

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

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

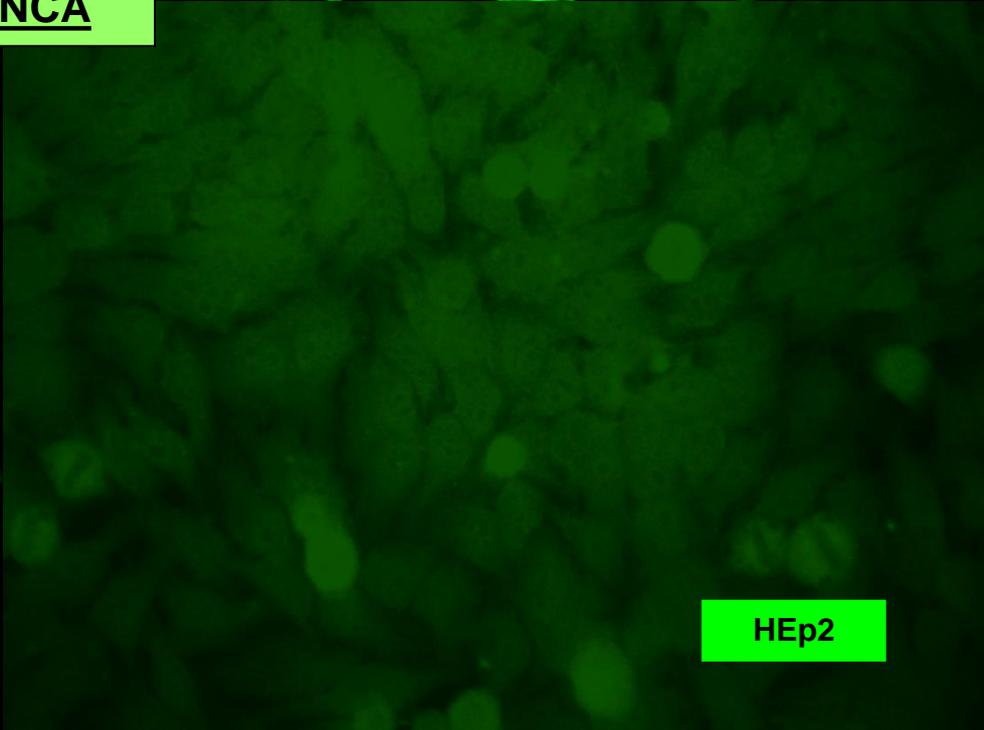


FORMOL-ACETONE

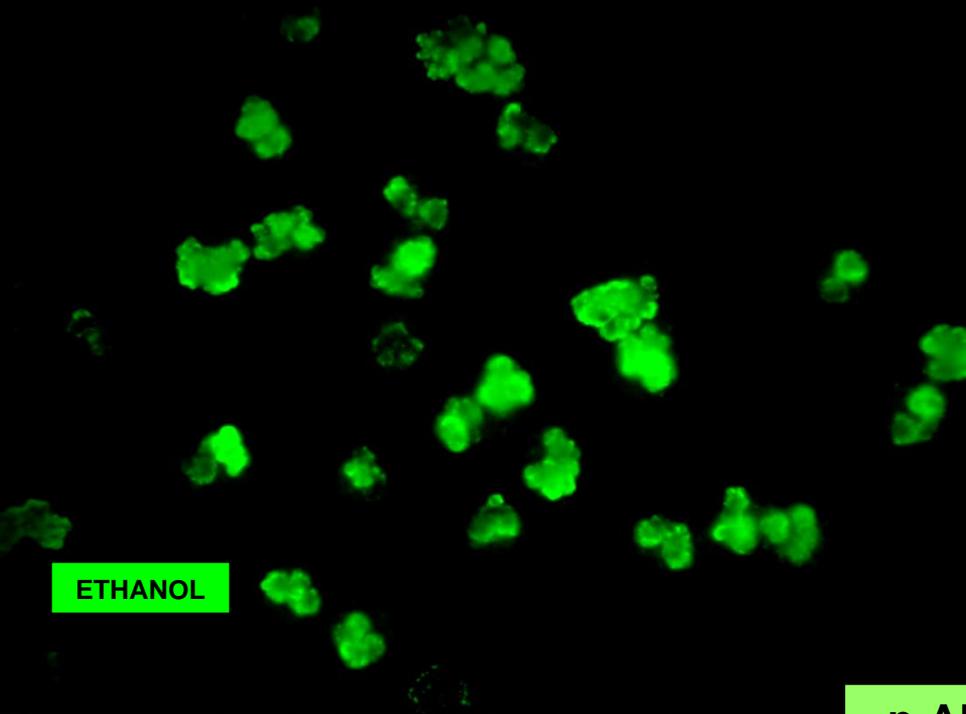
ETHANOL

c-ANCA

METHANOL

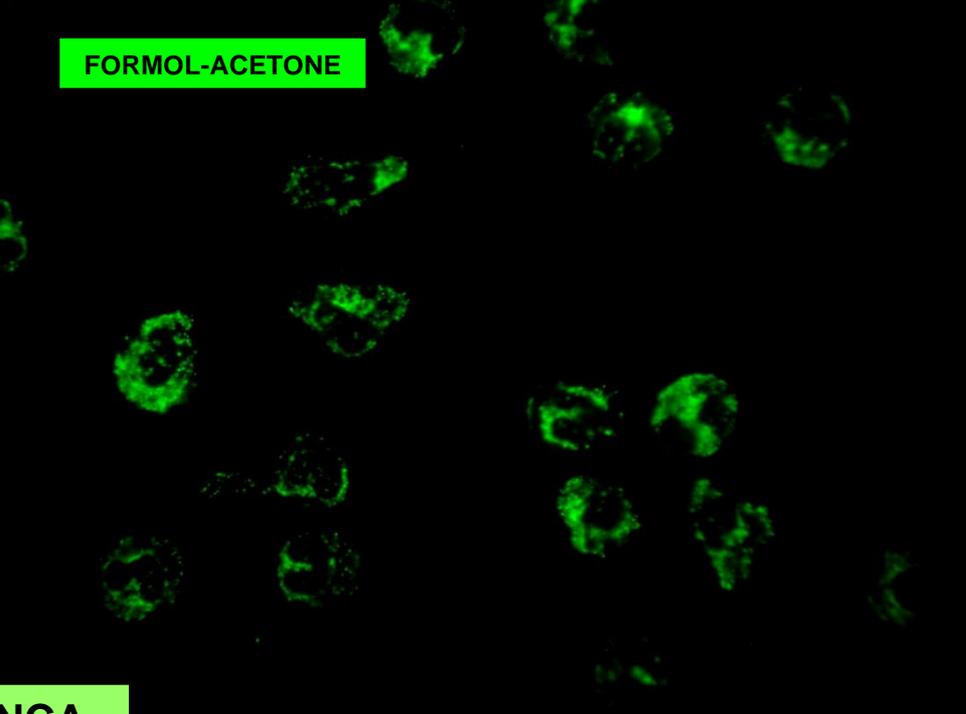


HEp2



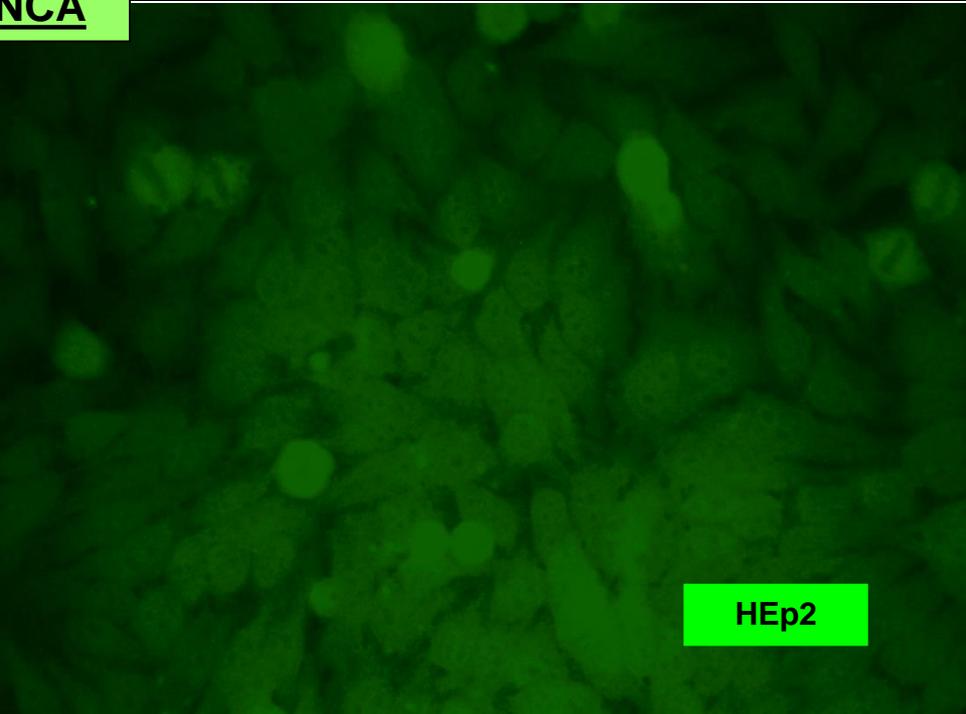
ETHANOL

FORMOL-ACETONE

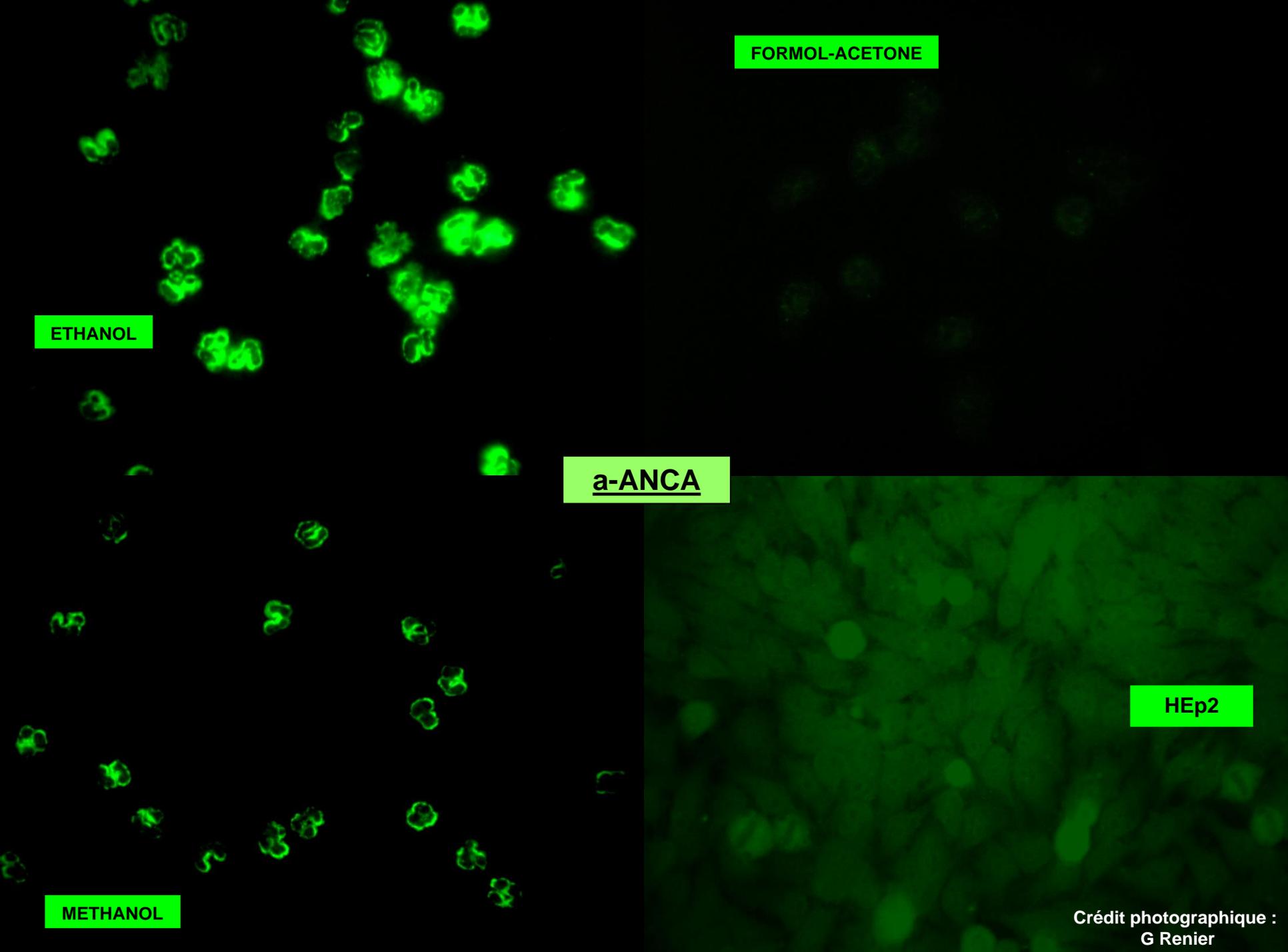


p-ANCA

METHANOL



HEp2



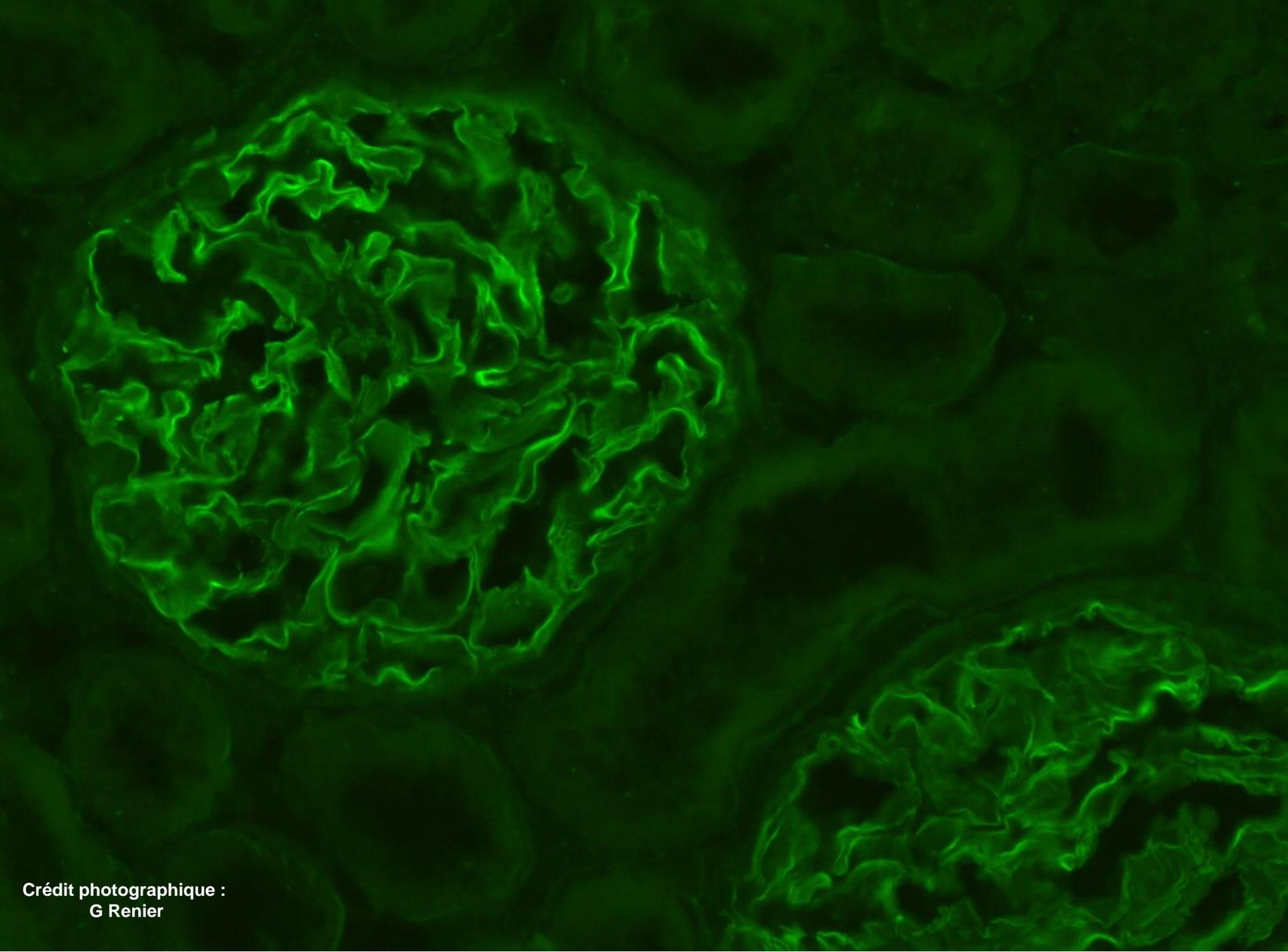
FORMOL-ACETONE

ETHANOL

a-ANCA

HEp2

METHANOL



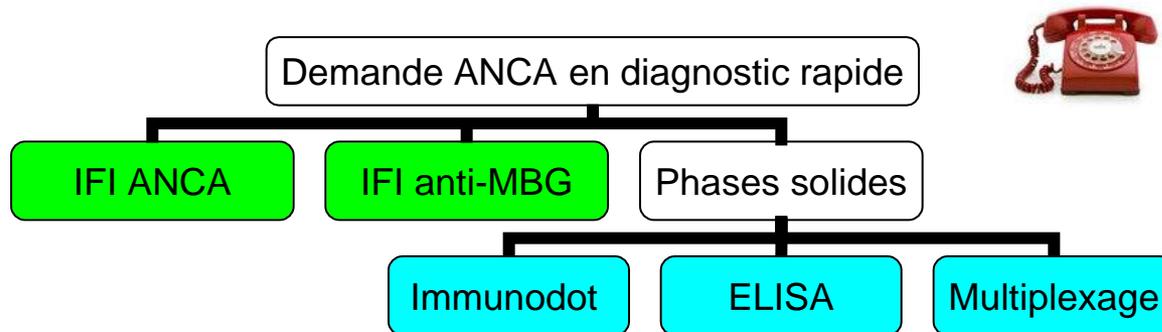
Crédit photographique :
G Renier

Prise en charge d'un ANCA pour diagnostic rapide

- **Recommandations HAS¹ :**

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

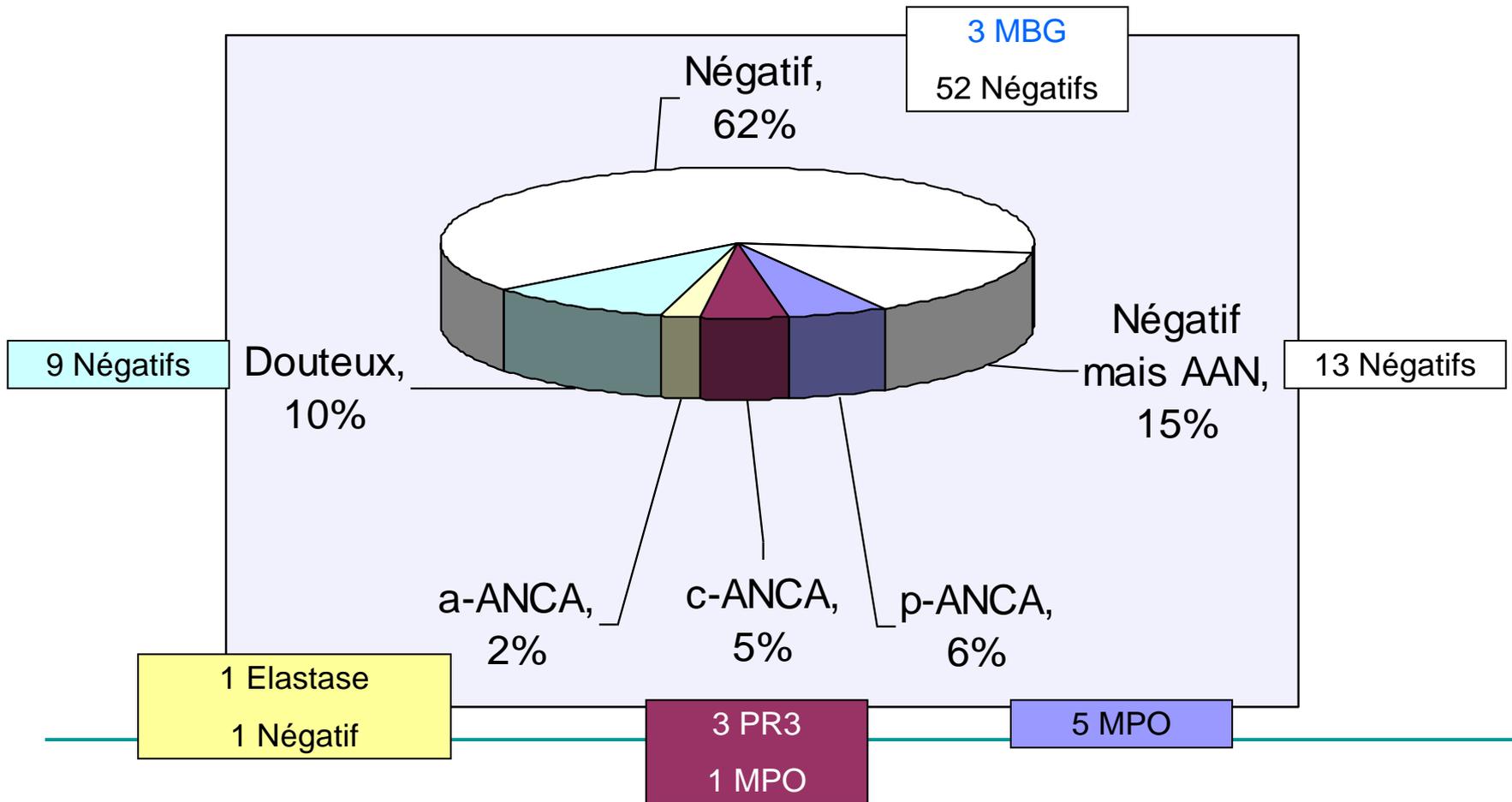
- **Prise en charge au CHU d'Angers² (depuis janvier 2005) :**



¹HAS. 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

² C.Poli et al. Evaluation de la 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)

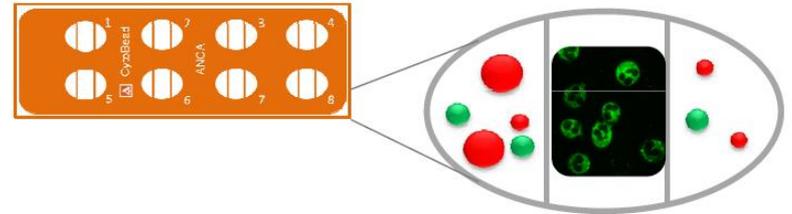


Partie II

Présentation du système CytoBead® ANCA

Principe

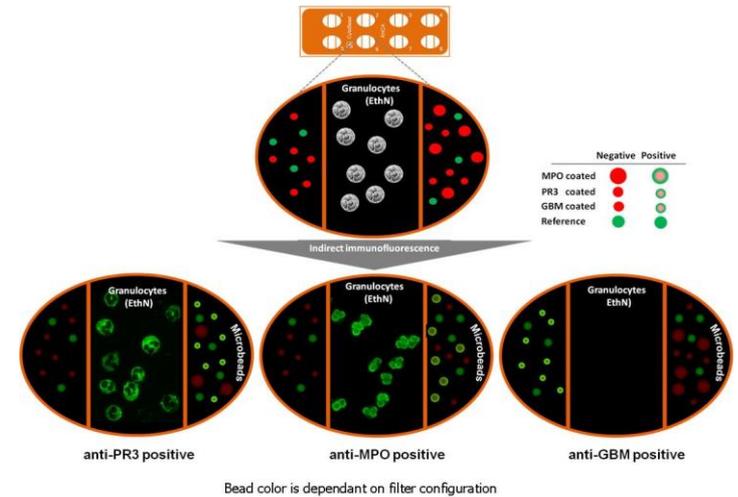
- Rapide et facile
- Combinaison du dépistage et de l'identification dans un seul puits
- Test d'immunofluorescence indirecte
- Détermination qualitative et semi-quantitative (titrage)



Description de la lame

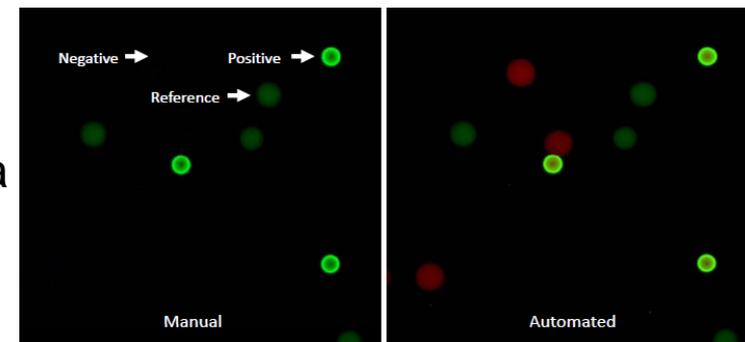
■ Au centre → Dépistage

- 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

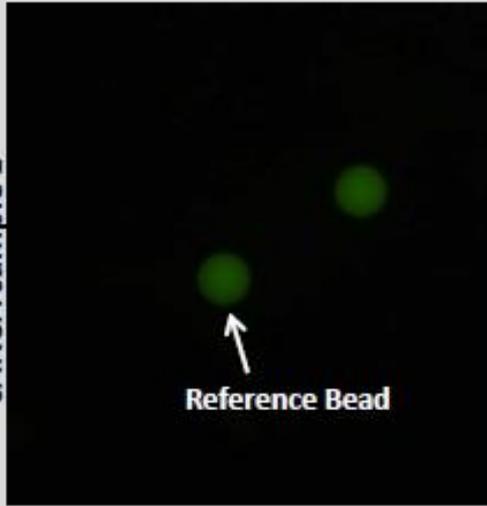
- Dilution des sérums
- Incubation des sérums → Réaction Ag/AC spécifique
- Lavage : les composants non liés sont éliminés
- Incubation avec un IgG anti-humain conjugué couplé avec la fluorescence molécule AlexaFluor® 488 → réaction spécifique
- Lavage : les molécules conjuguées en excès sont éliminées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



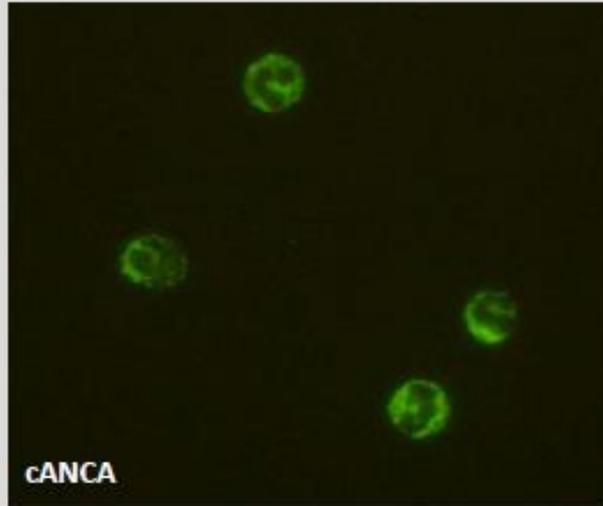
Temps total = 1h40
(< 2h pour 5 lames)

cANCA; PR3 positive

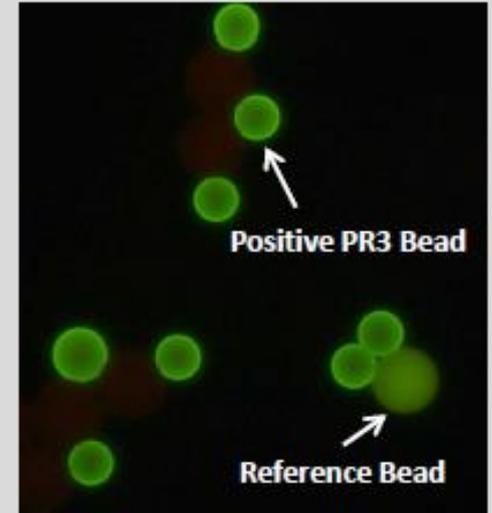
cANCA sample 1



GBM Beads

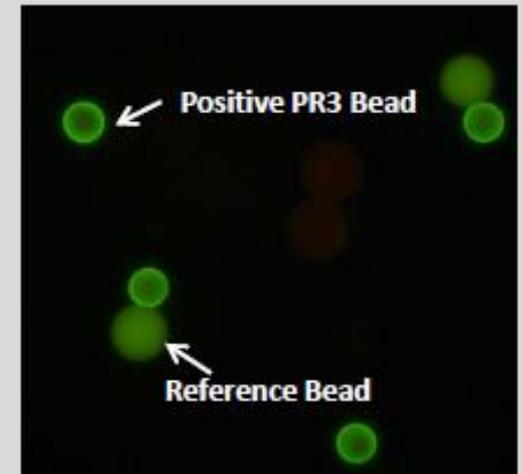
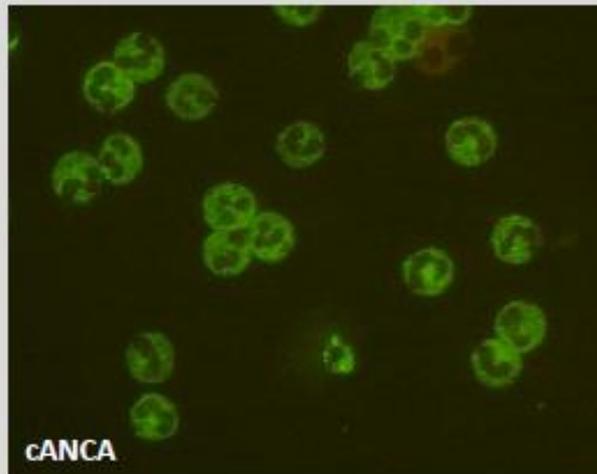
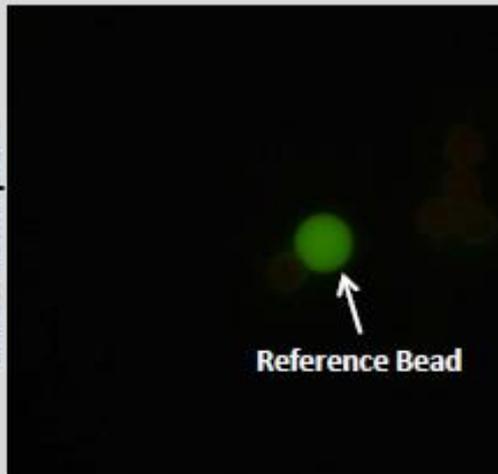


EtOH fixed Granulocytes



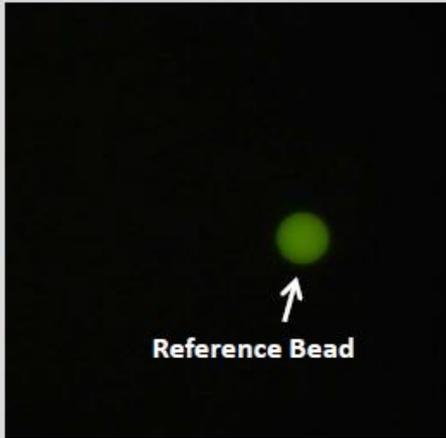
MPO + PR3 Beads

cANCA sample 2

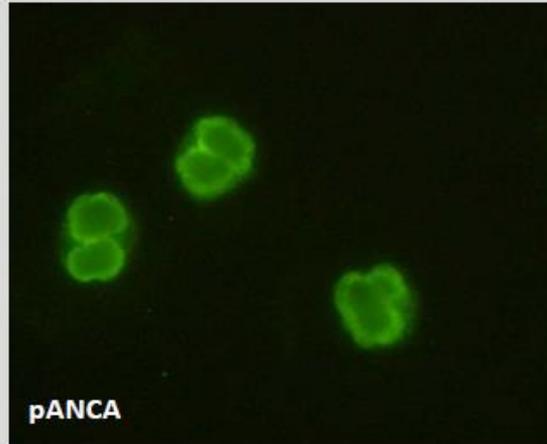


pANCA; MPO positive

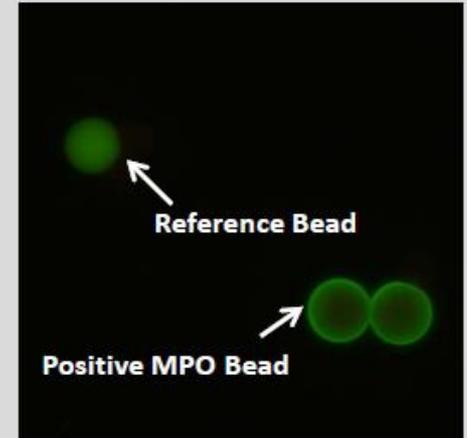
pANCA sample 1



GBM Beads

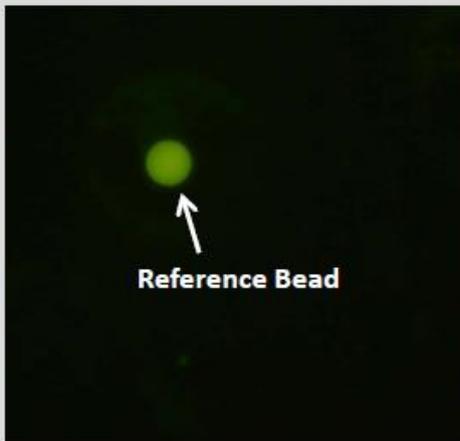


EtOH fixed Granulocytes

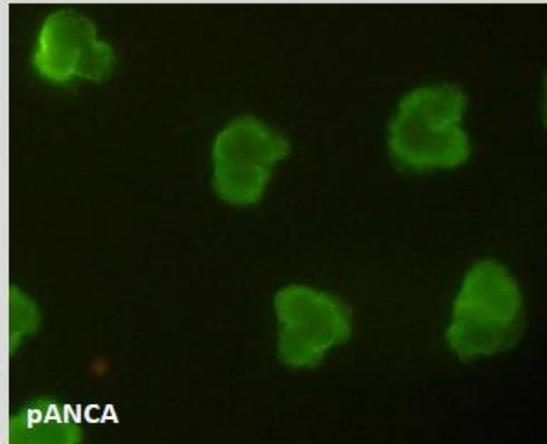


MPO + PR3 Beads

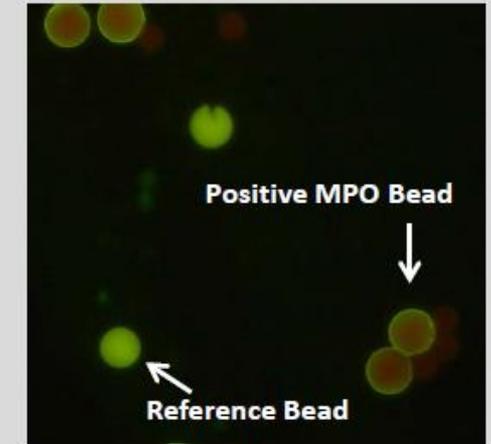
pANCA sample 2



Reference Bead



pANCA

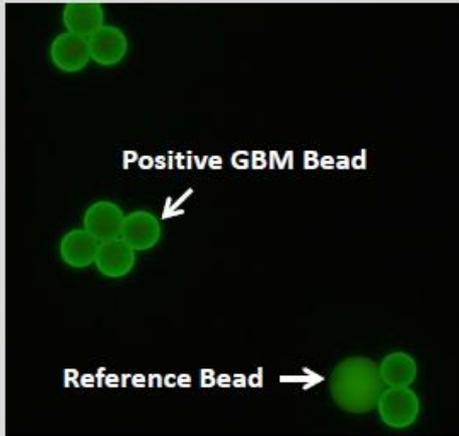


Positive MPO Bead

Reference Bead

GBM positive

GBM sample 1



GBM Beads

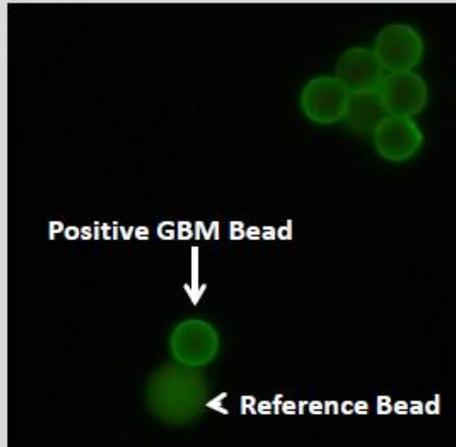


EtOH fixed Granulocytes



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

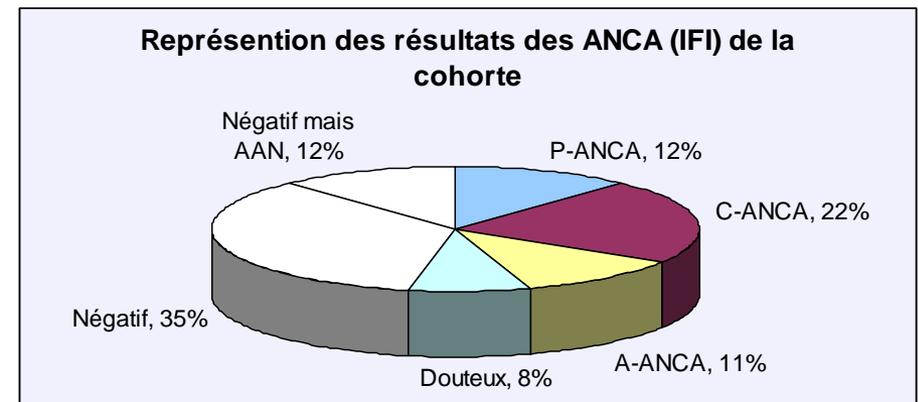
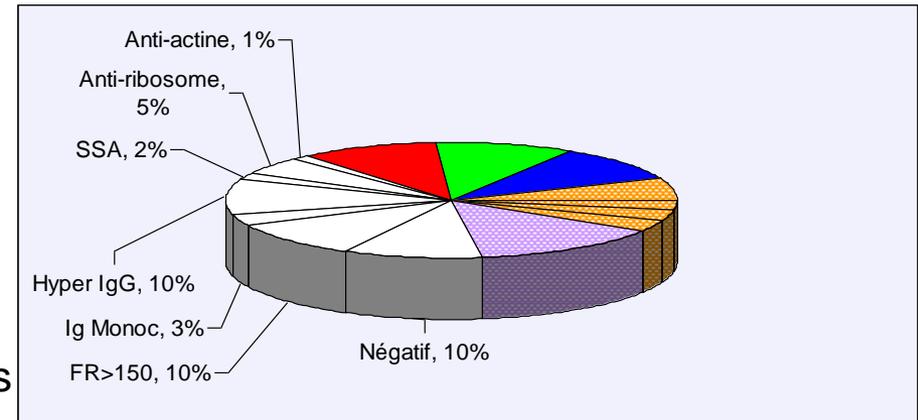
- Dépistage par IFI,
 - Kit granulocytes mosaïque 12, Euroimmun®.
 - Fixation par éthanol, formol et méthanol.
 - Anti-Ig humaines-FITC (anti Ig-G).
- Identification des cibles par
 - Immunodot BlueDot (D-tek),
 - Elisa Anca-profile Euroimmune®
 - Immunocap (Phadia-Thermofisher),
 - Multiplexage Bioplex2200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

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

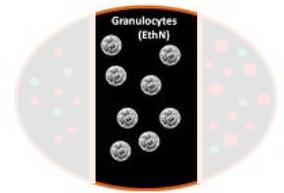
IFI		Référence		Total
		+	-	
CytoBead®	+	33	20	53
	-	2	29	31
Total		35	49	84

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

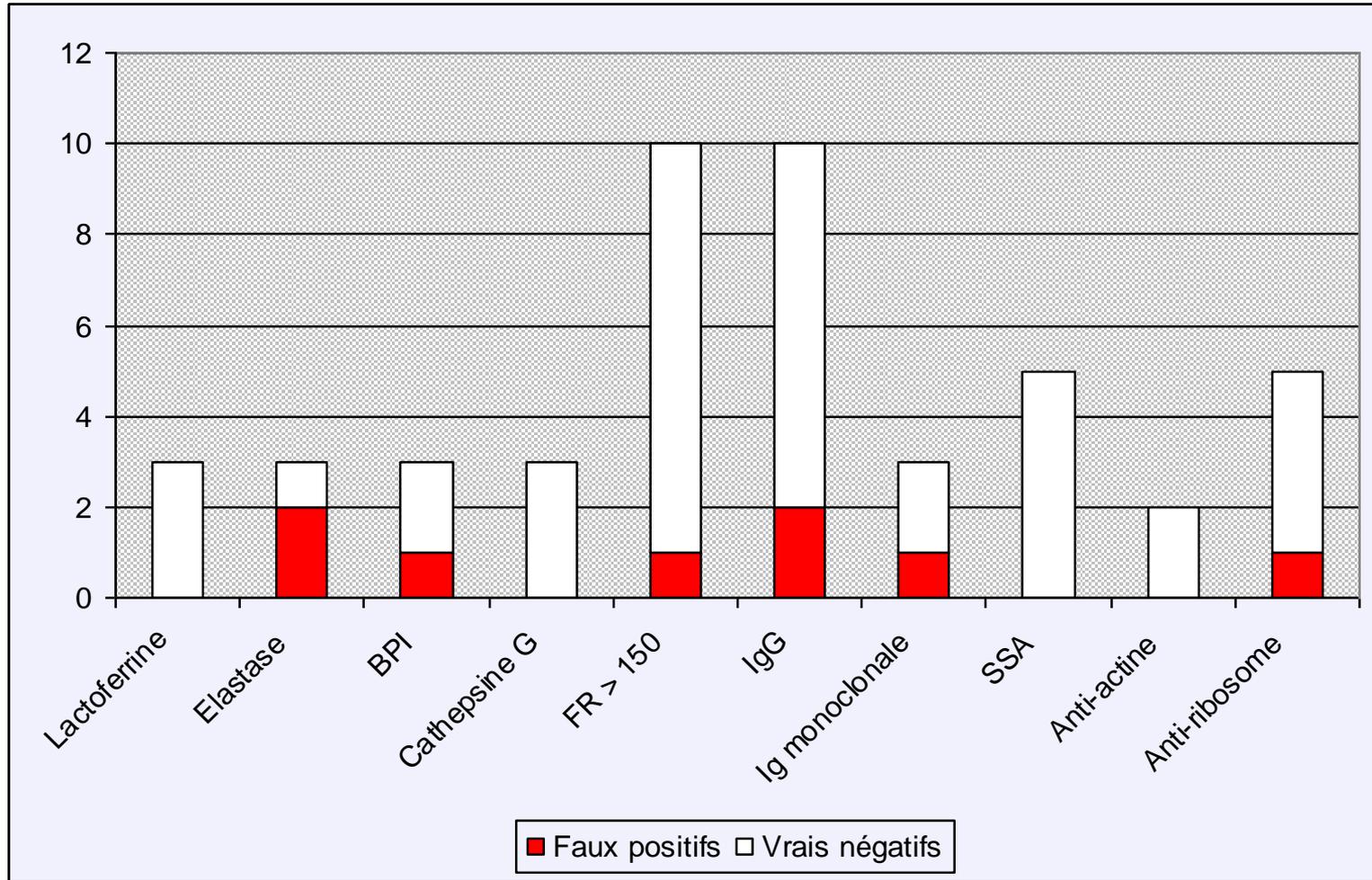
Avantages et inconvénients IFI



- 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

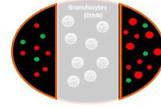
* Précisé dans la notice.

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 clinique		Référence		Total
		+	-	
Identification	+	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			
	négatif			1	36	4	11
	Multi-spécifique					5	1

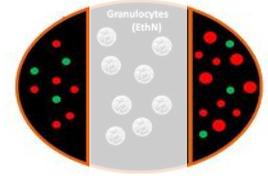
Vrais négatifs

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

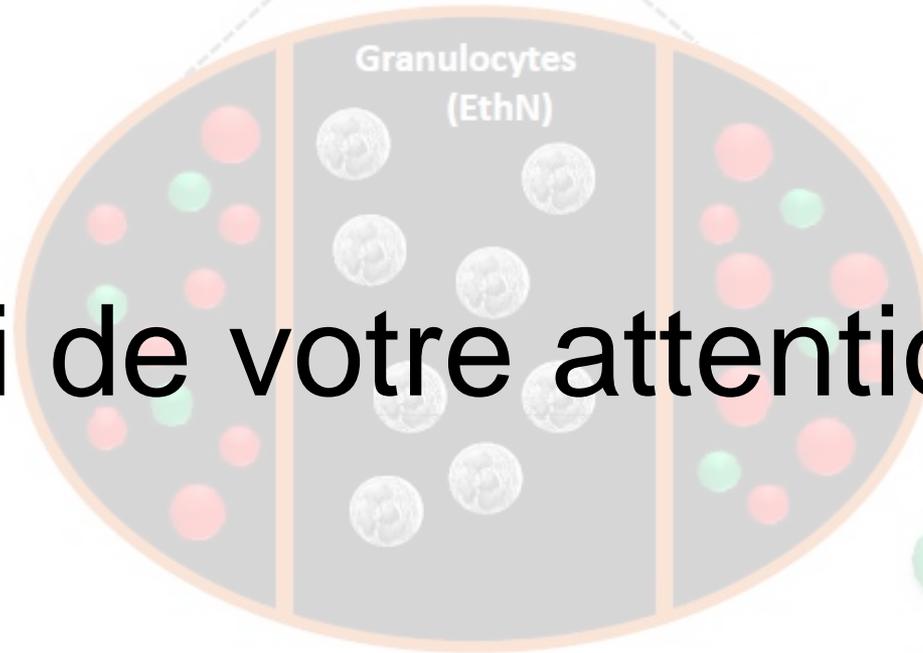
Conclusion

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 !