

# CytoBead® ANCA Order no. 8063 – C€

Évaluation de la technique en tant que  
diagnostic rapide.

---

Camille ROUVET

Interne pharmacie – 2ème semestre

DES D'IMMUNOLOGIE

CHU Angers – Mr Chevaller

15 octobre 2014

---

# Sommaire

- Partie I : Introduction
    - Les ANCA ou ACPN et les anti-MBG
    - Diagnostic
    - Dépistage et identification
    - Prise en charge rapide d'un ANCA
    - Résultats des 88 sérums de demandes d'ANCA pour diagnostic rapide
  - Partie II : Présentation du système CytoBead®ANCA
  - Partie III : Matériels et méthodes
  - Partie IV : Résultats et interprétations
  - Partie V : Conclusion
-

---

# Partie I

---

## Introduction

# Les ANCA ou ACPN et les anti-MBG

- Auto-anticorps Anti-Cytoplasme des Polynucléaires Neutrophiles
  - Enzymes intra-granulaires : MPO, PR3...
- Marqueurs diagnostiques et évolutifs :
  - Spécificité > 95 % (association IFI + phase solide)
  - Sensibilité variable
- Auto-anticorps anti-Membrane Basale Glomérulaire
- Performance du test :
  - Spécificité (99,7 %)
  - Forte VPP (87,2 %)

---

# Diagnostic

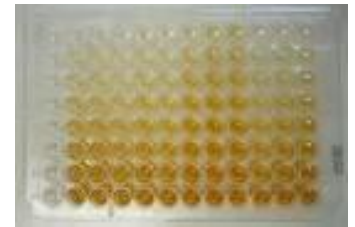
- Pronostic vital
  - Syndrome pneumo-rénal
    - Glomérulonéphrite rapidement progressive
    - Hémorragie intra-alvéolaire
      - ⇒ GN avec anti-MBG (ex Goodpasture)
      - ⇒ vascularite à ANCA (MPA, GPA [ex Wegener])
  - Infarctus mésentérique
- Pronostic fonctionnel
  - Insuffisance rénale

Traitement rapide par corticoïdes ± immunosuppresseurs  
→ diagnostic rapide

---

# Dépistage et identification

- Dépistage : 1ère intention
  - IFI sur PNN humains (pour ANCA)
    - Fixation par l'éthanol : 3 aspects de fluorescence (obligatoire)
    - Autres fixateurs : formol, méthanol,
    - Autre substrat : cellule HEp-2 (AAN)
  - IFI sur coupe de rein de singe (pour anti-MBG)
- Identification : tests de phase solide (obligatoire si dépistage positif)
  - Elisa, Immunodot et Multiplexage

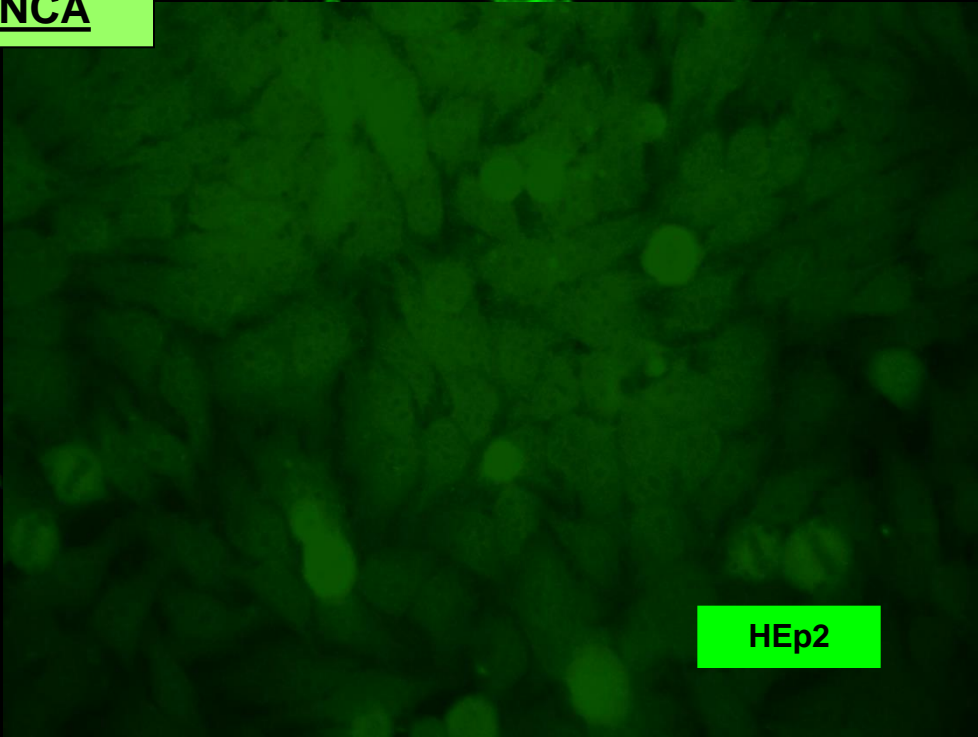


FORMOL-ACETONE

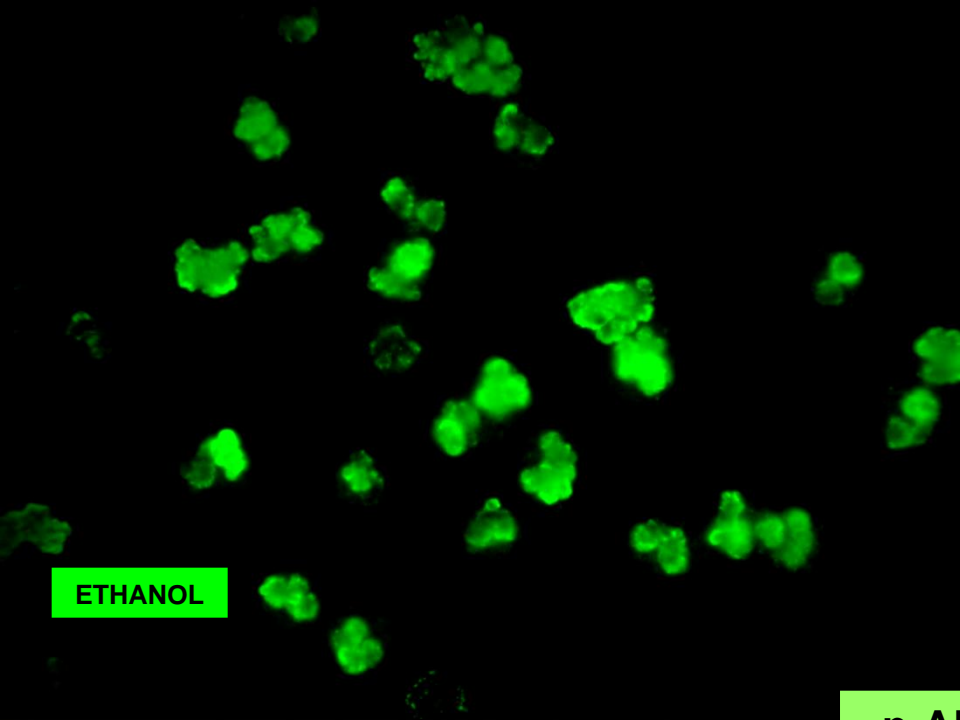
ETHANOL

c-ANCA

METHANOL

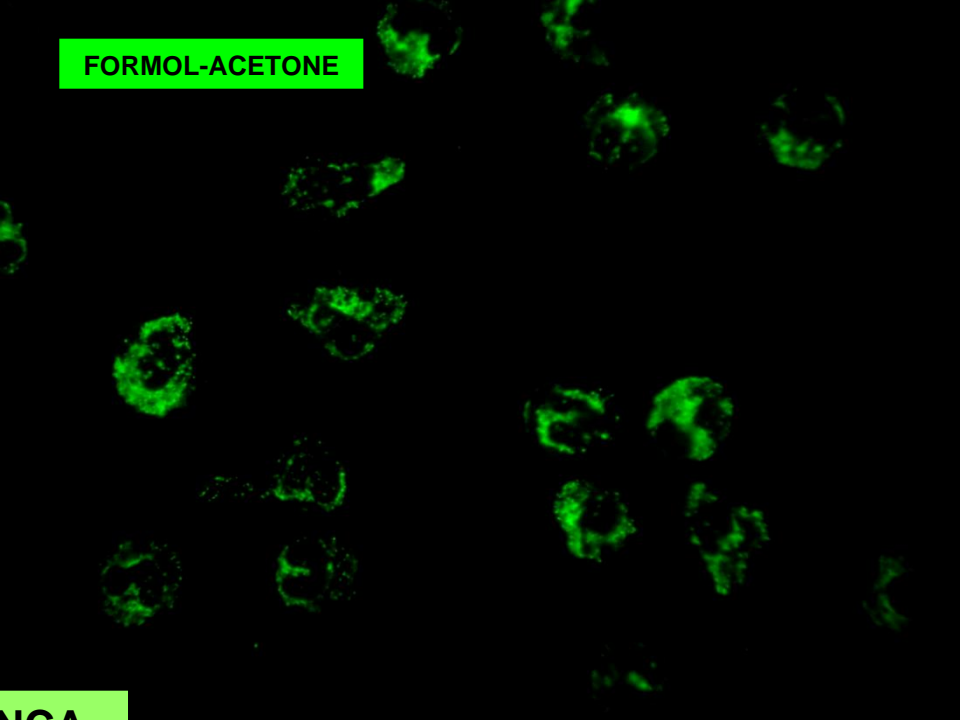


HEP2



ETHANOL

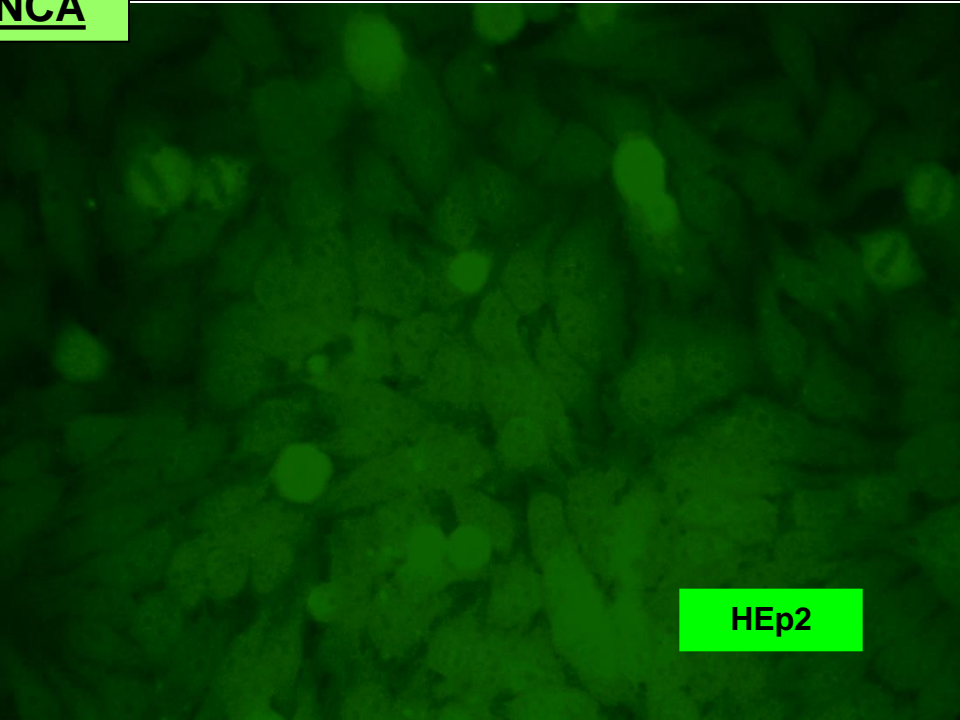
FORMOL-ACETONE



p-ANCA

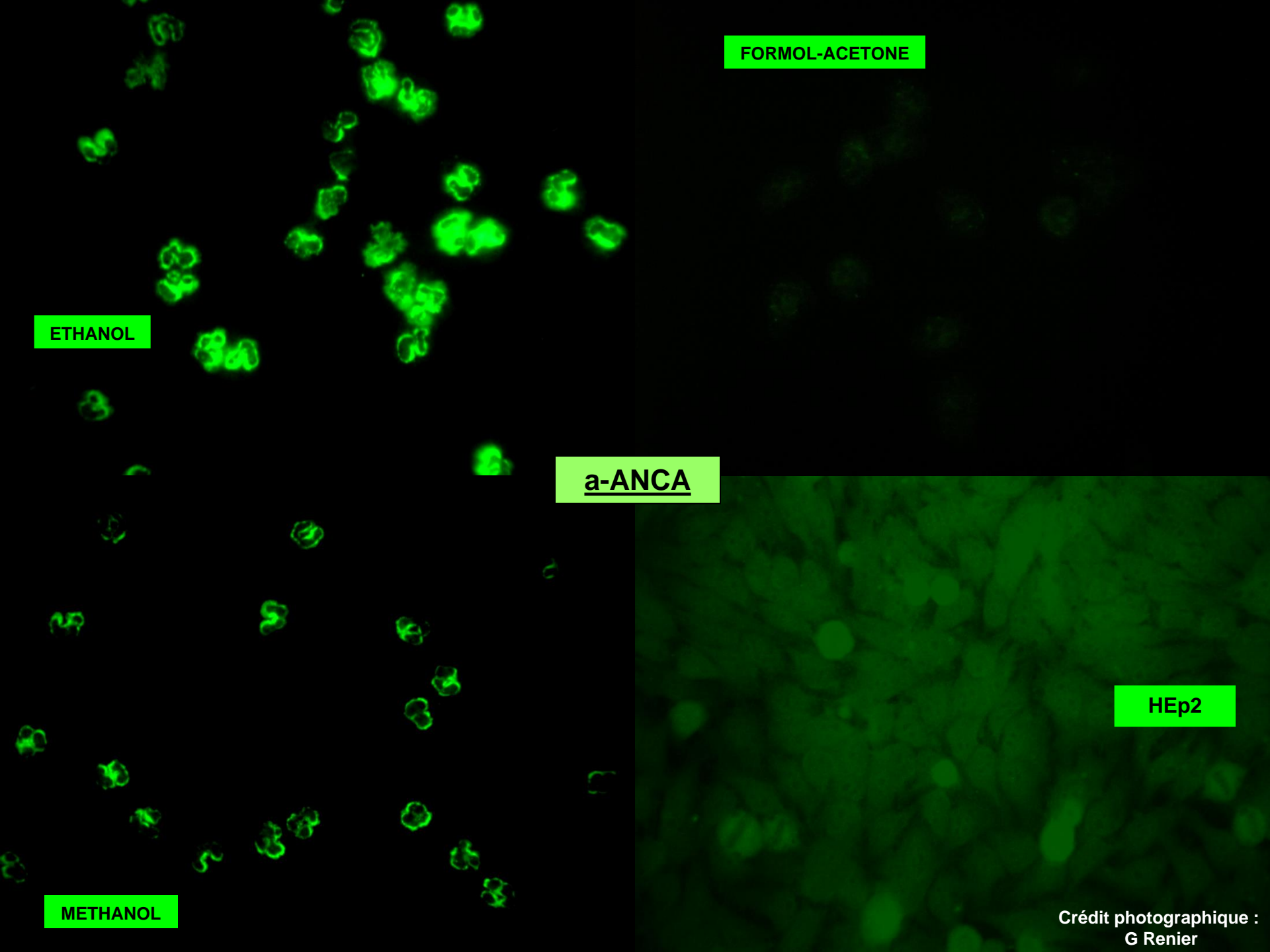


METHANOL



HEp2





FORMOL-ACETONE

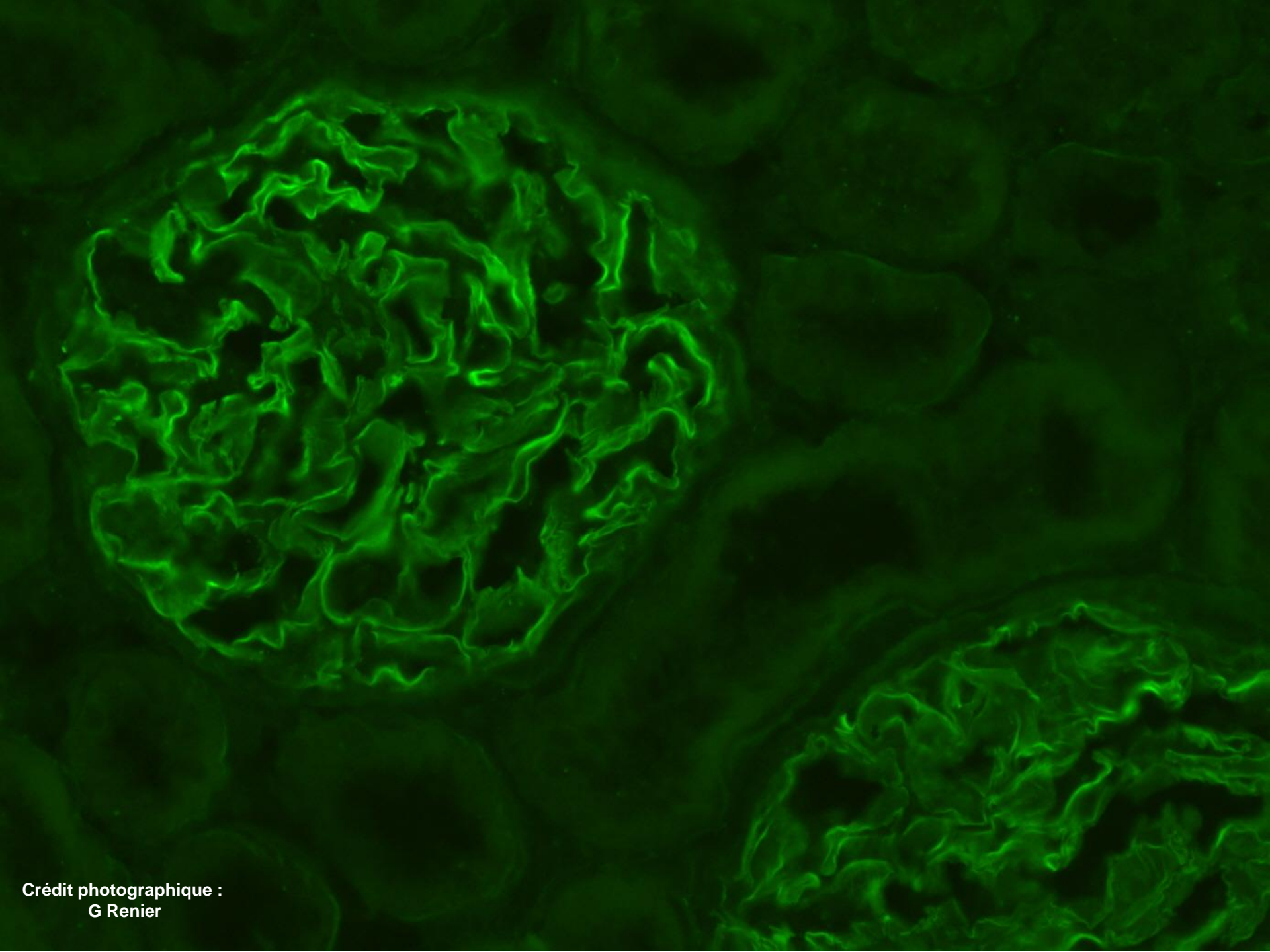
ETHANOL

a-ANCA

HEp2

METHANOL

Crédit photographique :  
G Renier



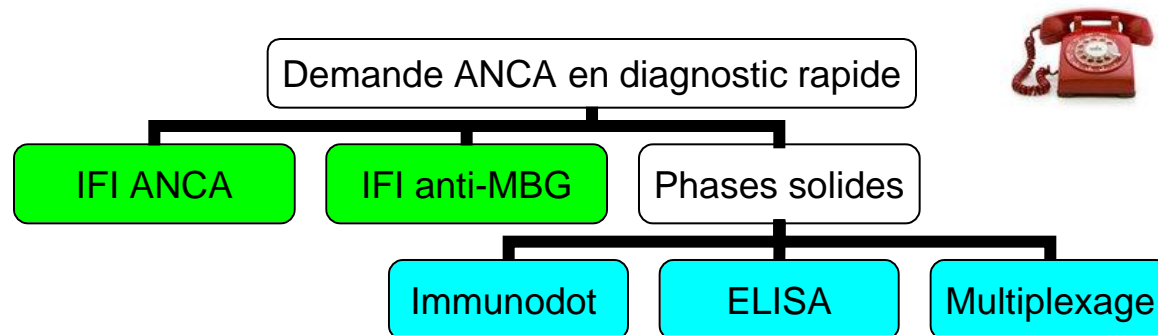
Crédit photographique :  
G Renier

# Prise en charge d'un ANCA pour diagnostic rapide

- **Recommandations HAS<sup>1</sup> :**

IF + ELISA (indispensable si IF positive), voire par immunocapture,  
Éléments diagnostiques supplémentaires

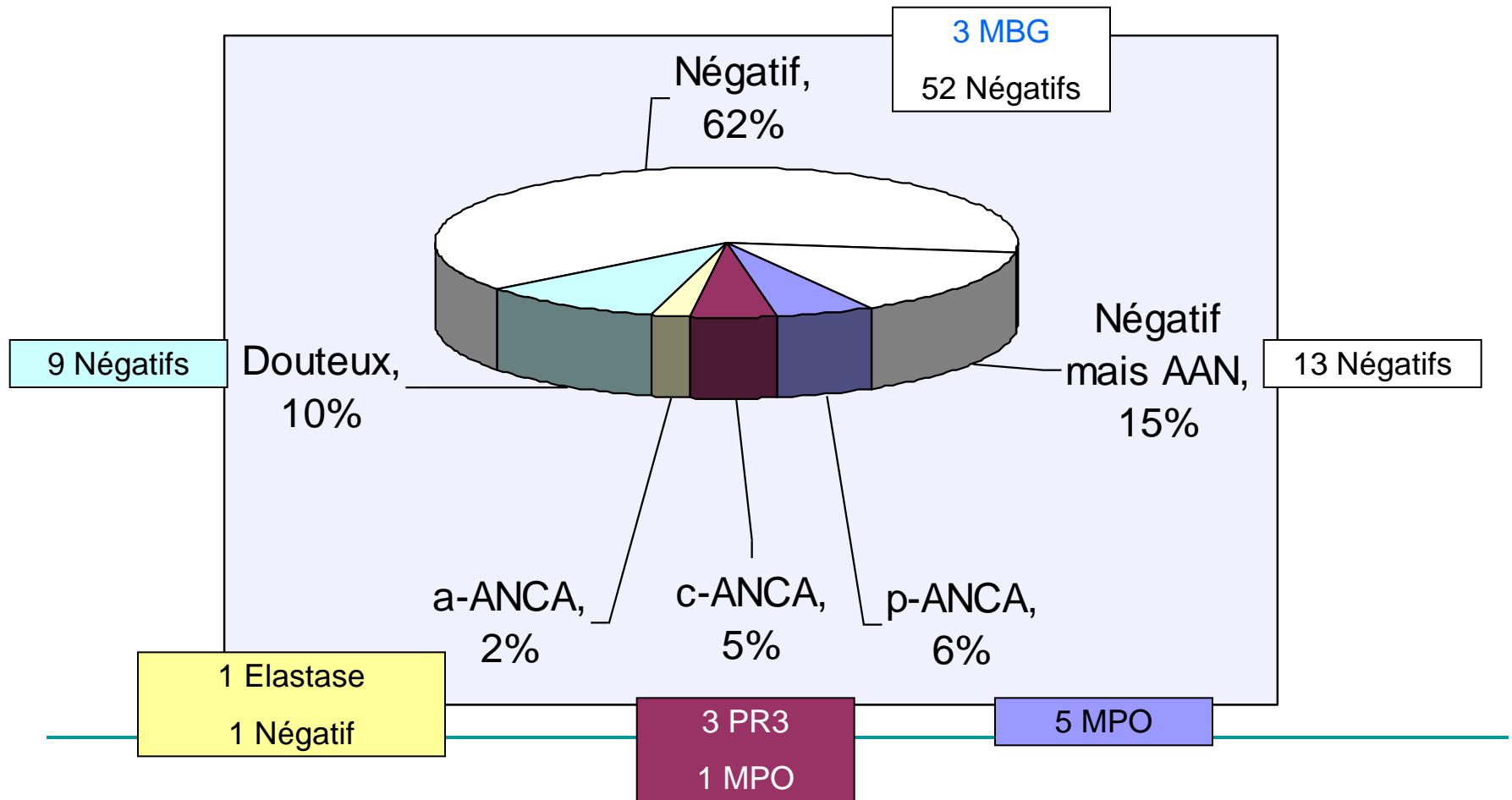
- **Prise en charge au CHU d'Angers<sup>2</sup> (depuis janvier 2005) :**



<sup>1</sup>HAS. Guide – Affection de longue durée, Vascularites nécrosantes systémiques, Protocole national de diagnostic et de soins. [document électronique]. 2007, [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/guidepnds\\_ald21\\_vascularites\\_web\\_2007\\_11\\_28\\_\\_15\\_00\\_22\\_773.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/guidepnds_ald21_vascularites_web_2007_11_28__15_00_22_773.pdf)

<sup>2</sup> C.Poli et al. Evaluation de le pratique en urgence de la recherche des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. 8ème Colloque Geai 2014. RFL 464bis: p29-35

# Résultats des 88 sérums d'ANCA de diagnostic rapide au CHU d'Angers (2010 à 2014)



---

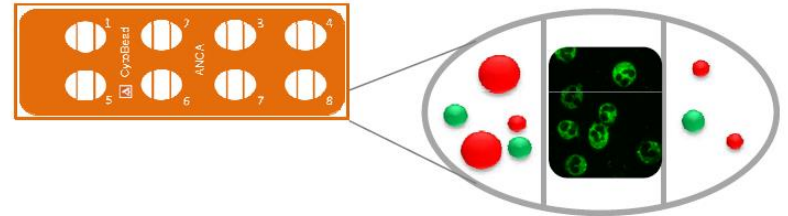
# Partie II

---

Présentation du système CytoBead® ANCA

# Principe

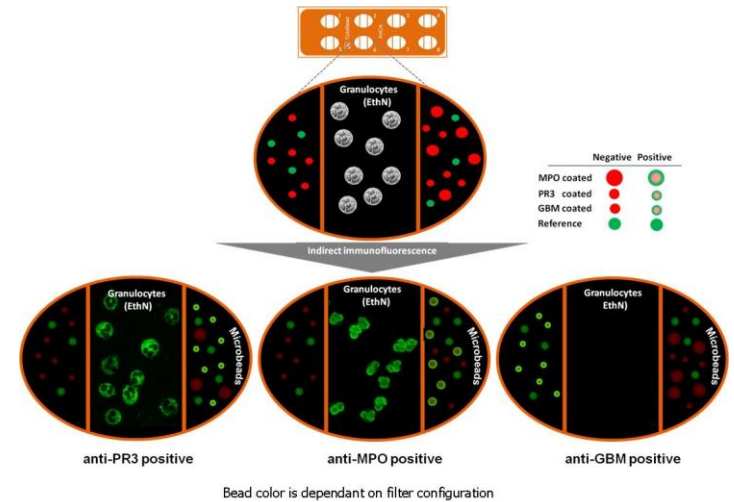
- Rapide et facile
- Combinaison du dépistage et de l'identification dans un seul puits
- Test d'immunofluorescence indirecte
- Détermination qualitative et semi-quantitative (titrage)



# Description de la lame

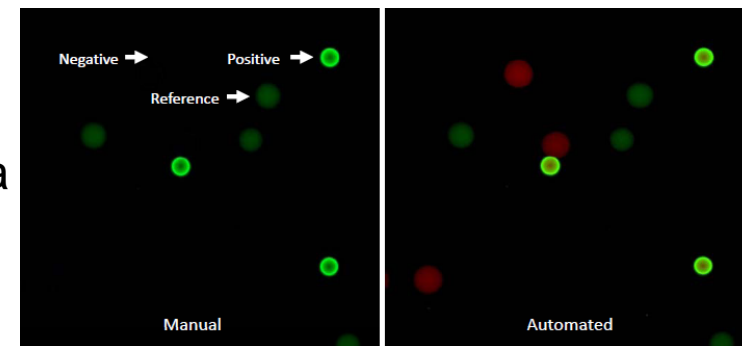
## ■ Au centre → Dépistage

- PNN humains
- Fixation par l'éthanol
  - Cytoplasmique (c-ANCA)
  - Péri-nucléaire (p-ANCA)
  - Atypique (a-ANCA)



## ■ Sur les côtés → Identification

- Identification des cibles par IFI
- Les billes revêtues d'antigènes permettent la mesure d'anticorps spécifiques de PR3, MPO et MBG
- Antigènes natifs purifiés



# Procédure

- Dilution des sérums
- Incubation des sérums → Réaction Ag/AC spécifique
- Lavage : les composants non liés sont éliminés
- Incubation avec un IgG anti-humain conjugué couplé avec la fluorescence molécule AlexaFluor® 488 → réaction spécifique
- Lavage : les molécules conjuguées en excès sont éliminées
- Montage des lames
- Lecture sous un microscope à fluorescence (longueur d'onde d'excitation 490 nm, longueur d'onde d'émission 520 nm).

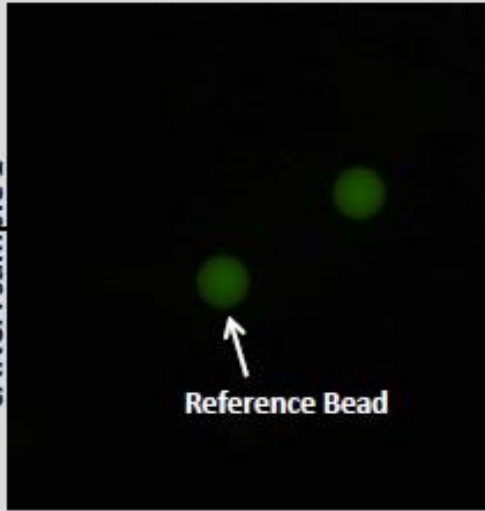


**Temps total = 1h40**  
**(< 2h pour 5 lames)**

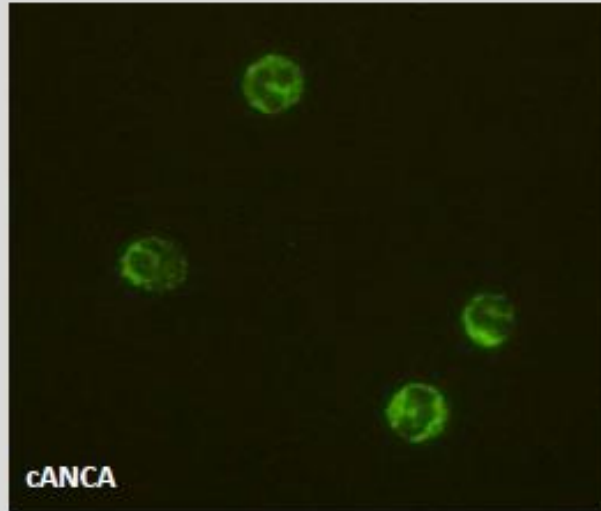


cANCA; PR3 positive

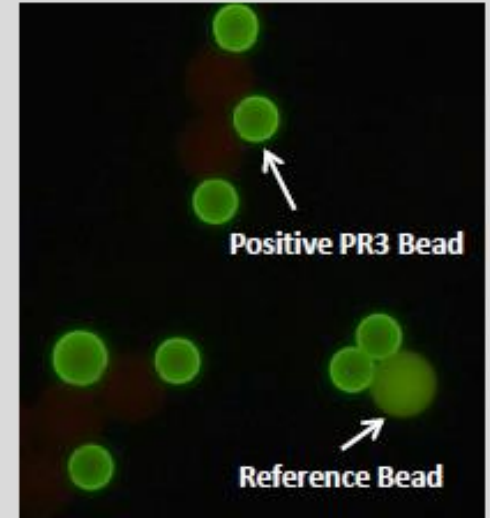
cANCA sample 1



GBM Beads

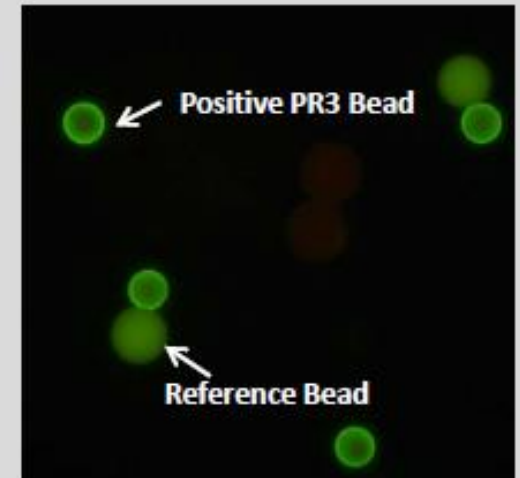
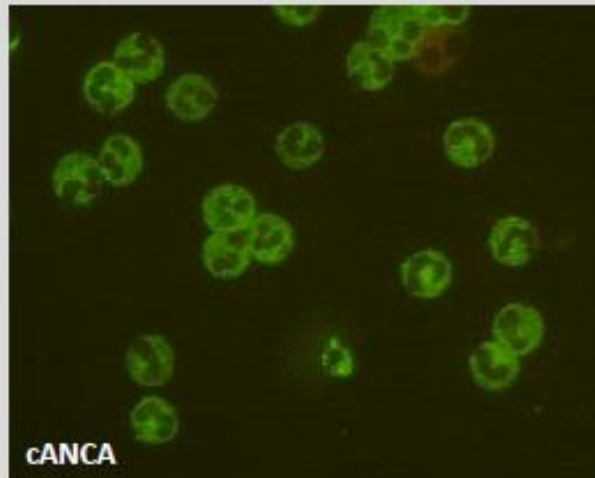
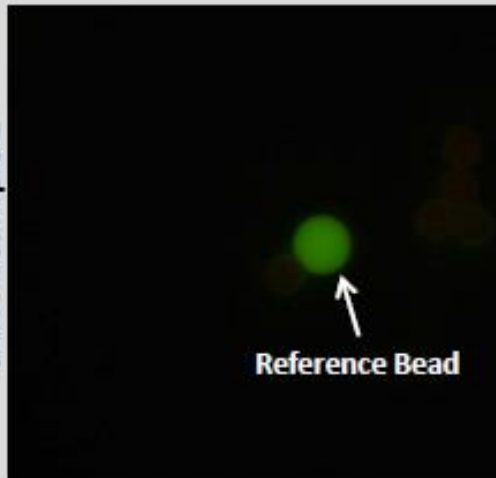


EtOH fixed Granulocytes



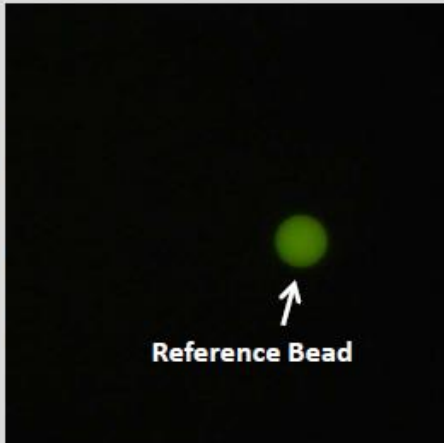
MPO + PR3 Beads

cANCA sample 2

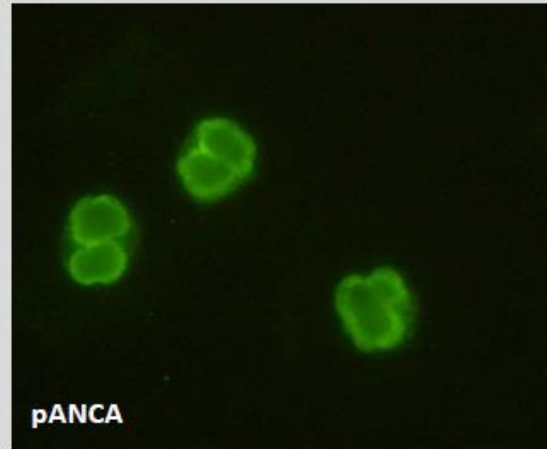


pANCA; MPO positive

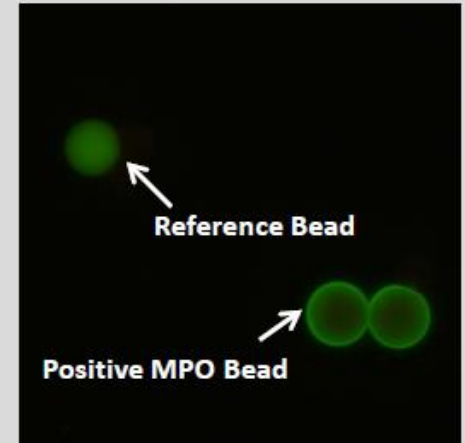
pANCA sample 1



GBM Beads

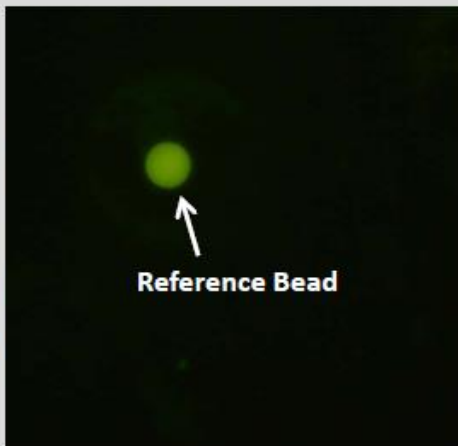


EtOH fixed Granulocytes

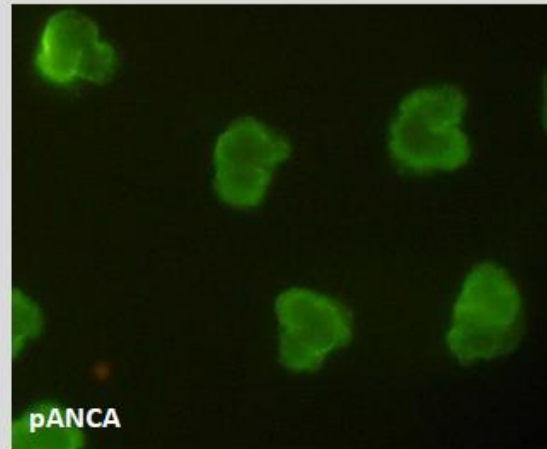


MPO + PR3 Beads

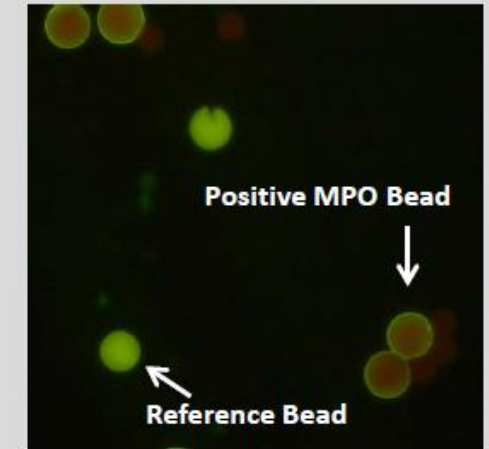
pANCA sample 2



Reference Bead



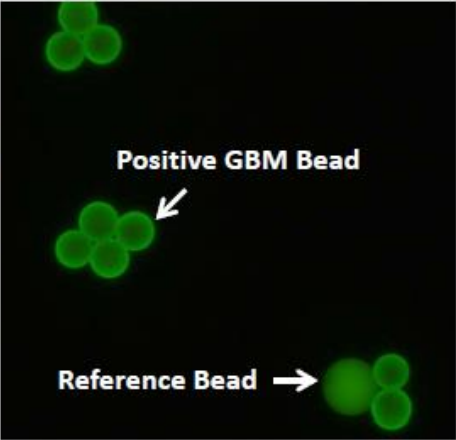
pANCA



Reference Bead

**GBM positive**

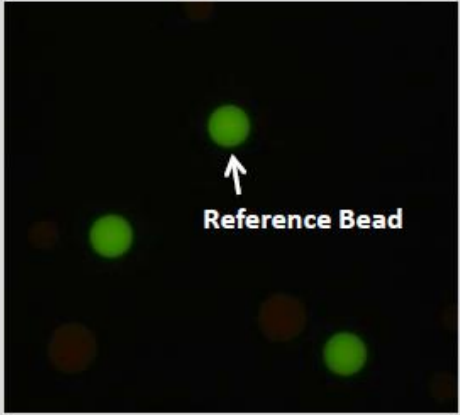
GBM sample 1



**GBM Beads**

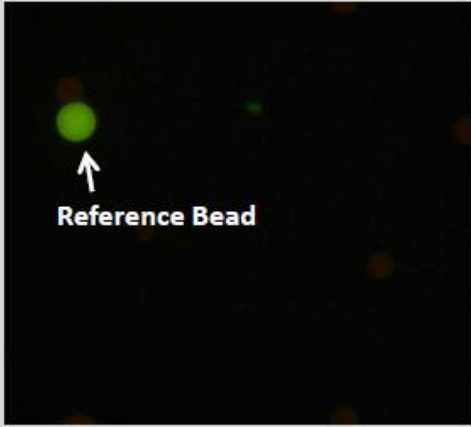
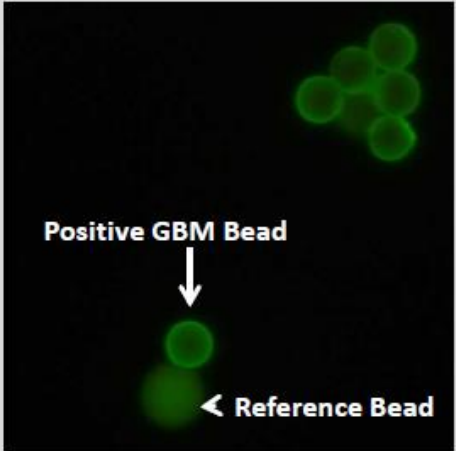


**EtOH fixed Granulocytes**



**MPO + PR3 Beads**

GBM sample 2



---

# Partie III

---

Matériels et méthodes

# Matériels et méthodes



## ■ Objectif de l'étude

- **Évaluer** la technique CytoBead® ANCA, en tant que technique de diagnostic rapide.

## ■ Méthode

- Méthode unicentrique (CHU d'Angers) rétrospective (de 2010 à 2014).
- Cohorte de 100 sérums.
- Calcul des taux de concordance, spécificité et sensibilité relatives.

## ■ Matériels

### □ CHU d'Angers

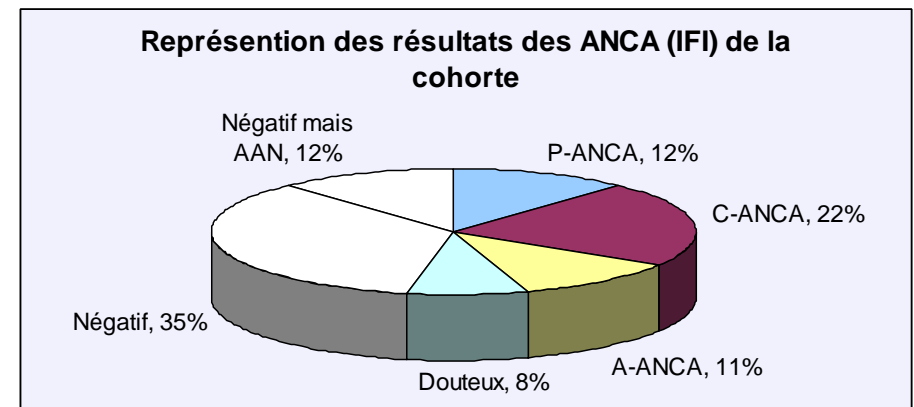
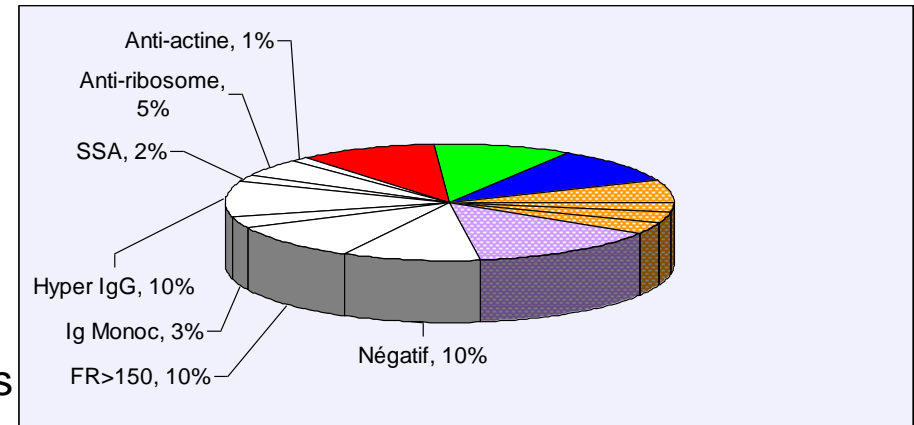
- Dépistage par IFI,
  - Kit granulocytes mosaïque 12, Euroimmun®.
  - Fixation par éthanol, formol et méthanol.
  - Anti-Ig humaines-FITC (anti Ig-G).
- Identification des cibles par
  - Immunodot BlueDot (D-tek),
  - Elisa Anca-profile Euroimmune®
  - Immunocap (Phadia-Thermofisher),
  - Multiplexage Bioplex2200 (Biorad).

### □ Kit CytoBead®ANCA (réf 8063) fourni par GA Generic Assays

- Dépistage et identification par IFI, les neutrophiles sont fixés par éthanol.

# Présentation de la cohorte

- 10 sérums **MPO** positif\*
- 10 sérums **PR3** positif\*
- 10 sérums **MBG** positif\*
- 12 sérums ayant une **autre** cible\*
  - Lactoferrine (LF), Elastase (EL), BPI et cathepsine G (CatG)
- 13 sérums **multi-spécifiques** ou discordants
- 45 sérums négatifs :
  - 10 sérums négatifs
  - 10 sérums négatifs avec un FR > 150 UI/mL
  - 10 sérums négatifs avec une hyper IgG
  - 3 sérums négatifs avec une Ig monoclonale
  - 5 sérums avec un SSA positif
  - 5 sérums avec un Ac anti-ribosome
  - 2 sérums avec un Ac anti-actine



\*A taux faibles, moyens et forts.

---

# Partie IV

---

Résultats et interprétations

# Analyse ergonomique du test

	<b>CytoBead® Anca*</b>	<b>IFI Dépistage MBG*</b>	<b>IFI Dépistage ANCA*</b>	<b>Elisa Anca-profile Euroimmune®</b>	<b>Immunodot Vasc-Dot Bluedot D-tek ®</b>	<b>Luminex Bioplex®</b>	<b>Immunocap</b>
<b>Cotation</b>		B40	BHN40	B70	B70	B70	B70
<b>Coût unitaire (avec contrôle)</b>		25,13€**	38,4 €**	25€**	10,5€**	14,4€**	30€**
<b>Temps technique</b>	1h40	1h30	1h30	2h	2h	45 min	2h
<b>Test unitaire</b>	non	non	non	oui	oui	oui	oui
<b>Type de résultat</b>	Qualitatif	Qualitatif	Qualitatif	Quantitatif	Semi- quantitatif	Quantitatif	Quantitatif

\*Sans titrage. \*\* TTC.



# CytoBead®ANCA vs IFI



- Sensibilité relative globale = 94 %
- Spécificité relative globale = 59 %
- Taux de concordance = 74 %
- VPP = 62 %
- VPN = 94 %

IFI		Référence		Total
		+	-	
CytoBead®	+	33	20	53
	-	2	29	31
Total		35	49	84

Attention biais : comparaison éthanol <-> 3 fixateurs !

IFI		Référence					
		p-ANCA	c-ANCA	a-ANCA	négatif	négatif mais AAN	douteux
CytoBead®	p-ANCA	8	3	4		5	
	c-ANCA	4	15	3	10	3	5
	a-ANCA		2	4		2	
	négatif		2		25	2	2
	douteux						1

Faux négatifs

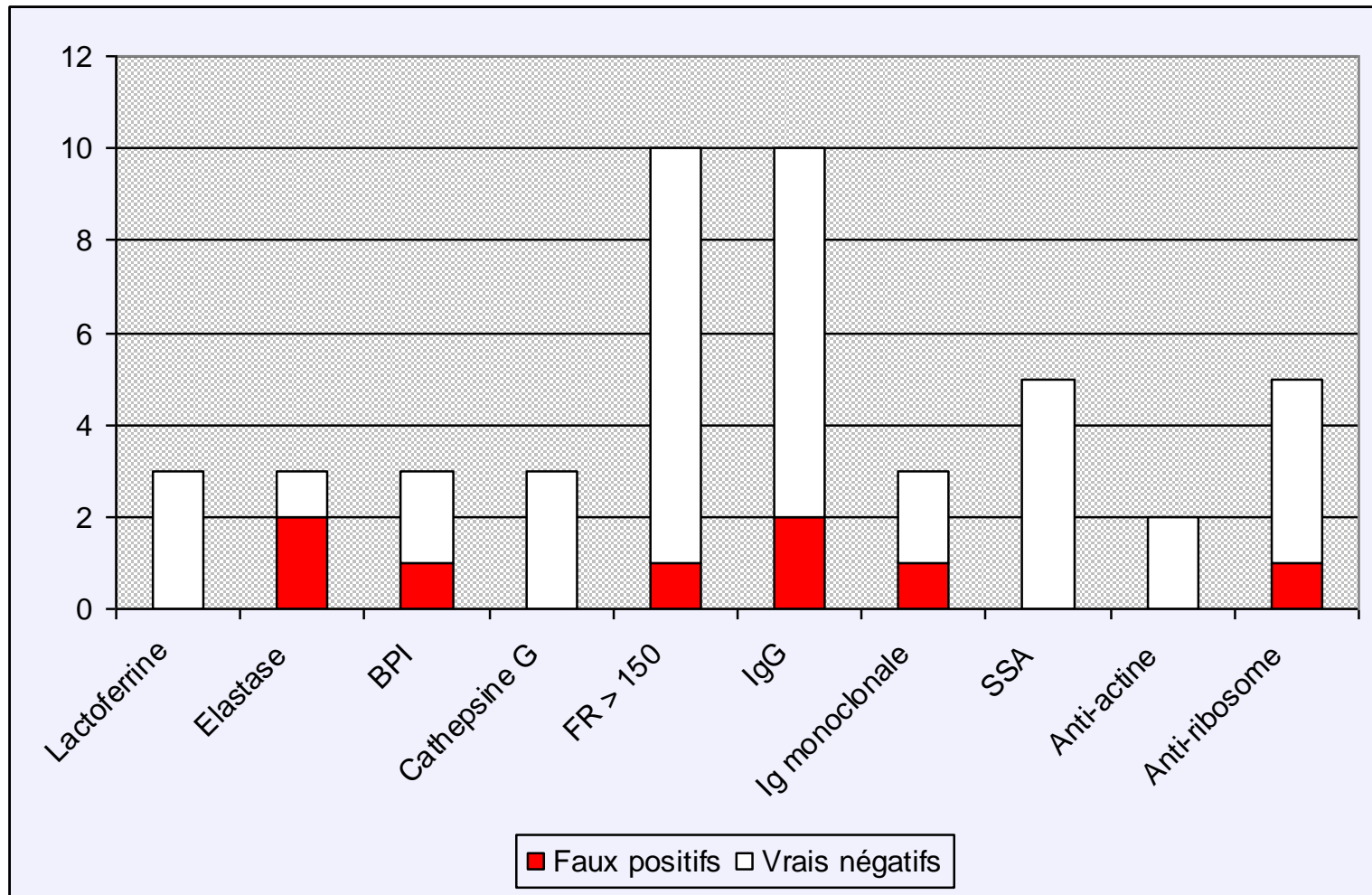
# Avantages et inconvénients IFI



- Même lame
  - Facilité d'interprétation
- Pas de différence selon taux fort, moyen, faible
- Fixation éthanol seulement
  - Pas de différenciation exacte des fluorescences atypiques\*
- Pas de cellules HEp-2
  - Difficulté d'interprétation si présence d'AAN\* (FP)
- Seulement 1 test pour anti-MBG
  - Pas de rein de singe

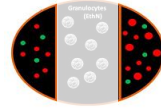
\* Précisé dans la notice.

# Interférences IFI



= 17 % d'interférences parmi les sérums tests « interférences ».

# CytoBead®ANCA vs phase solide



- Sensibilité relative globale = 100%
- Spécificité relative globale = 90%
- Taux de concordance = 90%
- VPP = 98%
- VPN = 100%

Après prise en compte de la		Référence		Total
		+	-	
Identification clinique	+	45	5	50
	-	5	36	41
Total		50	41	91

Identification		Référence					
		MPO	PR3	MBG	Multi-spécifique	Autre cible	
CytoBead®	MPO	10			3	3+2	1
	PR3		10		2		1-1
	MBG			9			
	Multi-spécifique				36	4	11
	négatif					5	1

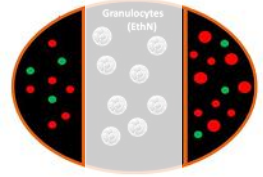
Vrais négatifs

Vrais positifs

Faux négatifs

Faux positifs

# Avantages et inconvénients phase solide



- Même lame
  - Facilité d'interprétation
- Pas de différence selon taux fort, moyen, faible
- Seulement 3 cibles
  - Mais les plus fréquentes et les plus pathogéniques\*
- Difficulté d'interprétation dans certains cas des billes
  - Expérience du lecteur requise

\* Précisé dans la notice.

---

# Partie V

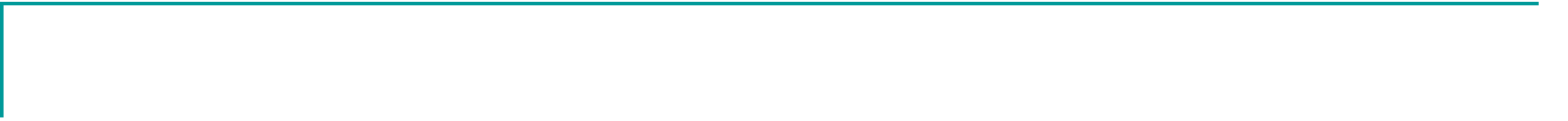
---

Conclusion

---

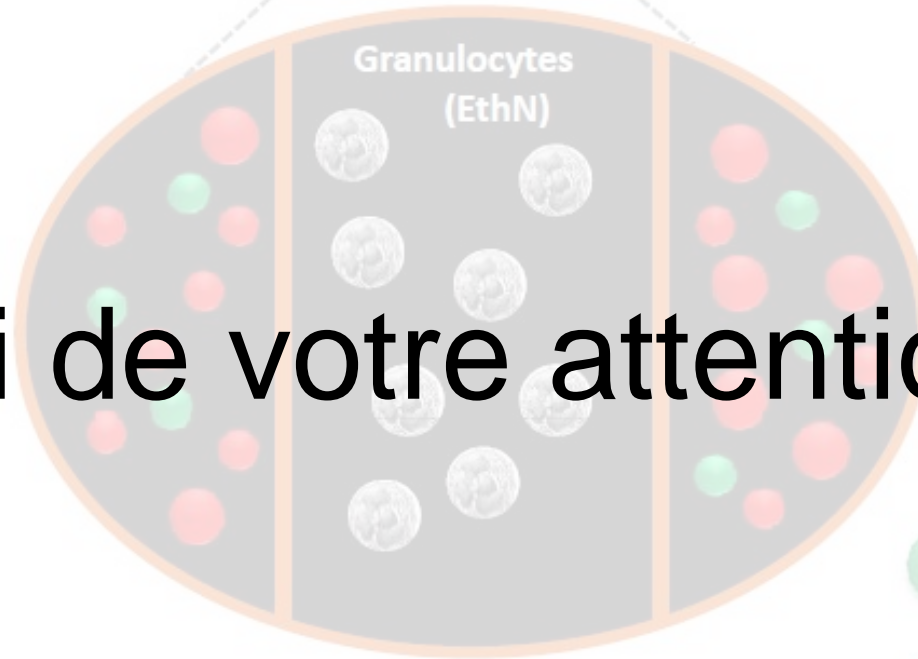
# Conclusion

- Facilité, praticabilité
  - Sensibilité satisfaisante (> 94%)
  - Spécificité trop faible pour l'IFI
    - Augmenter le seuil ?
    - Autre fixation
  - Interférences nombreuses
  - Personnel qualifié
- Outil utilisable pour le diagnostic rapide  
Mais à associer à d'autres tests...
-





CytoBead Assay-  
Rapid Progressive  
Glomerulonephritis



Merci de votre attention !

- Reference bead
- GBM bead
- dsDNA bead

- Reference bead
- PR3 bead
- MPO bead

Merci à Laetitia et Christophe pour les statistiques Glims !