antigène VIH-1, l'HBsAg et pour les anticorps contre le VHC et le VIH par des méthodes d'essai approuvées. Toutefois, étant donné qu'aucune méthode de test ne peut garantir l'absence totale d'agents infectieux, ces produits doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2 recommandé pour tout sérum humain ou échantillon de sang potentiellement infectieux dans le manuel des Centres de contrôle des maladies/Instituts nationaux de la santé intitulé « Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux » : édition actuelle ; et dans la norme de l'OSHA relative aux agents pathogènes transmissibles par le sang (20).
5. Le respect de la durée et de la température d'incubation spécifiées est essentiel pour obtenir des résultats précis. **Tous les réactifs doivent atteindre la température ambiante (20 - 25°C) avant de commencer l'essai**. Remettre immédiatement les réactifs non utilisés dans leur emballage d'origine et respecter les conditions de stockage.
6. Un lavage incorrect peut entraîner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Veiller à réduire au minimum la quantité de PBS résiduel, en utilisant un buvard, avant d'ajouter le conjugué. Ne pas laisser les puits se dessécher entre les incubations.
7. Le conjugué, le Zorba NS® et les contrôles contiennent de l'azoture de sodium à une concentration <0,1 % (w/v). On a signalé que l'azoture de sodium forme des azides de plomb ou de cuivre dans la plomberie des laboratoires, ce qui peut provoquer des explosions lors du martelage. Pour éviter cela, rincer abondamment l'évier à l'eau après avoir éliminé la solution contenant de l'azoture de sodium. Ce conservateur peut être toxique en cas d'ingestion.
8. La dilution ou l'altération de ces réactifs peut entraîner des résultats erronés.
9. Ne jamais pipeter par la bouche. Éviter tout contact des réactifs et des échantillons de patients avec la peau et les muqueuses.
10. Éviter la contamination microbienne des réactifs. Des résultats erronés peuvent survenir.
11. La contamination croisée des réactifs et/ou des échantillons peut entraîner des résultats erronés.
12. La verrerie réutilisable doit être lavée et rincée à fond sans aucun détergent.
13. Éviter les éclaboussures et la formation d'aérosols.
14. Ne pas exposer les réactifs à une forte lumière pendant le stockage ou l'incubation.
15. Laisser le paquet de lames s'équilibrer à la température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice afin de protéger les puits et le buvard de la condensation.
16. Recueillir la solution de lavage dans une cuvette d'élimination. Traiter la solution de déchets avec un désinfectant (par exemple : 10 % d'eau de Javel - 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs d'eau de Javel.
17. Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de l'eau de Javel ou à des odeurs fortes provenant de solutions contenant de l'eau de Javel. Des traces d'eau de Javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de nombreux réactifs contenus dans ce kit.
18. Ne pas exercer de pression sur l'enveloppe de la lame. Cela pourrait endommager le substrat.
19. Les composants de ce kit sont adaptés pour une sensibilité et une reproductibilité optimales. Les réactifs d'autres fabricants ne doivent pas être interchangeables. Suivre attentivement la notice d'utilisation.
20. Les composants non ouverts/ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, à condition que les conditions de stockage recommandées soient strictement respectées. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Ne pas congeler.
21. Le colorant bleu Evans est potentiellement cancérigène. En cas de contact avec la peau, rincer à l'eau. Éliminer conformément aux réglementations locales.
22. Ne pas laisser sécher les lames pendant la procédure. Selon les conditions du laboratoire, il peut être nécessaire de placer les lames dans une chambre humide pendant les incubations.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

1. Effectuer le prélèvement échantillons conformément au document M29 du CLSI : Protection des travailleurs de laboratoire contre les maladies infectieuses acquises en milieu professionnel. Aucune méthode de test connue ne peut garantir que les échantillons de sang humain ne transmettront pas d'infection. Par conséquent, tous les dérivés sanguins doivent être considérés comme potentiellement infectieux.
2. Seuls les sérums fraîchement prélevés et correctement réfrigérés, obtenus par des procédures de ponction veineuse aseptique approuvées, peuvent être utilisés pour ce test (30, 31). Aucun anticoagulant ou conservateur ne doit être ajouté. Éviter d'utiliser des sérums hémolysés, lipémiques ou contaminés par des bactéries.

3. Conserver l'échantillon à température ambiante pendant 8 heures au maximum. Si le test n'est pas effectué dans les 8 heures, les sérums peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8° C pendant 48 heures au maximum. Si le test est retardé, conserver les sérums à tester à -20°C ou moins. Éviter les cycles multiples de congélation/décongélation qui peuvent entraîner une perte d'activité de l'anticorps et donner des résultats erronés. Il incombe à chaque laboratoire d'utiliser toutes les références disponibles et/ou ses propres études pour déterminer les critères de stabilité pour son laboratoire (38).

PROCÉDURE DE TEST

1. Sortir les lames du réfrigérateur et les laisser se réchauffer à température ambiante (20 - 25°C). Déchirer l'enveloppe protectrice et retirer les lames. **Ne pas appliquer de pression sur les côtés plats de l'enveloppe protectrice.**
2. Identifier chaque puits avec les sérums de patients et les contrôles appropriés. **REMARQUE : Les contrôles sont destinés à être utilisés non dilués.** Préparer une dilution de 1:40 (par exemple : 10µL de sérum + 390µL de Zorba-NS®) du sérum de chaque patient.
Options de dilution :
 - a. Les utilisateurs peuvent titrer le contrôle positif jusqu'au point de terminaison pour servir de contrôle semi-quantitatif (1+ réactivité minimale). Dans ces cas, le contrôle doit être dilué deux fois dans du PBS, **et non dans du Zorba-NS®.** Une dilution finale est établie et imprimée sur le flacon de contrôle positif (± une dilution). Il convient de noter qu'en raison des variations au sein du laboratoire (équipement, etc.), chaque laboratoire doit établir son propre titre attendu au point de terminaison pour chaque lot de contrôle positif.
 - b. Lors du titrage des échantillons de patients, les dilutions initiales doivent être préparées dans Zorba-NS® et toutes les dilutions suivantes doivent être préparées dans du PBS uniquement. **Les titrages ne doivent pas être préparés dans le Zorba-NS®.**
3. À l'aide d'un distributeur approprié (listé ci-dessus), distribuer 20 - 40µL de chaque contrôle et de chaque sérum de patient dilué dans les puits appropriés.
4. Incuber les lames à température ambiante (20 - 25°C) pendant 35±5 minutes.
5. Rincer doucement les lames avec du PBS. **Ne pas diriger un flux de PBS dans les puits de test.**
6. Laver les lames pendant deux intervalles de cinq minutes, en changeant de PBS entre les lavages. Les lames peuvent tremper pendant chaque lavage jusqu'à cinq minutes. **REMARQUE : Pour ceux qui utilisent des laveurs automatiques, régler le laveur pour qu'il lave chaque puits trois fois avec un temps de trempage de zéro à cinq minutes.**
7. Retirer les lames du PBS une par une. Inverser la lame et caler les puits sur les trous des buvards fournis. Éponger la lame en essuyant le verso à l'aide d'une lingette absorbante.
ATTENTION : Placer le buvard et la lame sur une surface dure et plane. Le buvard sur du papier absorbant peut détruire la matrice de la lame. **Ne pas laisser les lames sécher pendant la procédure de test.**
8. Ajouter 20 à 40µL de conjugué dans chaque puits.
9. Répéter les étapes 4 à 7.
10. Appliquer 3 - 5 gouttes de milieu de montage sur chaque lame (entre les puits) et appliquer la lamelle couvre-objet. Il est également possible d'appliquer une petite quantité de milieu de montage dans chaque puits et d'appliquer un verre de protection. Les milieux de montage doivent être ajoutés dans les deux heures suivant la fin du dernier cycle de lavage.
11. Examiner immédiatement les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence approprié. Cette opération peut être réalisée manuellement à l'aide d'un microscope à fluorescence traditionnel ou avec dIFine®. Si vous utilisez dIFine®, veuillez vous référer au manuel de l'instrument pour les instructions d'utilisation. **Il est recommandé d'examiner les lames le jour même du test.**

REMARQUES :

- a. **S'il n'est pas possible d'examiner les lames immédiatement, les lames peuvent être conservées jusqu'à 48 heures à une température comprise entre 2 et 8 °C.**
- b. **Si les lames ne sont pas examinées dans les 48 heures, sceller la lamelle couvre-objet avec du vernis à ongles transparent et la conserver au réfrigérateur.**

CONTRÔLE QUALITÉ

1. Chaque fois que le test est effectué, un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus.
2. Il est recommandé de lire les contrôles avant d'évaluer les échantillons testés. Si les contrôles ne sont pas conformes à la description, les résultats peuvent être invalides.
 - a. Contrôle négatif - caractérisé par l'absence de fluorescence spécifique et une coloration de fond rouge ou vert terne de toutes les cellules due au contre-colorant.
 - b. Contrôle positif (schéma homogène) - caractérisé par une fluorescence vert pomme. Le schéma de coloration homogène est une coloration uniforme diffuse de l'ensemble du noyau.
3. Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux lignes directrices ou aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation.

REMARQUES :

- a. **Il peut y avoir un piégeage non spécifique des réactifs. Il est important de laver correctement les lames pour éliminer les résultats faussement positifs.**
- b. **L'intensité de la fluorescence observée peut varier en fonction du microscope et du système de filtrage utilisés.**
- c. **Une coloration non nucléaire du substrat cellulaire peut être observée avec certains sérums humains.**

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. L'interprétation des résultats dépend du schéma observé, du titre de l'autoanticorps et de l'âge du patient. Les personnes âgées, en particulier les femmes, sont susceptibles de développer des auto-anticorps à faible titre (<1:80) en l'absence de maladie auto-immune clinique. L'expérience suggère qu'une dilution de 1:40 est une bonne dilution pour le dépistage des ANA. Des résultats positifs à faible titre peuvent survenir chez des personnes apparemment en bonne santé ; par conséquent, les résultats ANA doivent toujours être interprétés à la lumière de la présentation clinique globale du patient.
2. Les titres inférieurs à 1:40 sont considérés comme négatifs.
3. Test positif : Une réaction positive est la présence de tout schéma de coloration nucléaire vert pomme observé à une dilution de 1:40 sur une échelle d'intensité de coloration de 1+ à 4+. 1+ est considéré comme une réaction faible et 4+ comme une réaction forte. Tous les sérums positifs à 1:40 doivent être titrés jusqu'à la dilution finale. Pour ce faire, on effectue des dilutions en série au 1:40, 1:80, 1:160, etc. de tous les sérums positifs. Le titre final est la dilution la plus élevée qui produit une réaction positive 1+.
4. Des schémas homogènes avec une accentuation périphérique sont fréquemment trouvés dans les sérums de patients atteints de LED.

	Maladie la plus fréquemment rencontrée	Référence
Homogène : Titre élevé Titre faible	LED Arthrite rhumatoïde et autres maladies	(3, 8, 9 et 16) (1)
Centromère	Variante du syndrome de CREST du PSS	(27)
Tacheté	Sclérodermie, syndrome de Raynaud, syndrome de Sjögren, Maladie mixte du tissu conjonctif	(34 - 36)
Nucléolaire	Sclérodermie	(37)
Périphérique	LED	(2, 8, 9 et 16)

LIMITES DE L'ESSAI

1. L'ANA HEp-2 est une aide au diagnostic en laboratoire et ses résultats ne sont pas diagnostiques en soi. Des ANA positifs peuvent être trouvés chez des individus apparemment en bonne santé. Il est donc impératif que les résultats des ANA soient interprétés en conjonction avec d'autres tests sérologiques et résultats cliniques.
2. Les patients atteints de LED sous stéroïdothérapie peuvent avoir des résultats négatifs (40).
3. De nombreux médicaments couramment prescrits peuvent induire des ANA (6, 7).
4. Un schéma d'auto-anticorps peut masquer partiellement ou complètement les caractéristiques diagnostiques de l'autre. Dans ce cas, il est nécessaire de titrer le sérum.
5. Ce produit ne vise pas à établir une association définitive entre le schéma de fluorescence nucléaire et un état pathologique spécifique.

RÉSULTATS ATTENDUS

La valeur attendue dans la population normale est négative ou inférieure à 1:40. Cependant, des individus apparemment sains peuvent contenir des ANA dans leur sérum (36). Ce pourcentage augmente avec le vieillissement, en particulier au cours de la septième décennie.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

REMARQUE : Lors de l'établissement des caractéristiques de performance du ANA HEp-2, les lames ont été interprétées à l'aide de trois méthodes différentes, comme indiqué ci-dessous :

Méthode d'interprétation :
Méthode A. La méthode A est une méthode d'interprétation entièrement manuelle. Elle a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence traditionnel équipé d'un objectif et d'une lentille oculaire. La détermination du résultat qualitatif et du schéma a été effectuée par des techniciens de laboratoire formés à cet effet.
Méthode B. La méthode B consiste à scanner les lames à l'aide de dIFine® et à demander à un technicien de laboratoire qualifié d'interpréter l'image numérique résultante (qualitative et schéma si positif) apparaissant sur l'écran de l'ordinateur.
Méthode C. La méthode C est le résultat suggéré prédit par dIFine® ; la méthode C prédit le résultat qualitatif et, s'il est positif, le schéma s'il s'agit de l'un des huit schémas que le système a été programmé pour appeler. Si la méthode C est « UNC » (incertaine), le niveau de fluorescence mesuré par dIFine est à la limite entre positif et négatif. La méthode C doit être « validée » ou acceptée par le technicien de laboratoire, modifiée ou complètement invalidée. Pour les besoins de cette étude et des données présentées ci-dessous, la Méthode C est consignée « EN L'ÉTAT » sans aucune modification par le(s) technicien(s) de laboratoire. Elle est donc présentée à titre <i>d'information uniquement</i> .

1. Études analytiques des performances :

a. Linéarité :

Des échantillons fortement positifs ont été identifiés pour chacun des huit schémas ANA suivants : Homogène, tacheté, centromère, nucléolaire, points nucléaires, membrane nucléaire, cytoplasmique (ribosomique) et cytoplasmique (mitochondrial). Chacun des échantillons a été dosé à 1:40 et titré à 1:20480 et interprété par les trois méthodes

susmentionnées. Cette étude a été réalisée en interne par ZEUS Scientific. Les résultats pour chaque échantillon et chaque méthode sont présentés ci-dessous :

Échantillon	Méthode A	Méthode B	Méthode C
Homogène	1:1280	1:1280	1:1280
Tacheté	1:5120	1:5120	1:2560
Centromère	1:5120	1:5120	1:5120
Nucléolaire	1:2560	1:5120	1:2560
Points nucléaires	1:640	1:640	1:640
Membrane nucléaire	1:2560	1:2560	1:2560
Cytoplasmique (ribosomique)	1:320	1:320	1:320
Cytoplasmique (mitochondrial)	1:10240	1:10240	1:10240

Résumé : Dans 100 % des cas, le schéma appelé était conforme aux attentes et en accord, quelle que soit la méthode d'interprétation. De même, la détermination du point de terminaison était conforme aux attentes \pm une dilution pour 100 % des déterminations, quelle que soit la méthode d'interprétation.

b. Reproductibilité d'un lot à l'autre :

Un échantillon modérément positif et un échantillon fortement positif ont été identifiés pour chacun des huit schémas ANA suivants : Homogène, tacheté, centromère, nucléolaire, points nucléaires, membrane nucléaire, cytoplasmique (ribosomique) et cytoplasmique (mitochondrial). En outre, neuf échantillons négatifs ont été inclus, ce qui porte le groupe total à 25 échantillons. Ce groupe de 25 échantillons a été testé sur trois lots différents d'ANA HEP-2 et interprété selon les trois méthodes mentionnées ci-dessus. En outre, les seize membres positifs ont été titrés jusqu'au point de terminaison et interprétés selon les trois méthodes.

Résultats :

- Accord qualitatif :** La concordance des résultats qualitatifs à la dilution de dépistage des 25 échantillons était de 100 % pour les trois lots de kits, et la concordance était de 100 % pour les trois méthodes d'interprétation, quel que soit le lot de kits de réactifs.
- Accord sur le titre des points finaux :** Les 16 échantillons positifs ont donné les mêmes titres au point de terminaison \pm une dilution, quel que soit le lot de la trousse de réactifs ou l'interprétation de la méthode.
- Concordance des schémas :** Pour les dilutions donnant un résultat positif dans les trois méthodes d'interprétation, la concordance des schémas était de 100 % pour le lot 1 et le lot 2 dans les trois méthodes d'interprétation. Pour le lot 3, la concordance des schémas entre la méthode A et la méthode B était de 100 %, un échantillon homogène moyennement positif étant le seul cas aberrant lors de la comparaison de la méthode C avec les méthodes A et B.

c. Étude de la gamme de référence :

Cent quatre-vingts échantillons de sérum ont été prélevés au hasard sur des donneurs sains du nord-est des États-Unis. Les échantillons ont été testés à la dilution de dépistage de 1:40 et interprétés par les trois méthodes. Tous les échantillons produisant un résultat positif à 1:40 ont été titrés et interprétés à l'aide des trois méthodes. Les résultats du test de dépistage sont résumés ci-dessous :

Méthode d'interprétation	Nombre de positifs	% de positifs	Nombre de négatifs	% de négatifs	Nombre d'incertains	% d'incertains
A	19	10,56	161	89,44	NA	NA
B	19	10,56	161	89,44	NA	NA
C	14	7,78	152	84,44	14	7,78

d. Étude de répétabilité sur vingt jours :

Un échantillon faiblement positif (~1:40), un échantillon moyennement positif (~1:160 à 1:320) et un échantillon fortement positif (\geq 1:640) ont été identifiés pour chacun des huit schémas ANA suivants : Homogène, tacheté, centromère, nucléolaire, points nucléaires, membrane nucléaire, cytoplasmique (ribosomique) et cytoplasmique (mitochondrial). Un spécimen ANA négatif a également été inclus, ce qui porte le groupe de spécimens à 25 au total. Ces 25 échantillons ont été analysés (dilution de dépistage de 1:40) chez ZEUS Scientific en trois exemplaires, sur dix jours différents, ce qui a permis d'obtenir 30 résultats par échantillon. Les lames ont été interprétées par les trois méthodes.

Pour l'évaluation intra-méthode, les résultats de la concordance qualitative et de la concordance des schémas sont décrits ci-dessous : la concordance qualitative était de 100 % pour tous les échantillons lus selon les méthodes A et B. Pour la méthode C, 22 échantillons sur 25 présentaient une concordance qualitative de 100 % ; les échantillons homogènes faiblement positifs, nucléolaires faiblement positifs et à membrane nucléaire faiblement positive ne présentaient pas une concordance qualitative complète. En outre, la concordance des schémas était de 100 % pour les méthodes A et B. Pour la méthode C, la concordance des schémas était de 100 % pour 21 échantillons sur 25, des valeurs aberrantes ayant été observées dans les échantillons homogènes faiblement positifs, nucléolaires faiblement positifs, à membrane nucléaire faiblement positive et à membrane nucléaire fortement positive.

Accord sur les résultats qualitatifs à l'intérieur d'une méthode

Échantillon	Méthode A Accord (IC 95 %)	Méthode B Accord (IC 95 %)	Méthode C Accord (IC 95 %)
Homogène Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	76,7 % (59,1 - 88,2 %)
Homogène Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Homogène Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	96,7 % (83,3 - 99,4 %)
Nucléolaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

Échantillon	Méthode A Accord (IC 95 %)	Méthode B Accord (IC 95 %)	Méthode C Accord (IC 95 %)
Ribosomique Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Négatif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

Accord sur les résultats des schémas à l'intérieur d'une même méthode (technicien 2)

Échantillon	Méthode A Accord (IC 95 %)	Méthode B Accord (IC 95 %)	Méthode C Accord (IC 95 %)
Homogène Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	73,3 % (55,6 - 85,8 %)
Homogène Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Homogène Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	96,7 % (83,3 - 99,4 %)
Nucléolaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	86,67 % (70,3 - 94,7 %)
Membrane nucléaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	96,7 % (83,3 - 99,4 %)

Échantillon	Méthode A Accord (IC 95 %)	Méthode B Accord (IC 95 %)	Méthode C Accord (IC 95 %)
Fortement Positif			
Points nucléaires Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

En ce qui concerne la concordance entre les méthodes, la concordance qualitative et de schéma entre la méthode A et la méthode B était de 100 %. Cependant, seuls 22 échantillons sur 25 présentaient une concordance qualitative de 100 % dans les comparaisons entre la méthode B et la méthode C et entre la méthode A et la méthode C ; les échantillons discordants étaient les échantillons homogènes faiblement positifs, nucléolaires faiblement positifs et à membrane nucléaire faiblement positive. En outre, seuls 21 échantillons sur 25 ont montré une concordance de schéma de 100 % dans les comparaisons entre la méthode B et la méthode C et entre la méthode A et la méthode C ; les échantillons discordants étaient les échantillons homogènes faiblement positifs, nucléolaires faiblement positifs et à membrane nucléaire faiblement positive et à membrane nucléaire fortement positive.

Accord des résultats qualitatifs entre méthodes

Échantillon	Accord entre la méthode A et la méthode B (IC 95 %)	Accord entre la méthode A et la méthode C (IC 95 %)	Accord entre la méthode B et la méthode C (IC 95 %)
Homogène Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	76,67 % (59,1 - 88,2 %)	76,67 % (59,1 - 88,2 %)
Homogène Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Homogène Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	96,67 % (83,3 - 99,4 %)	96,67 % (83,3-99,4 %)
Nucléolaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

Échantillon	Accord entre la méthode A et la méthode B (IC 95 %)	Accord entre la méthode A et la méthode C (IC 95 %)	Accord entre la méthode B et la méthode C (IC 95 %)
Nucléolaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	90 % (74,4 - 96,5 %)
Membrane nucléaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Négatif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

Entre Méthode Schéma Résultat Accord

Échantillon	Accord entre la méthode A et la méthode B (IC 95 %)	Accord entre la méthode A et la méthode C (IC 95 %)	Accord entre la méthode B et la méthode C (IC 95 %)
Homogène Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	73,3 % (55,6 - 85,9 %)	73,3 % (55,6 - 85,9 %)
Homogène Moyennement positif	100 % (88,65 - 100 %)	100 % (88,65 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Homogène Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Tacheté Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

Échantillon	Accord entre la méthode A et la méthode B (IC 95 %)	Accord entre la méthode A et la méthode C (IC 95 %)	Accord entre la méthode B et la méthode C (IC 95 %)
Centromère Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Moyennement positif	100 % (88,65 - 100 %)	100 % (88,65 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Centromère Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	96,7 % (83,3 - 99,4 %)	96,7 % (83,3 - 99,4 %)
Nucléolaire Moyennement positif	100 % (88,65 - 100 %)	100 % (88,65 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Nucléolaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Mitochondrial Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	86,7 % (70,3 - 94,7)	86,7 % (70,3 - 94,7 %)
Membrane nucléaire Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Membrane nucléaire Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	96,7 % (83,3 - 99,4 %)
Points nucléaires Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Points nucléaires Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Faiblement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Moyennement positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)
Ribosomique Fortement Positif	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)	100 % (88,7 - 100 %)

e. Étude de reproductibilité sur cinq jours et sur plusieurs sites :

Un échantillon faiblement positif (~1:40), un échantillon moyennement positif (~1:160 - 1:320) et un échantillon fortement positif (≥ 1:640) ont été identifiés pour chacun des huit schémas ANA suivants : Homogène, tacheté, centromère, nucléolaire, points nucléaires, membrane nucléaire, cytoplasmique (ribosomique) et cytoplasmique (mitochondrial). Un spécimen ANA négatif a également été inclus, ce qui porte le groupe de spécimens à 25 au total. Ces 25 échantillons ont été analysés (dilution de dépistage de 1:40) en trois exemplaires, deux fois par jour, cinq jours différents et trois laboratoires différents, ce qui a donné 30 résultats par échantillon et par site. Les lames ont été interprétées par les trois méthodes. Sur chaque site, la méthode A et la méthode B ont également été interprétées par deux techniciens de laboratoire différents. Les résultats de la concordance qualitative et de la concordance des schémas sont présentés ci-dessous :

i. Accord sur le résultat qualitatif global

a. Au sein de la méthode : La concordance qualitative à l'intérieur de la méthode pour la méthode A et la méthode B était de 100 % pour les trois sites et tous les techniciens. Pour la méthode C, la concordance a été de 100 % pour 24 échantillons sur 25 dans tous les sites et pour tous les techniciens : un échantillon faiblement positif à la membrane nucléaire étant le seul échantillon discordant dans le site 2.

b. Entre la méthode : La concordance qualitative entre la méthode A et la méthode B et entre la méthode A et la méthode C a été de 100 % pour les 25 échantillons. Notamment, la concordance qualitative entre la méthode B et la méthode C a été de 100 % pour 24 des 25 échantillons, l'échantillon faiblement positif à la membrane nucléaire étant un échantillon aberrant au site 2.

ii. Concordance des résultats des schémas

a. Au sein de la méthode : La concordance des schémas à l'intérieur d'une même méthode pour la méthode A et la méthode B était de 100 % pour les trois sites et tous les techniciens. Pour la méthode C, la concordance a été de 100 % pour 24 échantillons sur 25, l'échantillon situé au milieu du centromère étant le seul cas aberrant.

b. Entre la méthode : La concordance des schémas a été de 100 % pour les 25 spécimens entre la méthode A et la méthode B pour tous les sites et tous les techniciens. Pour la méthode A par rapport à la méthode C, il y avait deux échantillons divergents : un échantillon central de centromère sur le site 1 et un échantillon bas de membrane nucléaire sur le site 2. De même, pour la méthode B par rapport à la méthode C, il y avait deux échantillons divergents : un spécimen central de centromère au site 1 et un spécimen bas de membrane nucléaire au site 2

f. Étude d'interférence :

Un échantillon moyennement positif (~1:160 à 1:320 point de terminaison) et un échantillon fortement positif (\geq 1:640) ont été identifiés pour chacun des huit schémas ANA suivants : Homogène, tacheté, centromère, nucléolaire, points nucléaires, membrane nucléaire, cytoplasmique (ribosomique) et cytoplasmique (mitochondrial). Un spécimen ANA négatif a également été inclus, ce qui porte le groupe de spécimens à 17 au total. Ces 17 échantillons ont été dopés avec deux concentrations différentes (low spike et high spike) de douze interférents possibles différents, comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Tous les échantillons ont été évalués sur l'ANA HEp-2 et interprétés par les trois méthodes susmentionnées.

Interfèrent	Concentrations des essais interférents	
	Faible	Haut
Intralipides	3 mg/mL	7,50 mg/mL
Cholestérol	1,5 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumine	35 mg/1mL	50 mg/1mL
Ibuprofène	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Prednisone	0,2 mg/mL	0,8 mg/mL
Hydroxychloroquine	0,006 mg/mL	0,2 mg/mL
Simvastatine	4 ug/mL	20 ug/mL
Cyclophosphamide	1 mg/mL	4 mg/mL
Facteur rhumatoïde	200 U/mL	400 U/mL
Hémoglobine	100 mg/mL	200 mg/mL
Triglycérides	1,5 mg/mL	5 mg/mL
Bilirubine	0,01 mg/mL	0,15 mg/mL

Résultats : Pour les méthodes A et B, ni l'accord qualitatif ni le schéma obtenu n'ont été affectés par l'ajout des interférents possibles. La méthode C a donné un résultat incertain dans un échantillon de membrane nucléaire faiblement positif lorsqu'il a été dopé avec de l'albumine. On peut donc conclure que les résultats de l'ANA HEp-2 ne présentent pas de risque significatif de résultats erronés en raison de la présence des interférents testés.

Une deuxième étude d'interférence a été réalisée, centrée sur le seuil d'analyse et incluant quelques interférents potentiels supplémentaires. Des échantillons ont été sélectionnés pour chacun des huit profils ANA (homogène, tacheté, centromère, nucléolaire, points nucléaires, membrane nucléaire, cytoplasmique (ribosomique) et cytoplasmique (mitochondrial)) qui présentaient un titre final de 1:40-1:80 (proche du seuil d'analyse), ainsi qu'un échantillon ANA négatif. Ces neuf échantillons ont été dopés à deux concentrations différentes des interférents énumérés ci-dessous.

Interfèrent	Concentrations des essais interférents	
	Faible	Haut
Bilirubine (non conjuguée)	0,02 mg/mL	0,15 mg/mL
Cholestérol (total)	1,5 mg/mL	2,2 mg/mL
Triglycérides	1 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumine	35 mg/mL	52 mg/mL
Hémoglobine	100 mg/mL	200 mg/mL
Intralipides	2,0 mg/mL	20 mg/mL

Facteur rhumatoïde	200 U/mL	400 mg/mL
Cyclophosphamide	0,183 mg/mL	0,549 mg/mL
Ibuprofène	0,073 mg/mL	0,219 mg/mL
Hydroxychloroquine	0,006 mg/mL	0,024 mg/mL
Simvastatine	0,000277 mg/mL	0,000083 mg/mL
Prednisone	0,000033 mg/mL	0,000099 mg/mL
Azathioprine	0,00086 mg/mL	0,00258 mg/mL
Diltiazem	0,0003 mg/mL	0,0009 mg/mL
Mycophénolate mofétil	0,012 mg/mL	0,048 mg/mL
Rituximab	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Belimumab	2 mg/mL	8 mg/mL

Résultats : Là encore, ni l'accord qualitatif ni le schéma obtenu n'ont été affectés par l'ajout des interférents possibles, quelle que soit la méthode d'interprétation. On peut donc conclure que les résultats de l'ANA HEp-2 ne présentent pas de risque significatif de résultats erronés en raison de la présence des interférents testés.

2. Conception de l'étude sur les performances cliniques :

Un total de 380* échantillons cliniquement caractérisés ont été acquis comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Ces 380 échantillons ont été aliquotés et envoyés à trois laboratoires différents pour être évalués par ANA HEp-2. Les trois laboratoires ont évalué les lames selon les trois méthodes susmentionnées. En outre, les méthodes A et B d'interprétation des lames ont été répétées deux fois sur chaque site clinique par deux techniciens de laboratoire différents. Dans chaque site clinique, les 380 échantillons ont d'abord été examinés à une dilution de 1:40 pour une évaluation du statut qualitatif des 380 échantillons. Tout échantillon générant un résultat positif à la dilution de dépistage de 1:40 (pour l'une ou l'autre des trois méthodes d'interprétation) a ensuite été titré et interprété à nouveau selon les trois méthodes afin de déterminer le critère d'évaluation ainsi que le schéma. * **REMARQUE : Le site 2 a testé un nombre inférieur d'échantillons de maladie cœliaque et de vascularite, ce qui donne un total de 350 échantillons sur le site 2.**

Les résultats ont été utilisés pour évaluer la spécificité clinique (réactivité croisée potentielle), la sensibilité clinique, la concordance qualitative entre les méthodes au sein des sites, l'interprétation de la méthode C entre les sites (c.-à-d. la comparaison des microscopes automatisés dIFine® et dIFine®), la concordance des titres des points finaux et la concordance des schémas.

Maladies associées aux ANA	n, Tous les sites
<i>Maladies du tissu conjonctif :</i>	
Lupus systémique érythémateux (LED)	40
Syndrome de Sjögren (SS)	30
Sclérodermie	20
Myosite auto-immune (AM)	20
Maladie du tissu conjonctif mixte (MCTD)	20
CREST	20
<i>Autres maladies auto-immunes associées aux ANA :</i>	
Hépatite auto-immune (HIA)	20
Lupus médicamenteux (DIL)	20
Total	190

Maladies non associées aux ANA	n, Site 1 et Site 3	n, Site 2
<i>Autres maladies auto-immunes :</i>		
Maladie cœliaque	22	10
Vascularite associée aux ANCA	28	10
Maladie de Crohn	10	10
Arthrite rhumatoïde	30	30
Thyroïdite auto-immune	30	30
Maladies inflammatoires de l'intestin (MICI)	10	10
Colite ulcéreuse	10	10
<i>Autres maladies :</i>		
Malignité/Cancer	20	20
Fibromyalgie	10	10
Maladies infectieuses	10	10
Total	190	160

3. Sensibilité et spécificité cliniques :

La sensibilité clinique a été calculée sur chaque site pour le LED séparément et pour la combinaison des maladies du tissu conjonctif (CTD : LED+ SS+ sclérodermie+ CREST+ MCTD+ AM) plus d'autres maladies associées aux ANA (hépatite hépatique auto-immune + lupus induit par les médicaments). La spécificité a été calculée en utilisant la population de contrôle totale des maladies non associées aux ANA.

a. Performances cliniques sur le site 1

Sensibilité et spécificité du diagnostic	Sensibilité (%) (IC 95 %)	Sensibilité (%) 95% CI)	Spécificité (%) (IC 95 %)
	LED (n = 40)	CTD + maladies associées aux ANA (n = 190)	Maladies non associées aux ANA (n = 190)

Site 1	Méthode A	Technicien A	52,5 % (37,5 - 67,1 %)	53,2 % (46,1 - 60,1 %)	75,8 % (69,2 - 81,3 %)
	Méthode A	Technicien B	57,5 % (42,2 - 71,5 %)	60,0 % (52,9 - 66,7 %)	73,2 % (66,4 - 79,0 %)
	Méthode B	Technicien A	55,0 % (39,8 - 69,3 %)	54,7 % (47,6 - 61,6 %)	75,8 % (69,2 - 81,3 %)
	Méthode B	Technicien B	52,5 % (37,5 - 67,1 %)	57,9 % (50,8 - 64,7 %)	74,2 % (67,6 - 79,9 %)
	Méthode C	dIFine	55,0 % (39,8 - 69,3 %)	57,4 % (50,3 - 64,2 %)	67,4 % (60,4 - 73,6%)

b. Performances cliniques sur le site 2

Sensibilité et spécificité du diagnostic			Sensibilité (%) (IC 95 %)	Sensibilité (%) (IC 95 %)	Spécificité (%) (IC 95 %)
			LED (n = 40)	CTD + maladies associées aux ANA (n = 190)	Maladies non associées aux ANA (n = 160)
Site 2	Méthode A	Technicien A	50,0 % (35,2 - 64,8 %)	51,6 % (44,5 - 58,6 %)	83,1 % (76,6 - 88,1 %)
	Méthode A	Technicien B	55,0 % (39,8 - 69,3 %)	56,3 % (49,2 - 63,2 %)	80,0 % (73,1 - 85,5 %)
	Méthode B	Technicien A	52,5 % (37,5 - 67,1 %)	56,8 % (49,7 - 63,7 %)	81,3 % (74,5 - 86,5 %)
	Méthode B	Technicien B	55,0 % (39,8 - 69,3 %)	58,4 % (51,3 - 65,2 %)	80,6 % (73,8 - 86,0 %)
	Méthode C	dIFine	52,5 % (37,5 - 67,1 %)	55,8 % (48,7 - 62,7 %)	74,4 % (67,1 - 80,5 %)

c. Performances cliniques sur le site 3

Sensibilité et spécificité du diagnostic			Sensibilité (%) (IC 95 %)	Sensibilité (%) (IC 95 %)	Spécificité (%) (IC 95 %)
			LED (n = 40)	CTD + maladies associées aux ANA (n = 190)	Maladies non associées aux ANA (n = 190)
Site 3	Méthode A	Technicien A	47,5 % (32,9 - 62,5 %)	53,2 % (46,1 - 60,1 %)	76,8 % (70,4 - 82,3 %)
	Méthode A	Technicien B	55,0 % (39,8 - 69,3 %)	57,4 % (50,3 - 64,2 %)	74,2 % (67,6 - 79,9 %)
	Méthode B	Technicien A	45,0 % (30,7 - 60,2 %)	52,6 % (45,6 - 59,6 %)	78,9 % (72,6 - 84,1 %)
	Méthode B	Technicien B	57,5 % (42,2 - 71,5 %)	56,3 % (49,2 - 63,2 %)	74,7 % (68,1 - 80,4 %)
	Méthode C	dIFine	55,0 % (39,8 - 69,3 %)	54,2 % (47,1 - 61,1 %)	67,5 % (63,1 - 76,1 %)

La sensibilité au sein de la cohorte SLE a varié de 45,0 % à 57,5 % pour les trois méthodes et les trois sites. La prévalence des ANA observée dans cette cohorte de LED semble inférieure à ce qui est généralement observé. Selon les rhumatologues qui ont participé à la collecte de ces échantillons, cela peut s'expliquer par le fait que la majorité de ces patients suivaient des traitements immunosuppresseurs puissants et que leur maladie était peu active ou en rémission. Cette faible prévalence des ANA observée a été confirmée par l'utilisation d'un autre produit ANA commercial HEP-2 IFA autorisé par la FDA. La sensibilité clinique dans la cohorte CTD + maladies associées aux ANA était comprise entre 51,6 % et 60,0 % pour les trois méthodes et les trois sites. La spécificité clinique dans la cohorte des maladies non associées aux ANA a varié entre 67,4 % et 83,1 % pour les trois méthodes et les trois sites. Si l'on fait la moyenne de toutes les méthodes d'interprétation sur les trois sites, la sensibilité clinique dans le groupe SLE était en moyenne de 53,2 %, la sensibilité clinique dans le groupe CTD + maladies associées aux ANA était en moyenne de 55,7 % et la spécificité clinique dans le groupe maladies non associées aux ANA était en moyenne de 75,9 %.

4. Fréquence des ANA détectés par groupe de maladies :

En plus d'une détermination positive ou négative, la méthode C peut donner lieu à un résultat « incertain » si dFine® n'a pas pu identifier le résultat comme étant clairement positif ou clairement négatif. Les résultats incertains ont été considérés comme négatifs pour le résumé ci-dessous (c'est-à-dire qu'ils n'étaient **pas** positifs). Le tableau ci-dessous montre le pourcentage de chaque catégorie de maladie qui a été qualifiée de qualitativement positive par chaque technicien sur chaque site et par chaque méthode. Ce tableau résume la fréquence des ANA trouvés dans chaque catégorie de maladie et la cohérence de la détermination des ANA d'une méthode à l'autre.

Site 1 :

Maladies	Technicien A		Technicien B		Méthode C
	Méthode A	Méthode B	Méthode A	Méthode B	
Maladies associées aux ANA					
LED	52,5 %	55,0 %	57,5 %	52,5 %	55,0 %
Sjögren	50,0 %	50,0 %	56,7 %	53,3 %	53,3 %
Sclérodémie	75,0 %	70,0 %	80,0 %	80,0 %	80,0 %
Myosite auto-immune	50,0 %	55,0 %	65,0 %	60,0 %	60,0 %
MCTD	40,0 %	40,0 %	50,0 %	55,0 %	50,0 %
CREST	80,0 %	80,0 %	80,0 %	80,0 %	80,0 %
Hépatite auto-immune	45,0 %	50,0 %	60,0 %	55,0 %	50,0 %
Lupus médicamenteux	35,0 %	40,0 %	35,0 %	35,0 %	35,0 %
Maladies non associées à l'ANA					
Thyroïdite auto-immune	23,3 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %
Cancer	15,0 %	15,0 %	20,0 %	20,0 %	15,0 %
Maladie cœliaque	45,5 %	45,5 %	45,5 %	45,5 %	45,5 %
Maladie de Crohn	30,0 %	30,0 %	30,0 %	30,0 %	30,0 %
Fibromyalgie	30,0 %	40,0 %	50,0 %	40,0 %	40,0 %
Maladies infectieuses	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %
Maladies inflammatoires de l'intestin	40,0 %	30,0 %	40,0 %	20,0 %	20,0 %
Arthrite rhumatoïde	16,7 %	23,3 %	23,3 %	23,3 %	16,7 %
Colite ulcéreuse	30,0 %	30,0 %	50,0 %	60,0 %	40,0 %
Vascularite	17,9 %	14,3 %	14,3 %	14,3 %	14,3 %

Site 2 :

Maladies	Technicien A		Technicien B		Méthode C
	Méthode A	Méthode B	Méthode A	Méthode B	
Maladies associées aux ANA					
LED	50,0 %	52,5 %	55,0 %	55,0 %	52,5 %
Sjögren	53,3 %	53,3 %	56,7 %	56,7 %	53,3 %
Sclérodémie	75,0 %	80,0 %	75,0 %	80,0 %	80,0 %
Myosite auto-immune	55,0 %	65,0 %	65,0 %	70,0 %	60,0 %
MCTD	30,0 %	45,0 %	35,0 %	45,0 %	45,0 %
CREST	75,0 %	80,0 %	80,0 %	80,0 %	75,0 %
Hépatite auto-immune	40,0 %	45,0 %	45,0 %	45,0 %	45,0 %
Lupus médicamenteux	35,0 %	40,0 %	40,0 %	40,0 %	40,0 %
Maladies non associées à l'ANA					
Thyroïdite auto-immune	13,3 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %
Cancer	10,0 %	15,0 %	15,0 %	15,0 %	15,0 %
Maladie cœliaque	20,0 %	30,0 %	20,0 %	30,0 %	30,0 %
Maladie de Crohn	30,0 %	30,0 %	30,0 %	30,0 %	30,0 %
Fibromyalgie	40,0 %	40,0 %	40,0 %	40,0 %	40,0 %
Maladies infectieuses	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %
Maladies inflammatoires de l'intestin	20,0 %	20,0 %	20,0 %	20,0 %	20,0 %
Arthrite rhumatoïde	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %

Colite ulcéreuse	40,0 %	40,0 %	60,0 %	40,0 %	40,0 %
Vascularite	0,0 %	0,0 %	10,0 %	10,0 %	0,0 %

Site 3 :

Maladies	Technicien A		Technicien B		Méthode C
	Méthode A	Méthode B	Méthode A	Méthode B	
Maladies associées aux ANA					
LED	47,5 %	45,0 %	55,0 %	57,5 %	52,5 %
Sjögren	46,7 %	50,0 %	60,0 %	53,3 %	50,0 %
Sclérodémie	75,0 %	75,0 %	80,0 %	75,0 %	75,0 %
Myosite auto-immune	60,0 %	60,0 %	60,0 %	60,0 %	60,0 %
MCTD	45,0 %	45,0 %	45,0 %	45,0 %	45,0 %
CREST	80,0 %	80,0 %	75,0 %	75,0 %	75,0 %
Hépatite auto-immune	45,0 %	40,0 %	50,0 %	50,0 %	45,0 %
Lupus médicamenteux	35,0 %	35,0 %	35,0 %	35,0 %	35,0 %
Maladies non associées à l'ANA					
Thyroïdite auto-immune	16,7 %	13,3 %	20,0 %	16,7 %	16,7 %
Cancer	20,0 %	20,0 %	20,0 %	25,0 %	15,0 %
Maladie coéliquae	45,5 %	45,5 %	45,5 %	45,5 %	45,5 %
Maladie de Crohn	30,0 %	20,0 %	30,0 %	30,0 %	30,0 %
Fibromyalgie	40,0 %	40,0 %	50,0 %	50,0 %	40,0 %
Maladies infectieuses	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %
Maladies inflammatoires de l'intestin	30,0 %	30,0 %	30,0 %	30,0 %	20,0 %
Arthrite rhumatoïde	23,3 %	16,7 %	26,7 %	20,0 %	16,7 %
Colite ulcéreuse	40,0 %	40,0 %	60,0 %	60,0 %	40,0 %
Vascularite	10,7 %	10,7 %	10,7 %	14,3 %	14,3 %

La fréquence des ANA détectés dans la cohorte de la maladie coéliquae semble plus élevée que prévu. La littérature confirme l'existence d'un taux élevé d'ANA chez les patients atteints de la maladie coéliquae (39). En outre, ces échantillons ont été testés sur un autre ANA commercial HEP-2 autorisé par la FDA et l'ANA a été confirmé sur ce produit.

5. Comparaisons des méthodes d'interprétation :

350 échantillons cliniques ont été testés sur les trois sites cliniques. Trente échantillons supplémentaires de maladie coéliquae et de vascularite cliniquement caractérisés ont été testés sur les sites un et trois. Enfin, 12 échantillons supplémentaires collectés rétrospectivement et présentant le schéma de la membrane nucléaire ou des points nucléaires ont été testés dans les sites un et trois. Avec ces 392 échantillons, il y avait un total de 2268 cas où l'on pouvait comparer les résultats de la méthode A par rapport à la méthode B, de la méthode A par rapport à la méthode C, et de la méthode B par rapport à la méthode C. Un résumé de ces comparaisons qualitatives apparaît dans les tableaux ci-dessous :

a. Comparaisons des méthodes d'interprétation :

Méthode A contre méthode B		Exemple d'accord positif (IC 95 %)	Exemple d'accord négatif (IC 95 %)	Total de l'accord type (IC 95 %)
Site 1	Technicien A	95,6 % (152/159) (91,2 - 97,9 %)	95,7 % (223/233) (92,3 - 97,7 %)	95,7 % (375/392) (93,2 - 97,3 %)
	Technicien B	94,9 % (168/177) (90,6 - 97,3 %)	98,6 % (212/215) (95,9 - 99,5 %)	96,9 % (380/392) (94,7 - 98,2 %)
Site 2	Technicien A	99,2 % (124/125) (95,6 - 99,9 %)	93,8 % (211/225) (89,8 - 96,3 %)	95,7 % (335/350) (93,1 - 97,4 %)
	Technicien B	98,6 % (137/139) (94,9 - 99,6 %)	97,6 % (206/211) (94,6 - 98,95 %)	98,0 % (343/350) (95,9 - 99,0 %)
Site 3	Technicien A	95,5 % (148/155) (90,9 - 97,8 %)	98,7 % (234/237) (96,4 - 99,65 %)	97,5 % (382/392) (95,4 - 98,6 %)
	Technicien B	95,9 % (162/169) (91,7 - 97,9 %)	97,8 % (218/223) (94,9 - 99,0 %)	96,9 % (380/392) (94,7 - 98,2 %)

b. Accord qualitatif combiné pour la méthode A et la méthode B Tous les sites/tous les techniciens

		Méthode A	
		Positif	Négatif
Méthode B	Positif	891	40
	Négatif	33	1304

Pourcentage d'accord positif = 96,43 % (891 / 924) Intervalle de confiance de 95 % = 95,03 - 97,45 %
 Pourcentage d'accord négatif = 97,02 % (1304 / 1344) Intervalle de confiance de 95 % = 95,97 - 97,81 %
 Pourcentage d'accord total = 96,78 % (2195 / 2268) Intervalle de confiance de 95 % = 95,97 - 97,43 %

c. Comparaison qualitative entre la méthode A et la méthode C

La méthode C ayant donné des résultats incertains pour un grand nombre de spécimens, les pourcentages de concordance positifs et négatifs ont été calculés en utilisant les deux scénarios applicables :

L'incertain au service du positif

Méthode A vs méthode C		Exemple d'accord positif (IC 95 %)	Exemple d'accord négatif (IC 95 %)	Total de l'accord type (IC 95 %)
Site 1	Technicien A	97,5 % (155/159) (93,7 - 99,0 %)	80,3 % (187/233) (74,7 - 84,9 %)	87,2 % (342/392) (83,6 - 90,2 %)
	Technicien B	98,3 % (174/177) (95,1 - 99,4 %)	87,4 % (188/215) (82,4 - 91,2 %)	92,4 % (362/392) (89,3 - 94,6 %)
Site 2	Technicien A	100 % (125/125) (97,0 - 100,0 %)	85,3 % (192/225) (80,1 - 89,4 %)	90,6 % (317/350) (87,1 - 93,2 %)
	Technicien B	100 % (139/139) (97,3 - 100,0 %)	91,0 % (192/211) (86,4 - 94,2 %)	94,6 % (331/350) (91,7 - 96,5 %)
Site 3	Technicien A	100 % (155/155) (97,6 - 100,0 %)	87 % (206/237) (82,0 - 90,7 %)	92,1 % (361/392) (88,9 - 94,4 %)
	Technicien B	98,8 % (167/169) (95,8 - 99,7 %)	91,9 % (205/223) (87,6 - 94,8 %)	94,9 % (372/392) (92,3 - 96,7 %)

d. Les résultats de la méthode A par rapport à la méthode C pour tous les sites et tous les techniciens combinés sont présentés ci-dessous :

		Méthode A	
		Positif	Négatif
Méthode C	Positif	915	174
	Négatif	9	1170

Pourcentage d'accord positif : 99,03 % (915/924) 95 % CI : 98,39 - 99,55 %
 Pourcentage d'accord négatif : 87,05 % (1170/1344) 95 % CI : 85,15 - 88,74 %
 Pourcentage total d'accord : 91,93 % (2085/2268) 95 % CI : 90,74 - 92,98 %

Incertain Compté vers les négatifs

Méthode A vs méthode C		Exemple d'accord positif (IC 95 %)	Exemple d'accord négatif (IC 95 %)	Total de l'accord type (IC 95 %)
Site 1	Technicien A	93,1 % (148/159) (88,0 - 96,1 %)	94,0 % (219/233) (90,2 - 96,4 %)	93,6 % (367/392) (90,8 - 96,5 %)
	Technicien B	90,4 % (160/177) (85,2 - 93,9 %)	99,1 % (213/215) (96,7 - 99,7 %)	95,2 % (373/392) (92,6 - 96,9 %)
Site 2	Technicien A	99,2 % (124/125) (95,1 - 99,9 %)	94,7 % (213/225) (90,9 - 96,9 %)	96,3 % (337/350) (93,8 - 97,8 %)
	Technicien B	95,0 % (132/139) (89,9 - 97,5 %)	98,1 % (207/211) (95,2 - 99,3 %)	96,9 % (339/350) (94,5 - 98,2 %)
Site 3	Technicien A	96,1 % (149/155) (91,8 - 98,2 %)	97,1 % (230/237) (94,4 - 98,1 %)	96,7 % (379/392) (94,4 - 98,1 %)
	Technicien B	90,5 % (153/169) (85,2 - 94,1 %)	98,7 % (220/223) (96,1 - 99,5 %)	95,2 % (373/392) (92,6 - 96,9 %)

e. Les résultats de la méthode A par rapport à la méthode C pour tous les sites et tous les techniciens combinés sont présentés ci-dessous :

		Méthode A	
		Positif	Négatif
Méthode C	Positif	866	42
	Négatif	58	1302

Pourcentage d'accord positif : 93,72 % (866/924) 95 % CI : 91,97 - 95,11 %
 Pourcentage d'accord négatif : 96,88 % (1302/1344) 95 % CI : 95,80 - 97,68 %
 Pourcentage total d'accord : 95,59 % (2168/2268) 95 % CI : 94,67 - 96,36 %

f. Comparaison qualitative entre la méthode B et la méthode C

Étant donné que la méthode C peut donner un résultat incertain (UNC) en plus d'un résultat qualitatif positif ou négatif, la concordance entre les méthodes a été calculée en utilisant les échantillons UNC considérés comme positifs et ensuite considérés comme négatifs :

UNC considéré comme positif pour chaque site et chaque technicien.

Méthode B vs méthode C		Exemple d'accord positif (IC 95 %)	Exemple d'accord négatif (IC 95 %)	Total de l'accord type (IC 95 %)
Site 1	Technicien A	100,0 % (162/162) (97,7 - 100,0 %)	83,0 % (191/230) (77,7 - 87,3 %)	90,1 % (353/392) (86,7 - 92,7 %)
	Technicien B	99,4 % (170/171) (96,8 - 99,9 %)	86,4 % (191/221) (81,3 - 90,3 %)	91,8 % (360/392) (88,7 - 94,2 %)
Site 2	Technicien A	100,0 % (138/138) (97,3 - 100,0 %)	90,6 % (192/212) (85,9 - 93,8 %)	94,3 % (330/350) (91,3 - 96,3 %)
	Technicien B	100,0 % (142/142) (97,4 - 100,0 %)	92,3 % (192/208) (87,9 - 95,2 %)	95,4 % (334/350) (92,7 - 97,2 %)
Site 3	Technicien A	99,3 % (150/151) (96,3 - 99,9 %)	85,5 % (206/241) (80,5 - 89,4 %)	89,9 % (356/392) (86,5 - 92,5 %)
	Technicien B	99,4 % (166/167) (96,7 - 99,9 %)	91,6 % (206/225) (87,2 - 94,5 %)	94,9 % (372/392) (92,3 - 96,7 %)

Accord qualitatif combiné entre la méthode B et la méthode C pour tous les sites/tous les techniciens (UNC comme positifs) :

		Méthode B		Total
		Positif	Négatif	
Méthode C	Positif	928	160	1088
	Négatif	3	1177	1180
Total		931	1337	2268

Pourcentage d'accord positif : 99,7 % (928/931) 95 % CI : 99,1 - 99,9 %
 Pourcentage d'accord négatif : 88,0 % (1177/1337) 95 % CI : 86,2 - 89,7 %
 Pourcentage total d'accord : 92,8 % (2105/2268) 95 % CI : 91,7 - 93,8 %

UNC considérée comme négative pour chaque site et chaque technicien

Méthode B vs méthode C		Exemple d'accord positif (IC 95 %)	Exemple d'accord négatif (IC 95 %)	Total de l'accord type (IC 95 %)
Site 1	Technicien A	95,7 % (155/162) (91,4 - 97,9 %)	97,0 % (223/230) (93,9 - 98,5 %)	96,4 % (378/392) (94,1 - 97,9 %)
	Technicien B	94,2 % (161/171) (89,6 - 96,8 %)	99,6 % (220/221) (97,5 - 99,9 %)	97,2 % (381/392) (95,1 - 98,4 %)
Site 2	Technicien A	98,6 % (136/138) (94,9 - 99,60 %)	100,0 % (212/212) (98,2 - 100,0 %)	99,4 % (348/350) (97,9 - 99,8 %)
	Technicien B	95,8 % (136/142) (91,1 - 98,1 %)	100,00 % (208/208) (98,2 - 100,0 %)	98,3 % (344/350) (96,3 - 99,2 %)
Site 3	Technicien A	98,0 % (148/151) (94,3 - 99,3 %)	96,7 % (233/241) (93,6 - 98,3 %)	97,2 % (381/392) (95,1 - 98,4 %)
	Technicien B	92,8 % (155/167) (87,9 - 95,8 %)	99,56 % (224/225) (97,5 - 99,9 %)	96,68 % (379/392) (94,4 - 98,1 %)

Accord qualitatif combiné entre la méthode B et la méthode C pour tous les sites/tous les techniciens (UNC en négatif) :

		Méthode B		Total
		Positif	Négatif	
Méthode C	Positif	891	17	908
	Négatif	40	1320	1360
Total		931	1337	2268

Pourcentage d'accord positif : 95,7% (891/931) 95 % CI : 94,2 – 96,8 %
 Pourcentage d'accord négatif : 98,7% (1320/1337) 95 % CI : 98,0 – 99,2 %
 Pourcentage total d'accord : 97,5% (2211/2268) 95 % CI : 96,8 – 98,1 %

Dans tous les cas, l'accord qualitatif entre les méthodes d'interprétation est assez élevé, ce qui indique que les trois méthodes (microscope manuel, lecture numérique du scanner diFine® et appel automatisé du scanner diFine®) sont bien corrélées entre elles et présentent peu de divergences.

En outre, les déterminations de schéma ont été corrélées entre les différentes méthodes d'interprétation ; les échantillons qui n'avaient pas de schéma (c'est-à-dire « négatifs ») ou les échantillons qui ont donné des résultats incertains (c'est-à-dire « UNC ») ont été inclus dans les analyses de concordance des schémas entre les différentes méthodes d'interprétation sont présentées dans le tableau ci-dessous :

		Méthode A contre méthode B	Méthode A vs méthode C	Méthode B vs méthode C
		Pourcentage d'accord (%) (Nombre d'accord/Nombre total) [95 % CI]	Pourcentage d'accord (%) (Nombre d'accord/Nombre total) [95 % CI]	Pourcentage d'accord (%) (Nombre d'accord/Nombre total) [95 % CI]
Site 1	Technicien A	98,5 (386/392) [96,7 – 99,3 %]	84,2 (330/392) [80,2 – 87,5 %]	83,9 (329/392) [80,0 – 87,2 %]
	Technicien B	97,7 (383/392) [95,7 – 98,8 %]	85,0 (333/392) [81,1 – 88,2 %]	85,2 (334/392) [81,4 – 88,4 %]
Site 2	Technicien A	96,9 (339/350) [94,5 – 98,2 %]	86,0 (301/350) [82,0 – 89,3 %]	86,9 (304/350) [82,9 – 90,0 %]
	Technicien B	97,7 (342/350) [95,6 – 98,8 %]	86,6 (303/350) [82,6 – 89,8 %]	87,1 (305/350) [83,2 – 90,3 %]
Site 3	Technicien A	98,47 (386/392) [96,7 – 99,3 %]	88,3 (346/392) [84,7 – 91,1 %]	88,5 (347-392) [85,0 – 91,3 %]
	Technicien B	98,2 (385/392) [96,4 – 99,1 %]	88,0 (345/392) [84,4 – 90,9 %]	87,5 (343/392) [83,9 – 90,4 %]

La combinaison des trois sites a permis d'obtenir le schéma d'accord suivant :

	Accord de schéma Nombre/Total des échantillons	Pourcentage d'accord (%)	95 % CI
Méthode A contre méthode B	2221/2268	98,0	97,3-98,4 %
Méthode A vs méthode C	1958/2268	86,3	84,9-87,7 %
Méthode B vs méthode C	1962/2268	86,5	85,0-87,9 %

Les échantillons positifs par l'une ou l'autre méthode sur chaque site ont été titrés jusqu'au point de terminaison et interprétés par les trois méthodes. Les échantillons qualitativement positifs par les trois méthodes sur un site donné ont pu être comparés pour vérifier la concordance des points finaux. Sur le site 1, 156 échantillons ont été titrés jusqu'au point de terminaison. Sur le site 2, 133 échantillons ont été titrés jusqu'au point de terminaison et sur le site 3, 154 échantillons ont été titrés jusqu'au point de terminaison. Considérant qu'il y avait deux techniciens sur chaque site pour lire à la fois la méthode A et la méthode B, cela a donné 886 fois des comparaisons dans les déterminations des points finaux entre la méthode A et la méthode B, la méthode A

et la méthode C et la méthode B et la méthode C. Le nombre de fois où ces déterminations des points finaux correspondaient l'une à l'autre plus ou moins une dilution de deux fois est illustré dans le tableau ci-dessous:

Accord sur les titres combinés (tous les sites/tous les techniciens)			
Interprétation	[± 1 dilution]/Total des échantillons	Pourcentage d'accord (%)	95 % CI
Méthode A vs. méthode B	880/886	99,32	98,53 - 99,69 %
Méthode A vs. méthode C	879/886	99,21	98,38 - 99,62 %
Méthode B vs. méthode C	880/886	99,32	98,53 - 99,69 %

Cette comparaison montre que la détermination du point final entre les méthodes est élevée et qu'il y a eu très peu de cas où la dilution du point final déterminée par une méthode a donné une dilution du point final supérieure à ± une dilution par une autre méthode.

Dans l'ensemble, ces données démontrent que le schéma d'appel automatique identifié par diFine® (méthode C) est en accord avec la méthode A et/ou la méthode B (méthodes d'identification de schéma non automatisées) pour la plupart des échantillons. Toutefois, il incombe toujours à l'opérateur formé de prendre la décision finale.

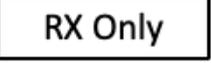
RÉFÉRENCES

- Barnett EV: Mayo. Clin. Proc. 44:645, 1969.
- Burnham TK, Fine G, Neblett TR: Ann. Int. Med. 63:9, 1966.
- Casals SP, Friou GJ, Meyers LL: Arthritis Rheum. 7:379, 1964.
- Condemni JJ, Barnett EV, Atwater EC, et al: Arthritis Rheum. 8:1080, 1965.
- Dorsch CA, Gibbs CB, Stevens MB, Shelman LE: Ann. Rheum. Dis. 28:313, 1969.
- Dubois EL: J. Rheum. 2:204, 1975.
- Alarcon-Segovia D, Fishbein E: J. Rheum. 2:167, 1975.
- Friou GJ: J. Clin. Invest. 36:890, 1957.
- Friou GJ, Finch SC, Detre KD: J. Immunol. 80:324, 1958.
- Coons AH, Creech H, Jones RN, et al: J. Immunol. 80:324, 1958.
- Barnett EV, North AF, Condemni JJ, Jacox RF, Vaughn JH: Ann. Stagiaire. Med. 63:100, 1965.
- Lachman PJ, Kunkel HG: Lancet 2:436, 1961.
- Friou GJ: Arthritis Rheum. 7:161, 1964.
- Beck JS: Scot. Med. J. 8:373, 1963.
- Anderson JR, Gray KG, Beck JS, et al: Ann. Rheum. Dis. 21:360, 1962.
- Luciano A, Rothfield NF: Ann. Rheum. Dis. 32:337, 1973.
- Harmon C, Deng JS, Peebles CL, et al: L'importance du substrat tissulaire dans le système antigène-anticorps SS-A/Ro. Arthritis Rheum. 27:166-173, 1984.
- Peebles CL, Molden DP, Klipple GL, Nakamura RM: Anticorps dirigé contre l'histone H3 qui produit un schéma immunofluorescent de type variable large tacheté (VLS) sur les reins de souris. Arthritis Rheum. 27:S44, 1984.
- Ritchie RF: Anticorps antinucléaires: Leur fréquence et leur association diagnostique. N. Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
- Deng JS, Sontheimer RD, Gilliam JN: Relations entre les anticorps antinucléaires et les anticorps anti-Ro/SS-A dans le lupus érythémateux cutané subaigu. J. Am. Acad. Dermatol. 11:494-499, 1984.
- Meyer O, Hauptmann G, Tappeiner G, Ochs HD, Mascart-Lemone F: Déficit génétique en C4, C2 ou C1q et syndromes lupiques. Association avec des anticorps anti-Ro(SSA). Clin. Exp. Immunol. 62:678-684, 1985.
- Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Déficit homozygote en C2, lupus érythémateux et anticorps anti-Ro(SS-A). Arthritis Rheum. 26:1279-1282, 1983.
- Speirs C, Fielder AHL, Chapel H, et al: Protéine C4 du système du complément et susceptibilité au lupus érythémateux systémique induit par l'hydralazine. Lancet 1:922-924, 1989.
- Watson RM, Scheel JN, Petri M, et al: Syndrome du lupus érythémateux néonatal: Analyse des allotypes et des gènes C4 dans 18 familles. Medicine 71:84-95, 1992.
- Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: Arthritis Rheum. Vol. 23 No. 6:617, 1980.
- Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, et al: N. Engl. J. Med. 263:769, 1960.
- Pollack VE: N. Engl. J. Med. 271:165, 1964.
- Raskin J: Arch. Derm. 89:569, 1964.
- Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR: Lancet 2:1188, 1963.
- Procédures de prélèvement d'échantillons sanguins diagnostiques par ponction veineuse - Deuxième édition; norme approuvée (1984). Publié par le Comité national pour les normes de laboratoire clinique.
- Procédures pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
- Beck JS: Lancet, 1:1203, 1961.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, et al: Am. J. Med. 52:48, 1972.

34. Burnham TK, Neblett TR, Fine G:Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
35. Manuel d'immunopathologie, Vol II, P Miescher et HJ Muller-Eberhard (Eds), Glune & Stratton, NY, 1969.
36. Wittingham S. Irvin J, Mackay IR, et al:Aust. Ann. Med. 18:130, 1969.
37. Département du travail des États-Unis, administration de la sécurité et de la santé au travail : Exposition professionnelle aux agents pathogènes transmissibles par le sang, règle finale. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
38. Procédures pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang pour les tests de laboratoire courants ; lignes directrices approuvées - 4e édition (2010). Document GP44-A4 du CLSI (ISBN 1-56238-724-3). Institut des normes cliniques et de laboratoire, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.
39. Barton, S., Murray, J., Gastroenterol Clin North Am. 2008 Juin ; 37(2) : 411-vii. doi:10.1016/j.gtc.2008.02.001
40. Weisbart RH, Colburn K. Effet des corticostéroïdes sur les anticorps antinucléaires sériques chez l'homme. Immunopharmacologie. 1984 Oct;8(2):97-101. doi : 10.1016/0162-3109(84)90048-1. PMID : 6334672.

GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Les symboles suivants **peuvent** avoir été utilisés dans l'étiquetage de ce produit.

Symbole	Description	Symbole	Description
	Fabricant		Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Dispositif médical de diagnostic in vitro .		Conformité avec la directive 98/79
	Numéro de catalogue		Verre de protection
	Suffisant pour n tests		Lame de substrat
	Code du lot		Tampon PBS
	Utilisation par		Milieu de montage
	Limites de la température de stockage		Conjugué
	Uniquement sur ordonnance		ANA (homogène) Contrôle positif
	Consulter le mode d'emploi électronique		Contrôle négatif
	Stocker en position verticale		Fabriqué aux États-Unis



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Numéro gratuit (États-Unis) : 1-800-286-2111, option 2
 International : +1 908-526-3744
 Fax : +1 908-526-2058
 Site internet : www.zeusscientific.com

Pour le service client américain, contactez votre distributeur local.

Pour l'assistance technique aux États-Unis, contactez ZEUS Scientific, appelez le numéro gratuit ou envoyez un mail

À l'adresse support@zeusscientific.com.

Pour le service client et l'assistance technique en dehors des États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.

©2019 ZEUS Scientific. Tous droits réservés.



EMERGO EUROPE
 Westervoortsedijk 60
 6827 AT Arnhem
 The Netherlands