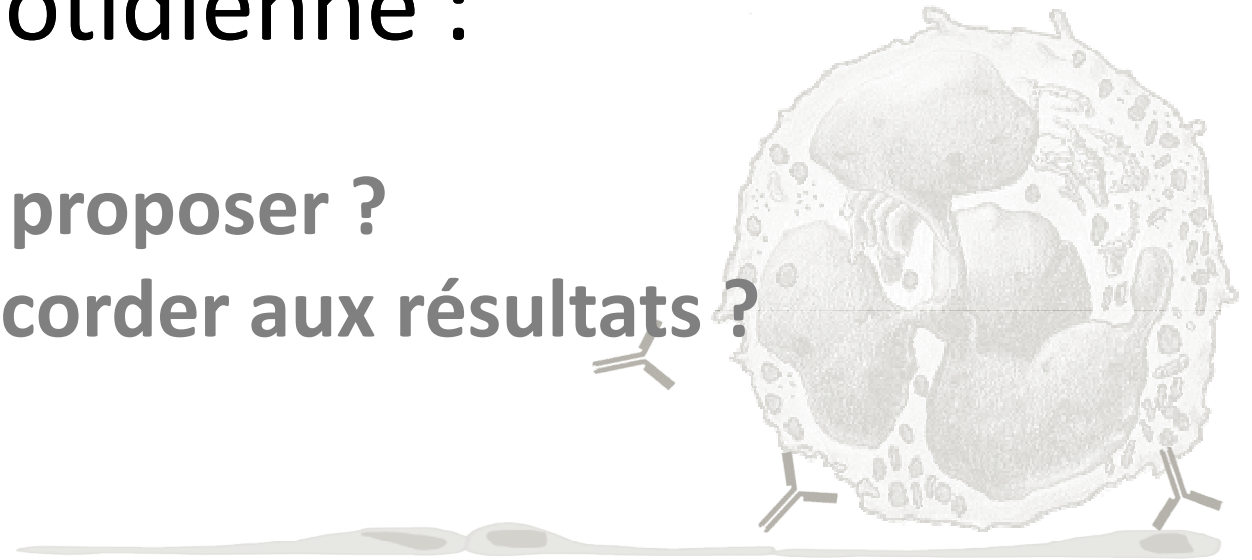


Recherche d'ANCA au laboratoire en pratique quotidienne :

Quelle stratégie proposer ?

Quelle valeur accorder aux résultats ?



Sylvain Dubucquoi

Laboratoire d'Immunologie du CHRU de Lille, Centre de Biologie Pathologie,
Bd du Professeur Jules Leclercq, 59037 Lille CEDEX

sylvain.dubucquoi@chru-lille.fr

Au menu

ANCA : un mot sur la nomenclature

Comment les rechercher ?

Quelles cibles / Quelles spécificités d'anticorps ?

Lesquelles identifier en pratique ?

Interaction antigènes-anticorps : Conséquences pratiques

Rechercher des ANCA :

Quels enjeux ?

Qui prescrit ?

ANCA MPO – PR3 par EIA

Quelles méthodes ?

Quelles performances ?

Corrélation avec les données cliniques ?

Que disent les CQE ?

Interférences

ANCA sans vascularites

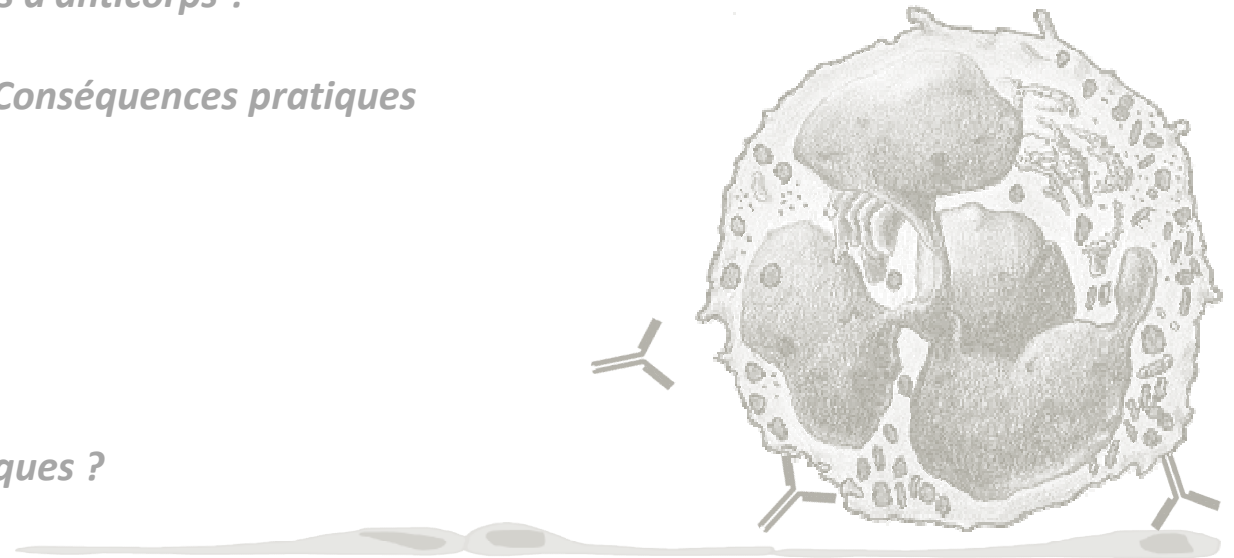
Discordances IFI / ELISA

Quelle démarche pour éclairer l'interprétation ?

Aide à l'interprétation finale ?

Avis des experts internationaux

Take-home messages



ANCA

Terminologie, nomenclature

- ANCA : Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
 - pANCA : perinuclear ANCA (*distribution périnucléaire de la fluorescence*)
 - cANCA : cytoplasmic ANCA (*distribution cytoplasmique de la fluorescence*)
- L'aspect de fluorescence ne permet pas toujours de préjuger de la spécificité (anti-MPO ou anti-PR3) qui sera identifiée.

...Rien de si évident !

ANCA

Méthodes d'identification

- Immunofluorescence

- Substrat = polynucléaires neutrophiles humains fixés par l'éthanol
- Groupe ABO : 0 (non fumeur)
- Évaluation des titres
 - Seuil = 1/20^{ème} - Dilution \geq 1/1280
 - En phase diagnostique : titre généralement supérieurs 1/80^{ème}
 - En suivi : ? (à partir du 1/20^{ème})

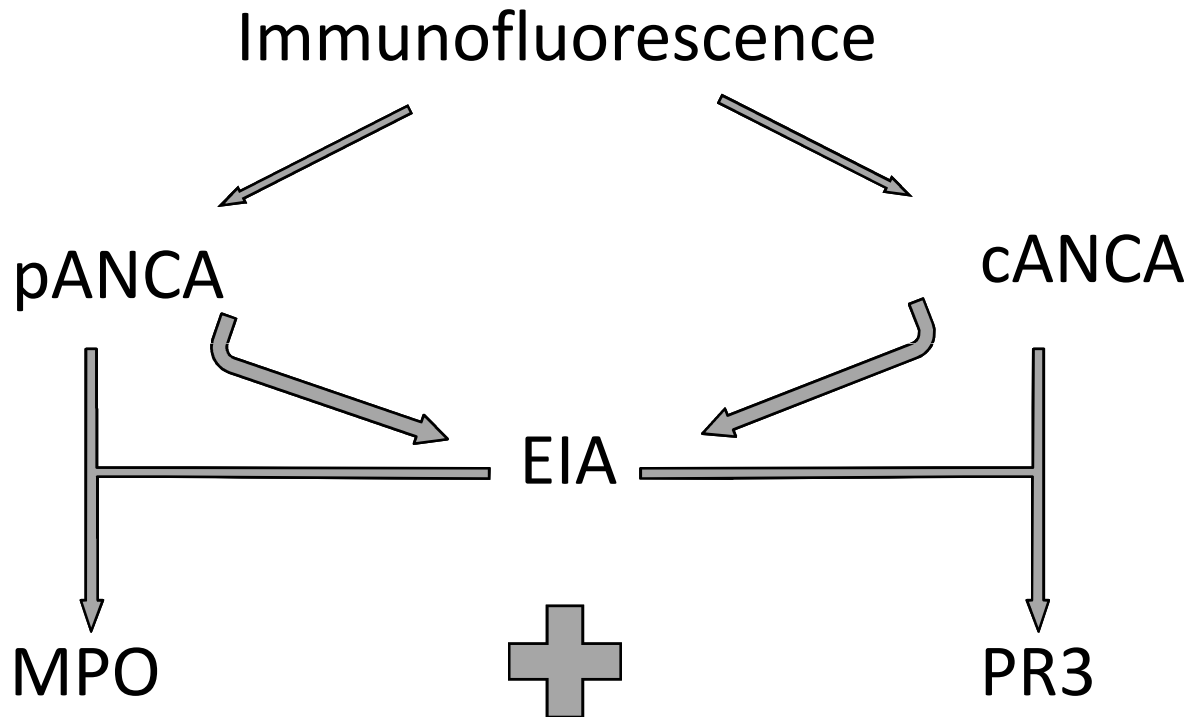


- Identification des ANCA MPO / PR3 par EIA



ANCA

Quels tests en pratique ?



💣 possible aspect
cANCA et anti-MPO

IFI *puis* ELISA ...ou ELISA *puis* IFI ?

Determination of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in small vessel vasculitis: Comparative analysis of different strategies
Pieter Vermeersch , Xavier Bossuyt et al. Clinica Chimica Acta 397 (2008) 77–81

ANCA

Un petit mot de prévalence

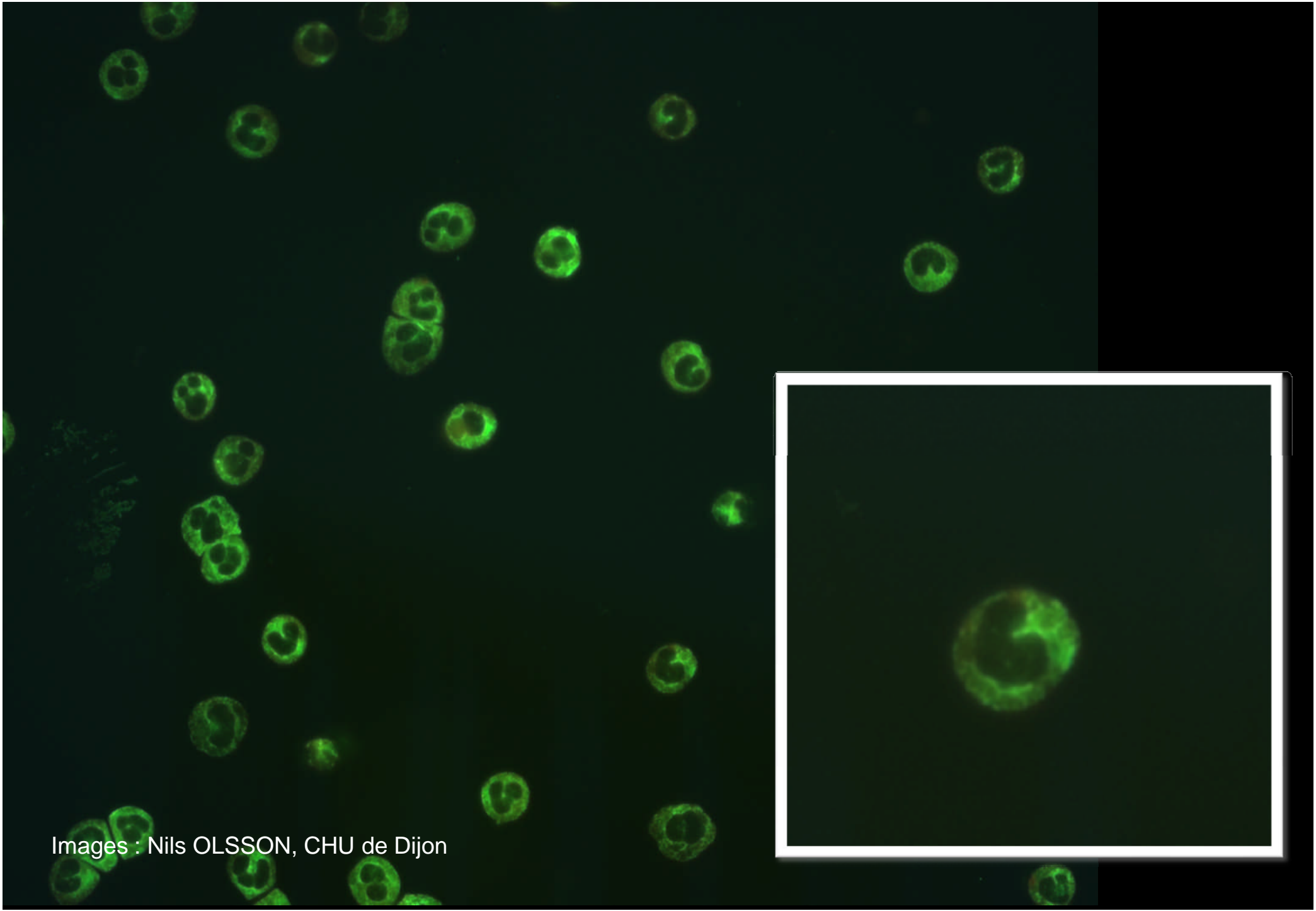


- Maladies inflammatoires du tube digestif (atteintes coliques + autres atteintes muqueuses)
hépatites auto-immunes, CBP, cholangite sclérosante, connectivites, syndrome de FELTY.

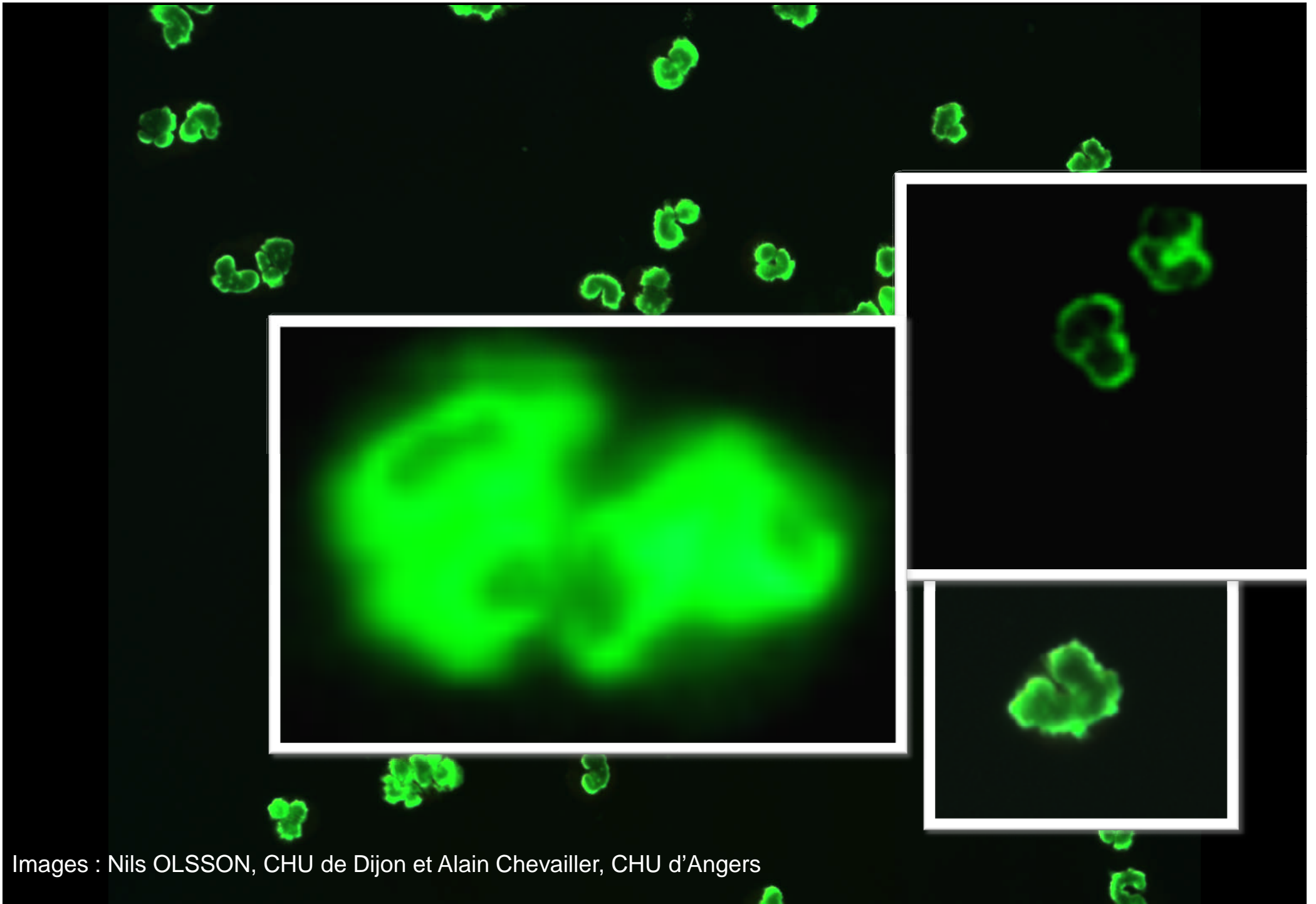
(1) Hagen E C, et al. *Kidney Int.* 53 (1998) 743-753.

(2) Kallenberg C G. *J Mol Med.* 76 (1998) 682-687.

(3) Deguillaume Y, et al. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 21 (2006) 301-307.



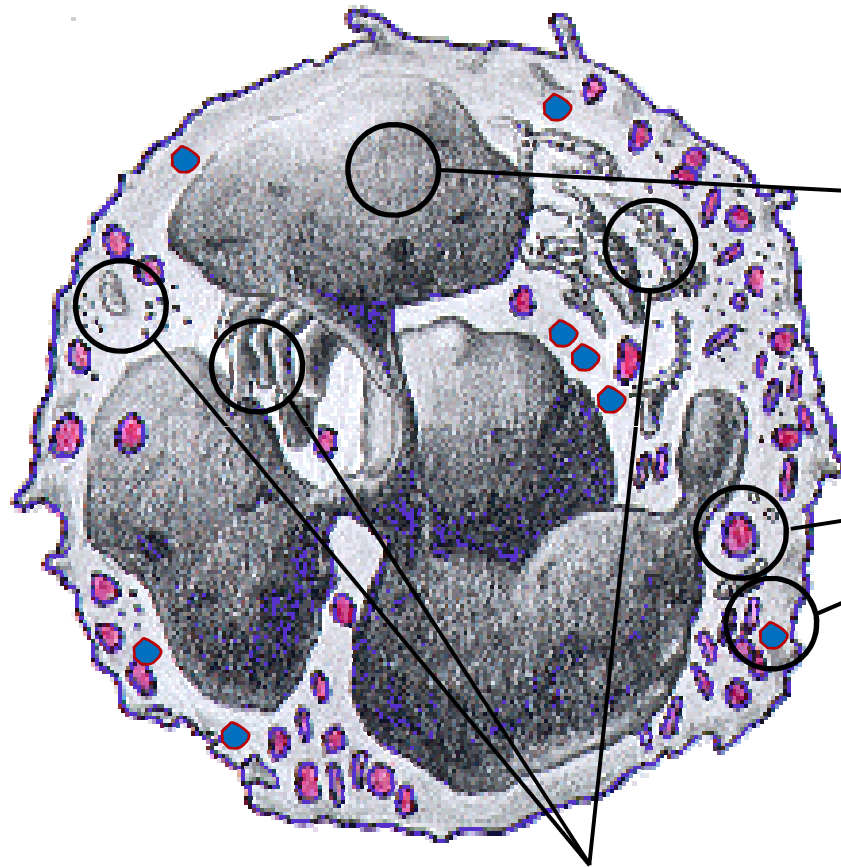
Images : Nils OLSSON, CHU de Dijon



Images : Nils OLSSON, CHU de Dijon et Alain Chevaller, CHU d'Angers

Anticorps dirigés contre les neutrophiles

Que peuvent-ils bien reconnaître ?



Noyau

- Chromatine
- Structures spécifiques du neutrophile

Granules primaires et secondaires

- Azurocidine
- BPI
- Cathepsine G
- Élastase
- Glucuronidase
- Lysozyme

- **Myéloperoxydase (MPO)**
- **Protéinase 3 (PR3)**

Organelles cytoplasmiques

- Cytosquelette
- Mitochondries
- Ribosomes
- ...

Diapositive 9

.. ..2

ANCA : petite introduction (historique, méthodes)

ANCA : Quelles cibles ? Lesquelles identifier en pratique ? (opposer utiles – interférences)

Situation : qui prescrit ? Aide à l'interprétation ?

ANCA-MPO / PR3 : quand les rechercher/ Quelles méthodes / Standardisation ?

Quelle valeur accorder aux titres d'ANCA MPO – PR3 et de l'activité de la maladie. Quel crédit apporter aux résultats chiffrés des dosages.

Les pièges :

des ANCA MPO ou PR3 sans vascularites ou glomérulonéphrites : quels diagnostics différentiels ?

interférences (faux positifs)

Discordances IFI / ELISA quelle démarche pour éclairer l'interprétation (Une majorité de résultats de l'immunofluorescence sur substrat de polynucléaires neutrophiles fixés par l'éthanol ne s'accompagnent pas d'ANCA MPO ou PR3 dosés par ELISA).

Réunion d'experts internationaux : démarche de préconisation- proposition de commentaires d'interprétation « types ».

..; 15/08/2010

.. ..7

Chercher un polynucléaire neutrophile sur internet

..; 29/08/2010

.. ..10

je vois un polynucléaire neutrophile avec ses différentes structures

noyau

cytoplasme (actines, ribosomes, mitochondrie...

les granules

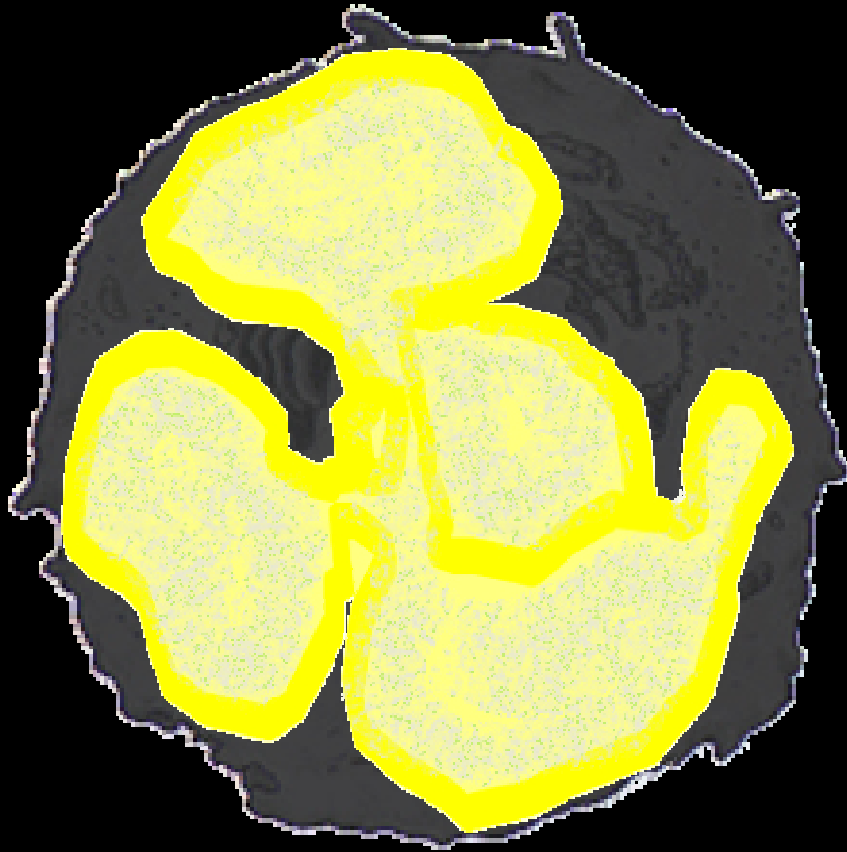
leur contenu (les principales cibles)

voir article EMC

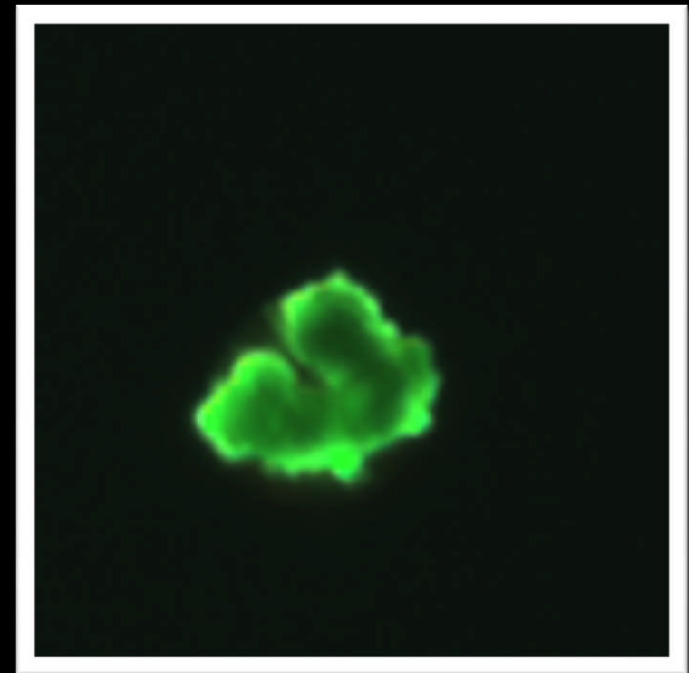
Les cibles artificielles (pANCA, xANCA ?)

..; 30/08/2010

Singularité du substrat



Myéloperoxydase MPO (pI : > 11)
Lactoferrine ?



Anticorps dirigés contre les neutrophiles

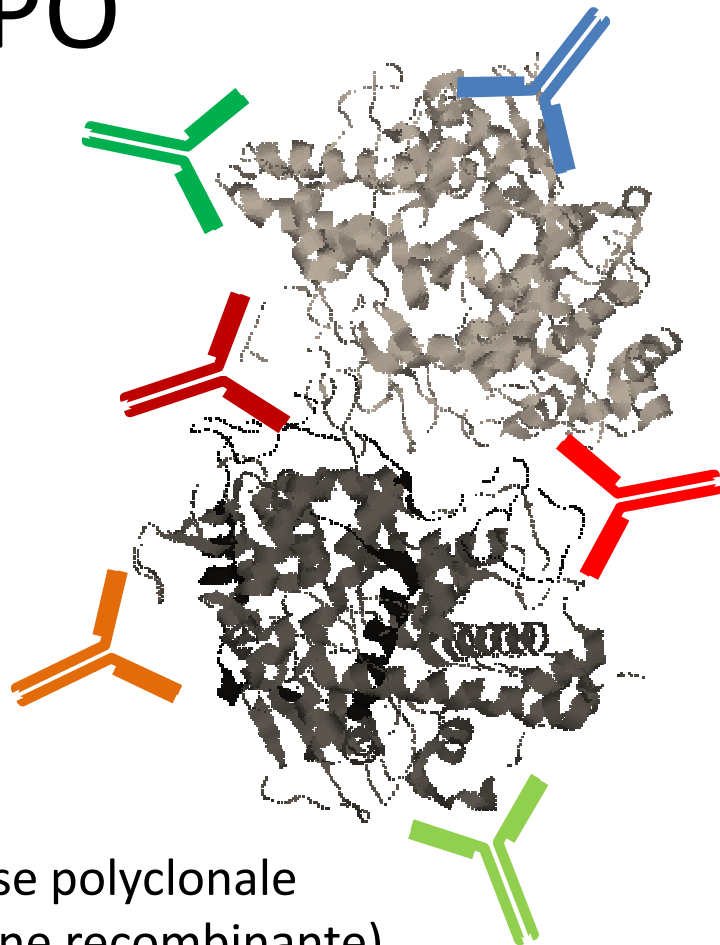
Que peuvent-ils bien reconnaître ?

- Dans le cadre des vascularites, seule la mise en évidence d'ANCA (IgG) MPO ou PR3 est utile à la prise en charge du patient !
- L'interprétation du biologiste est capitale pour la compréhension des résultats par le clinicien.
 - Elle visera à conclure de façon tranchée à la présence (l'absence) d'ANCA MPO / PR3
 - Connaître les pièges et interférences des différentes méthodes de dosage est indispensable pour arriver à une conclusion précise, et une interprétation fiable.

ANCA MPO et PR3

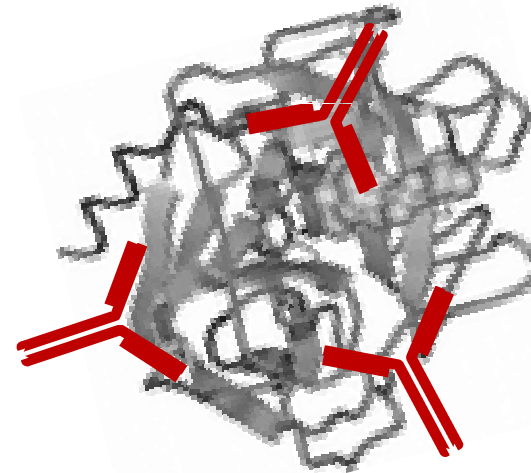
Épitopes, incidences sur la production des antigènes et l'interprétation

MPO



Réponse polyclonale
(Protéine recombinante)

PR3



Importance des ponts di-sulfure
Réponse oligoclonale
(Protéine purifiée)

Diapositive 12

.. ..8

ANCA : petite introduction (historique, méthodes)

ANCA : Quelles cibles ? Lesquelles identifier en pratique ? (opposer utiles – interférences)

Situation : qui prescrit ? Aide à l'interprétation ?

ANCA-MPO / PR3 : quand les rechercher/ Quelles méthodes / Standardisation ?

Quelle valeur accorder aux titres d'ANCA MPO – PR3 et de l'activité de la maladie. Quel crédit apporter aux résultats chiffrés des dosages.

Les pièges :

des ANCA MPO ou PR3 sans vascularites ou glomérulonéphrites : quels diagnostics différentiels ?

interférences (faux positifs)

Discordances IFI / ELISA quelle démarche pour éclairer l'interprétation (Une majorité de résultats de l'immunofluorescence sur substrat de polynucléaires neutrophiles fixés par l'éthanol ne s'accompagnent pas d'ANCA MPO ou PR3 dosés par ELISA).

Réunion d'experts internationaux : démarche de préconisation- proposition de commentaires d'interprétation « types ».

..; 15/08/2010

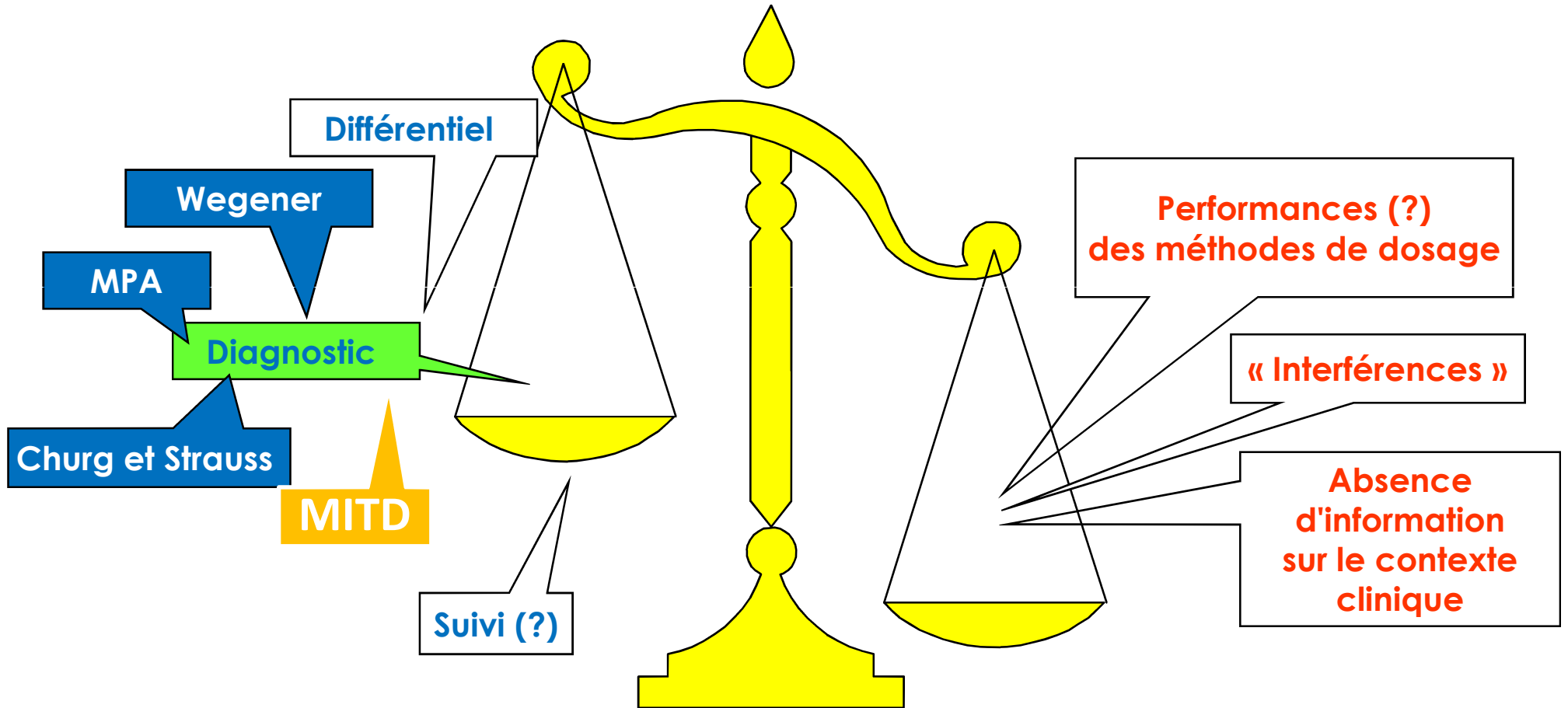
.. ..9

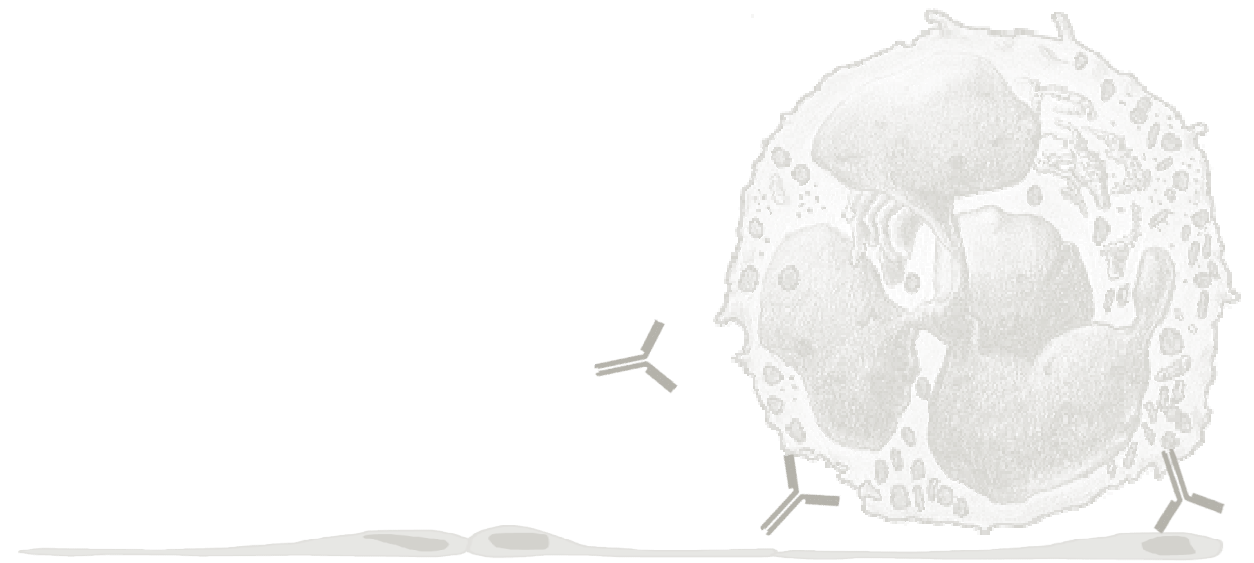
Cristallographie des protéines

..; 30/08/2010

ANCA en pratique quotidienne

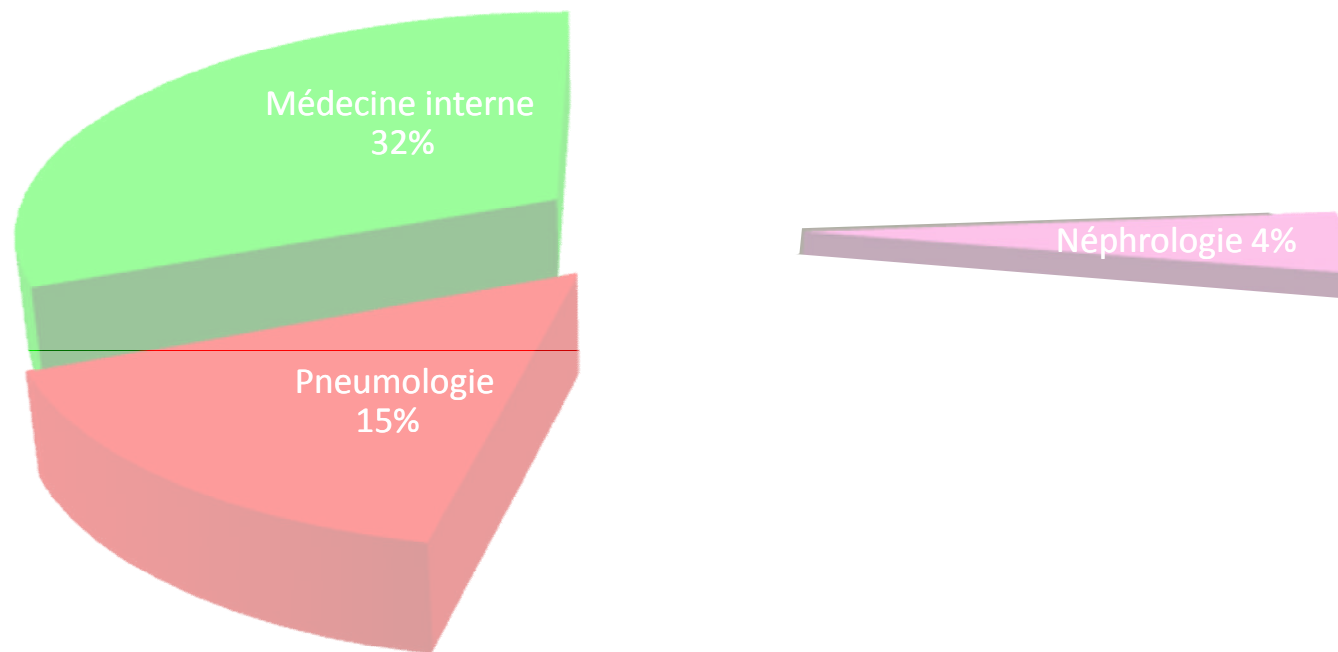
Quel(s) enjeux ?





ANCA

Qui prescrit ?



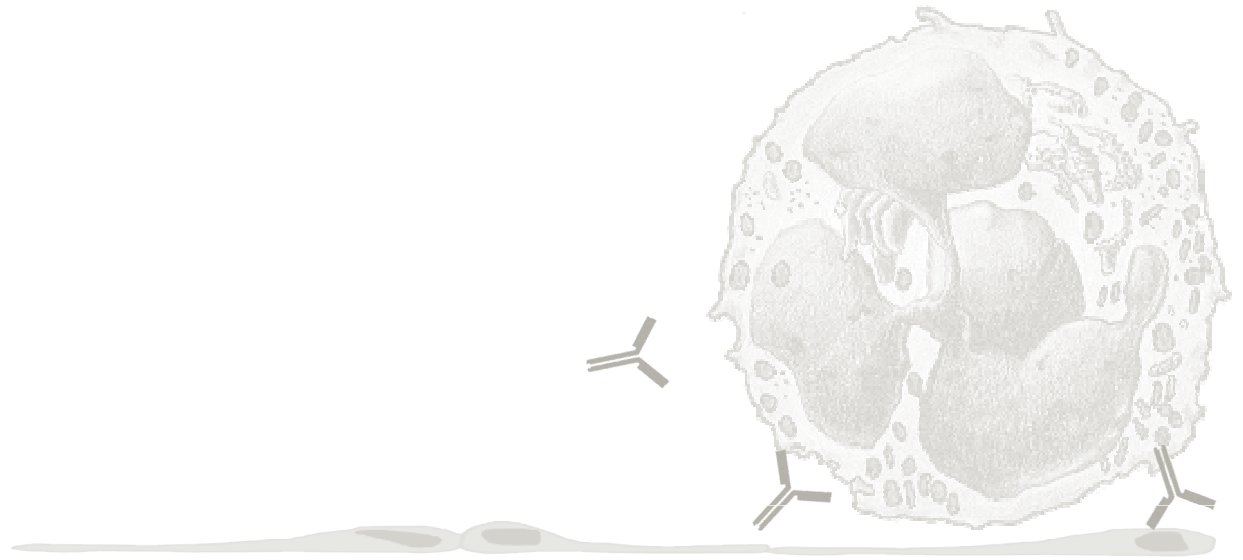
CHRU de Lille (2009) : 2500 prescriptions annuelles / 500 dosages anti-MPO et anti-PR3

ANCA

Qui prescrit ?

Pour notre activité

- ~ 50% des ANCA sont prescrits par des services « concernés » par les syndromes pneumo-rénaux
- 5 à 8 % des prescriptions s'associent à l'identification d'ANCA MPO ou PR3
- Quel que soit le service prescripteur : 20 % de résultats positifs en IFI / négatifs en ELISA (*difficulté d'interprétation !*)
- Chez nous IFI (2500 tests) puis ELISA (500 tests) = 9 500 € (budget annuel)
 - Recette « Bossuyt » : 2500 ELISA + 2500 IFI = 17 500 €
 - IFI : ~3 € le test / ELISA ~2€



ANCA

Performances des méthodes de dosage

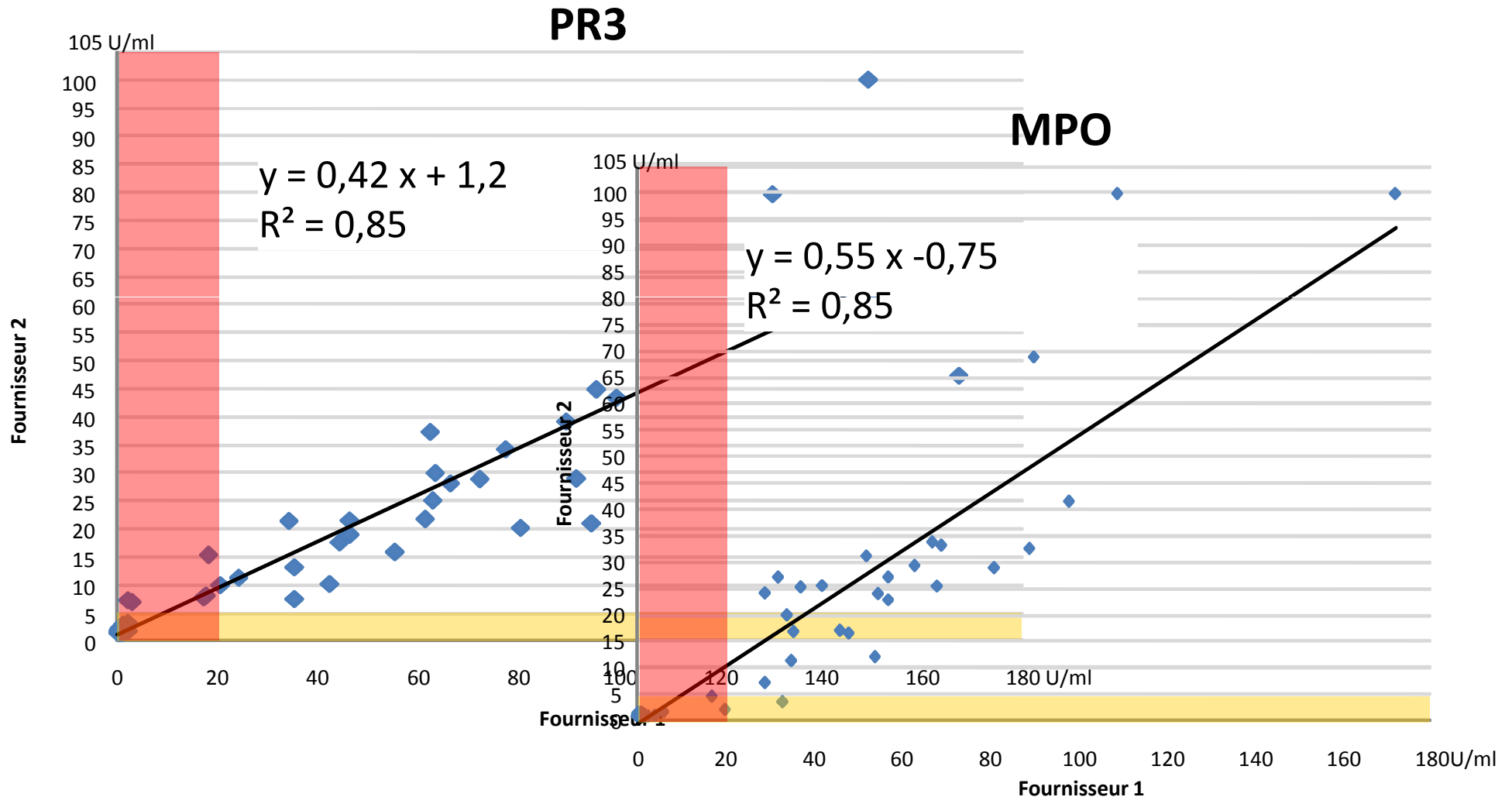
Trousses de dosages des ANCA MPO PR3

Avantages et inconvénients ?

- ANCA MPO / PR3 : Quelles méthodes de dosages ?
 - Avantages et inconvénients
 - ELISA microplaque : **Recrutement, séries (calibration), coût**
 - Dots : **Faible recrutement, urgence, qualité de l'antigène (?)**, couplé aux anti-MBG , **coût**
 - EIA : **Automate, urgence, coup par coup, coût**
 - Luminex : **Automate, urgence, coup par coup**, couplé aux anti-MBG, **coût**
 - Quelle corrélation entre les coffrets ?
 - Les CQE

Trousses de dosages des ANCA MPO PR3

Corrélation entre les trousses ?



Trousses de dosages des ANCA IFI

Que disent les CQE ?



	C ANCA		P ANCA		ANCA (Screen Only)		Range		
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg			
Indirect Immunofluorescence	299	5	4	299	20	2	10	-	2560
A. Menarini - Zenit	16	0	0	16	0	0		-	
Alpha Dia	1	0	0	1	0	0	20	-	1600
Binding Site	55	1	0	54	4	0	20	-	80
BioDiagnostics	6	1	0	7	0	0	40	-	320
Bio-Rad/Kallestad/Sanofi	12	0	1	11	0	0		-	
Biosystems	3	0	0	3	1	0	10	-	640
Diasorin	0	0	0	0	0	0	40	-	640
D-tek	1	0	0	1	0	0	40	-	320
Euroimmun	61	1	1	63	2	1	20	-	2560
Immco	26	0	0	26	5	0	10	-	640
Immunoconcepts	7	0	0	7	0	0		-	
In House	14	0	0	13	0	0	20	-	80
Inova	90	1	1	90	5	0		-	
Not Stated	0	0	0	0	0	0	20	-	320
ORGenTec	1	0	0	1	0	0		-	
ORGenTec Alegria	0	0	0	0	2	1		-	
Other ...	6	1	1	6	1	0		-	

Trousses de dosages des ANCA MPO/PR3

Que disent les CQE ?

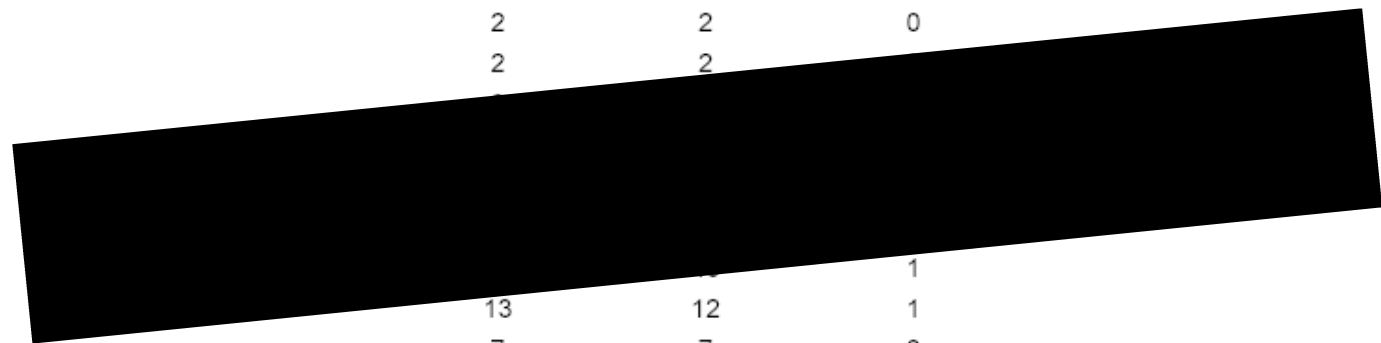
PR3

IU/mL or U/mL

	Returns	Positive	Negative	Mean	Range
Axis Shield/Diastat	4	4	0		
Binding Site	14	14	0		
BioDiagnostics	5	5	0		
Bio-Rad/Kallestad/Sanofi	1	1	0		
BI-Diagnostika	2	2	0		
BMD	7	7	0		
Diamedix	4	4	0		
Diasorin	3	3	0		
Euroimmun	23	23	0		
Fenning	2	2	0		
Genesis	2	2	0		
AESKU					
Hycor Biomedical					
In House					
Inova					
ORGenTec			1		
Other ...	13	12	1		
Phadia Varelisa	7	7	0		
Trinity Biotech	1	1	0		
Wieslab	15	15	0		
ZEUS	2	2	0		
Eurodiagnostics	6	6	0		
A. Menarini - Zenit	2	2	0		
Phadia Elia	116	114	2		
ORGenTec Alegria	19	19	0		

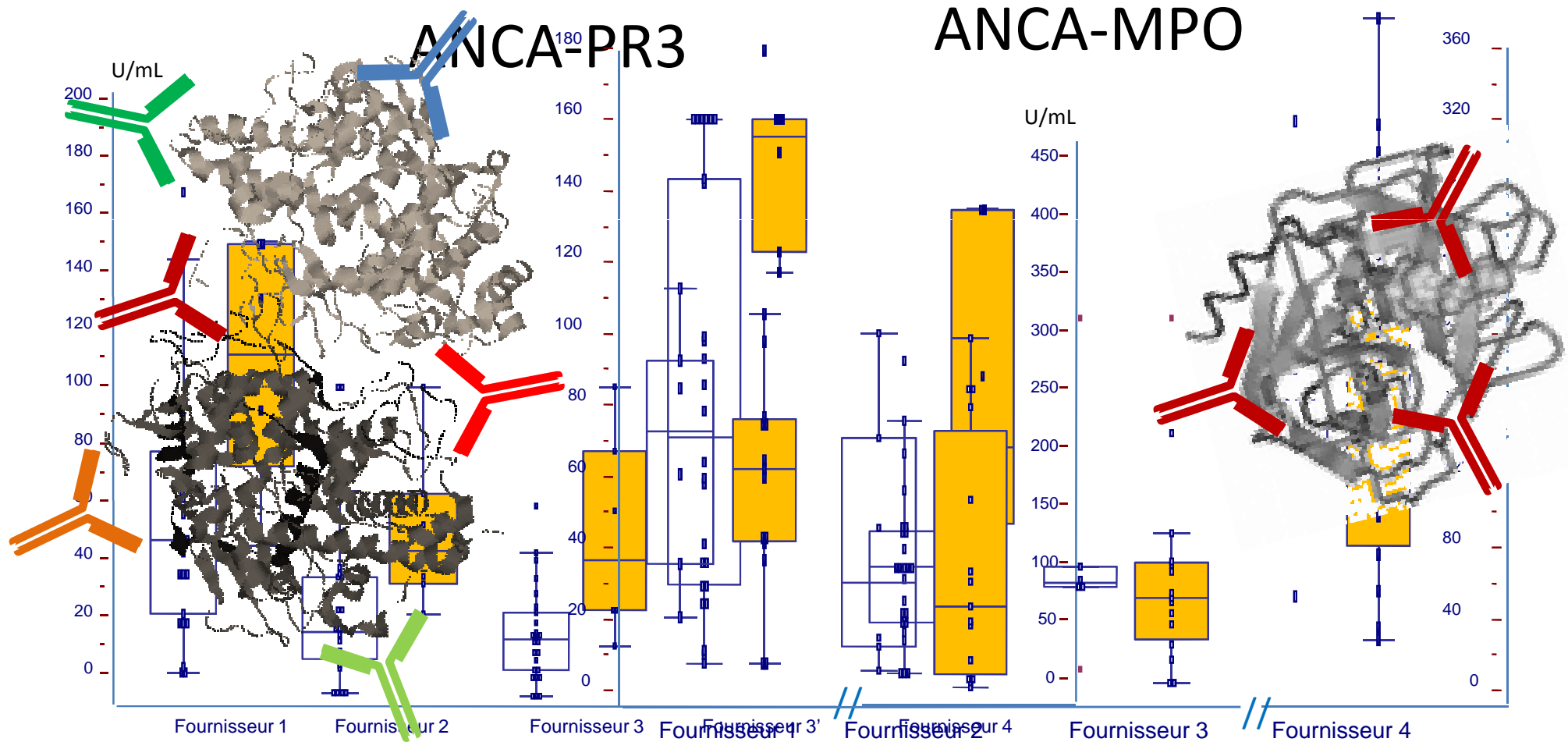


UNITED KINGDOM NATIONAL QUALITY ASSURANCE SERVICE FOR
 IMMUNOLOGY AND IMMUNOCHEMISTRY
 Department of Immunology
 St. James's Hospital



Trousses de dosages des ANCA MPO PR3

Corrélation avec l'évolution de la maladie ?



ANCA MPO PR3

Corrélation avec l'évolution de la maladie ?

Selon notre expérience

- ANCA MPO :
 - Réponse polyclonale
 - Ac dirigés contre des épitopes indépendants du site actif de la MPO
 - Sous traitement : réduction (disparition) de certaines populations d'anticorps. Mais pas toutes !
 - Pas de corrélation IFI et ANCA MPO (EIA)
 - Pas de corrélation IFI ou EIA avec l'activité de la maladie
- ANCA PR3
 - Réponse oligoclonale
 - Ac dirigés contre des sites actifs de la molécule (inhibition du catabolisme...)
 - Sous traitement : réduction (disparition) des populations d'anticorps qui peuvent être associés (impliqués) à la physiopathologie
 - Meilleure corrélation IFI et ANCA PR3 (EIA)
 - Meilleure corrélation IFI et EIA avec l'activité de la maladie (pas absolue)

Recherche d'ANCA en urgence

Une approche ... « fragilisée »

Selon notre expérience

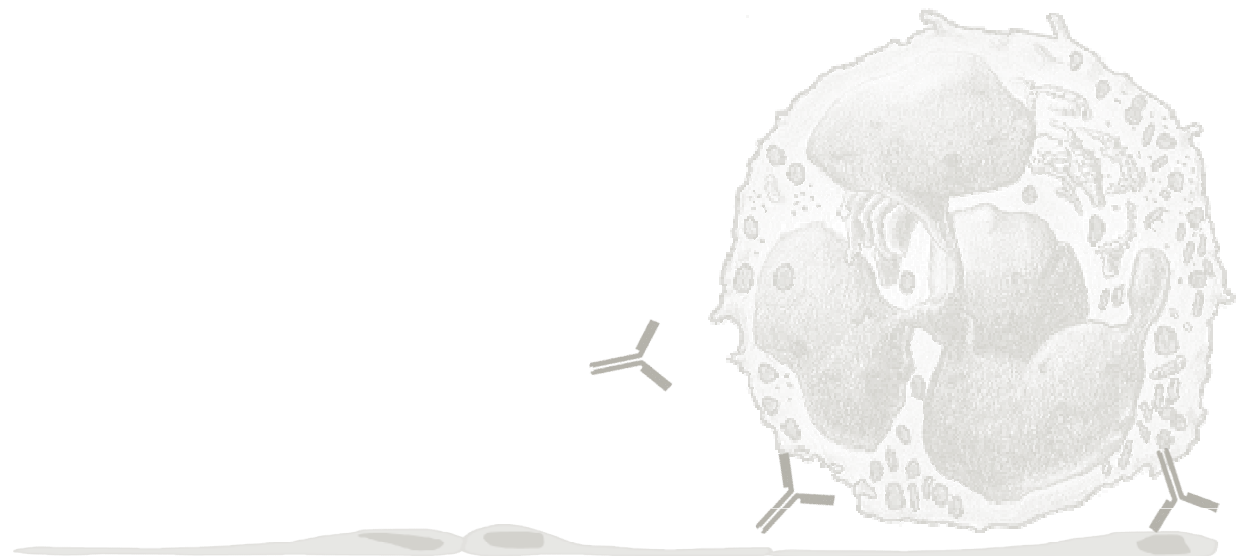
- **Pas d'IFI**
 - Personnel expérimenté ; temps ; puissance diagnostique plus faible (interférences)
- ANCA MPO/PR3 (EIA) : réalisation « **en direct** »
 - Méthode (éventuellement) différente de celle de la routine
(*microplaque se prête mal à l'urgence*)
 - Dots (méthode qualitative, qualité de l'antigène ?)
 - EIA automatisé (pas de calibration, pas (toujours) de CQI....)

« Manque de recul »

Comment évaluer la fiabilité ?

- Tout dosage réalisé en urgence est contrôlé dans la série de routine
- CQE
- Dialogue avec le clinicien

Correction a posteriori
(vigilance et réactivité)



Interférences

Interférences

ANCA (MPO, PR3) sans vascularites

- De « vrais » ANCAs
 - Maladies infectieuses /inflammatoires (endocardites +++)
 - Cocaïne (inhalation / parfois anti-ELASTASE)
 - Antithyroïdiens (PTU) (parfois ANCA MPO et PR3 voire autres spécificités)
 - Connectivites (LES, PR) (taux faibles)
- Des faux positifs « EIA »
 - Liés aux FR (assez exceptionnels) (ANCA MPO et PR3)
 - Ac dirigés contre des protéines de la matrice (protéines de lait de vache...)
 - Dysglobulinémies (« sticky Ig »)
 - PR3 non suffisamment purifiée (?)

Interférences

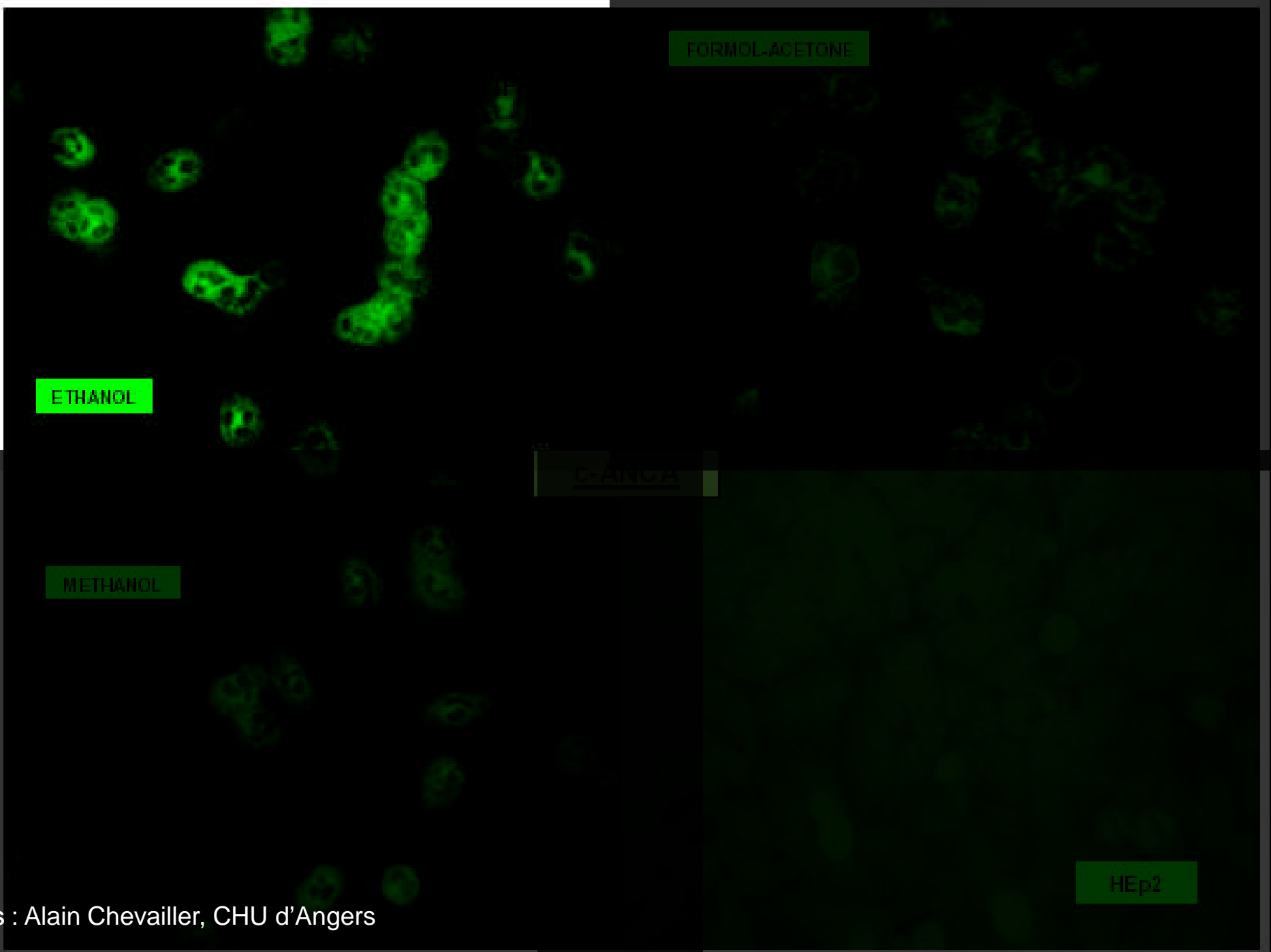
IFI positive sans ANCA MPO PR3

- cANCA sans anti- PR3 (/MPO)
 - Autre cible (non spécifique des neutrophiles)
 - Ac anti-mitochondries ; cytosquelette (actine)...
 - ANCA autres que ANCA MPO / PR3
 - Maladies infectieuses (mucoviscidose, BPCO, MITD) : anti-BPI, azurocidine, élastase...
 - cANCA « atypiques »
- pANCA sans anti- MPO (PR3)
 - ANA : IFI « homogène » sur polynucléaires neutrophiles (homogène ou mouchetée sur HEp2)
 - ANCA différents de MPO ou PR3 : IFI pANCA « classiques » ou « atypiques »
(ANCA « vrais »)
 - aANCA : ANCA atypiques (xANCA, NANA, NSA, gsANA...)

Interférences en IFI

La place des autres substrats

- Polynucléaires neutrophiles fixés par le mélange formol-acétone
 - Objectifs : fixation définitive des antigènes dans les granules (plus de migration périnucléaire)
 - pANCA « éthanol » ⇔ cANCA « formol »
 - Intérêt :
 - ANCA MPO/ PR3 (\pm) ;
 - Suspecter des ANCA « vrais » différents de MPO / PR3
 - Moins sensible que l'« éthanol »
- Polynucléaires neutrophiles fixés par le méthanol
 - Révélateur d'Ac anti- nucléaire
 - pANCA « éthanol » ⇔ pANCA « méthanol » : aspect « en liseré fin », « caligraphié »
 - Intérêt :
 - aANCA (xANCA, NANA, gsANA)
 - Piège : Ac anti-nucléaire (ANA)



ETHANOL

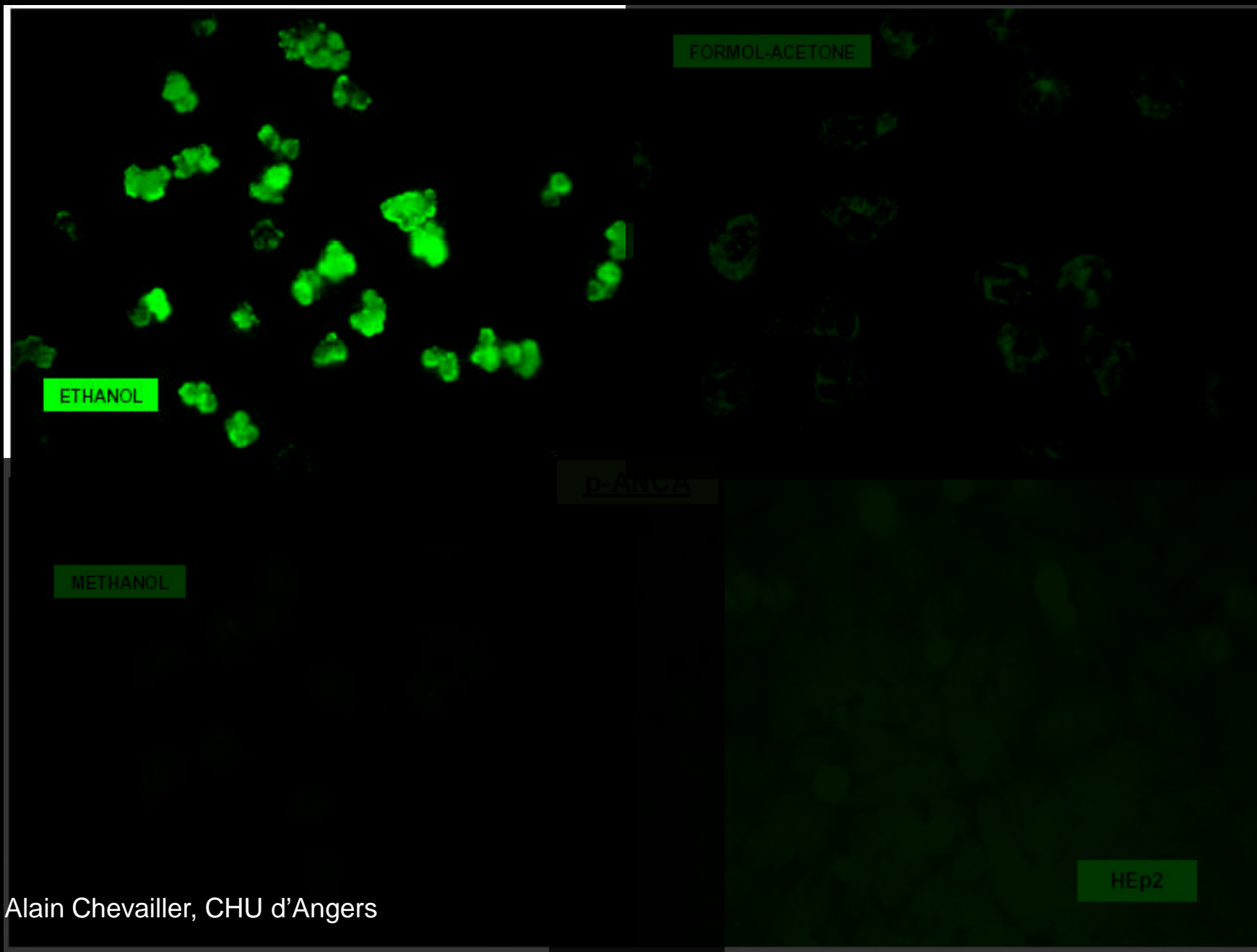
FORMOL-ACETONE

D-ANGA

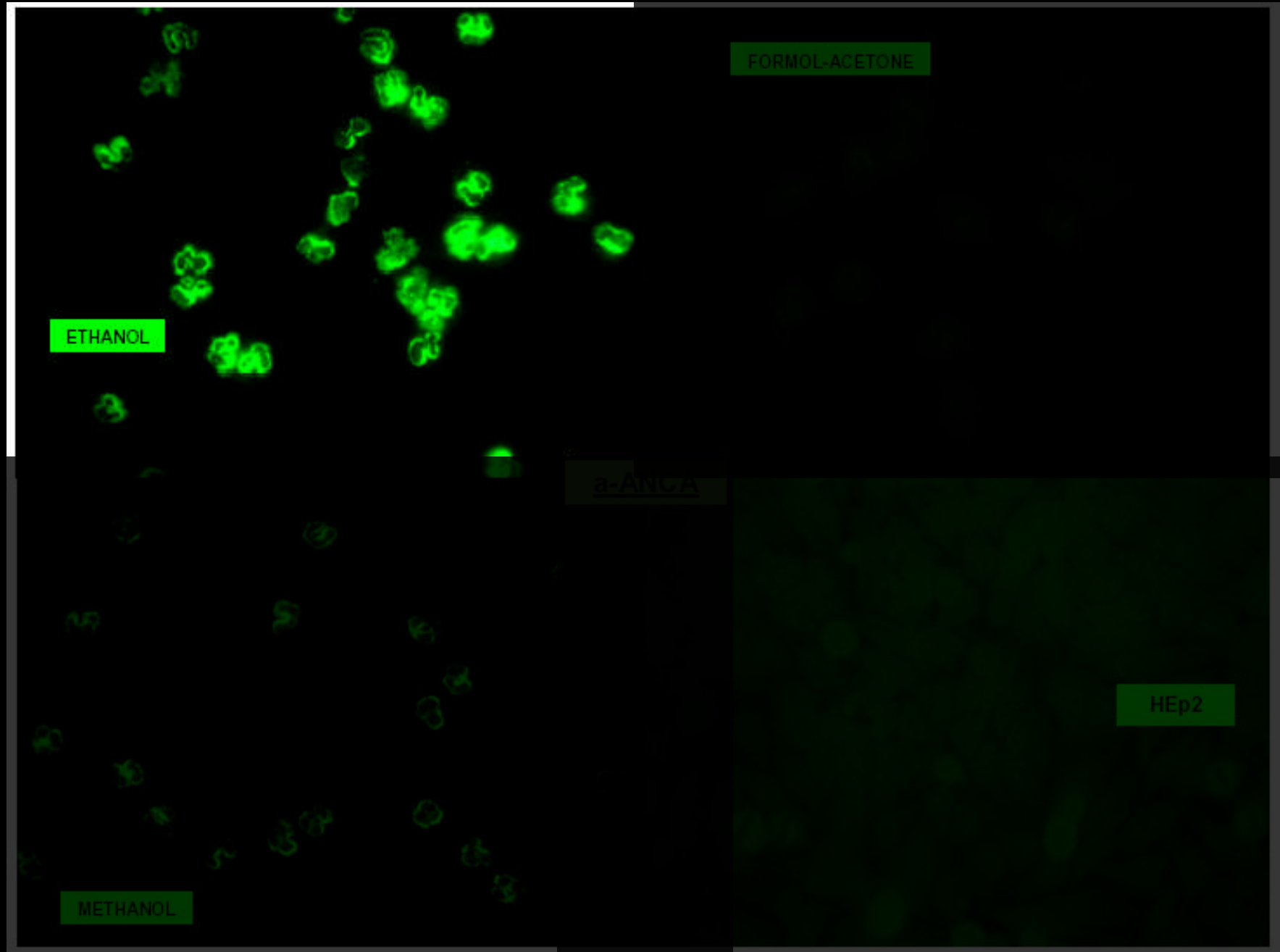
METHANOL

HEp2

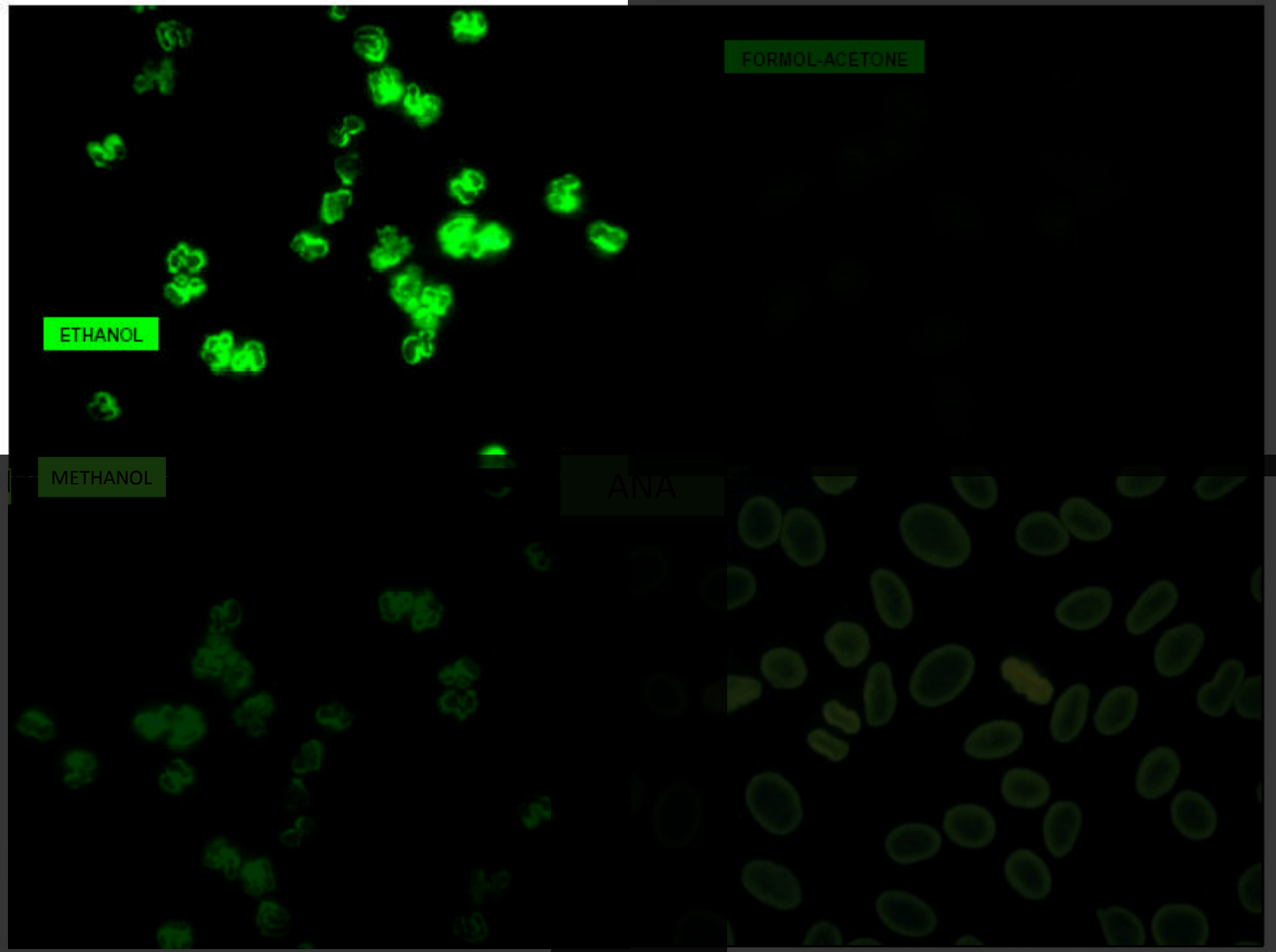
Images : Alain Chevailler, CHU d'Angers



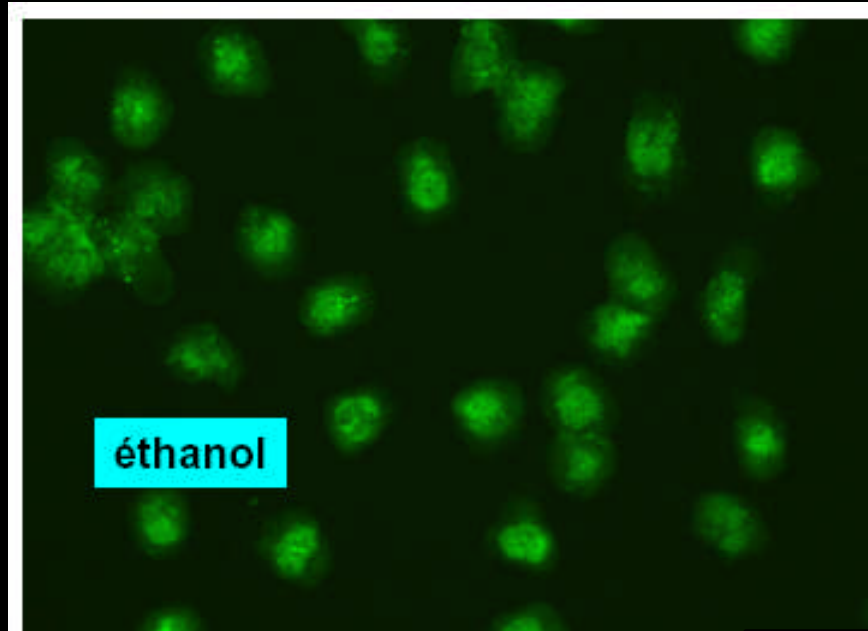
Images : Alain Chevaller, CHU d'Angers



Images : Alain Chevailler, CHU d'Angers



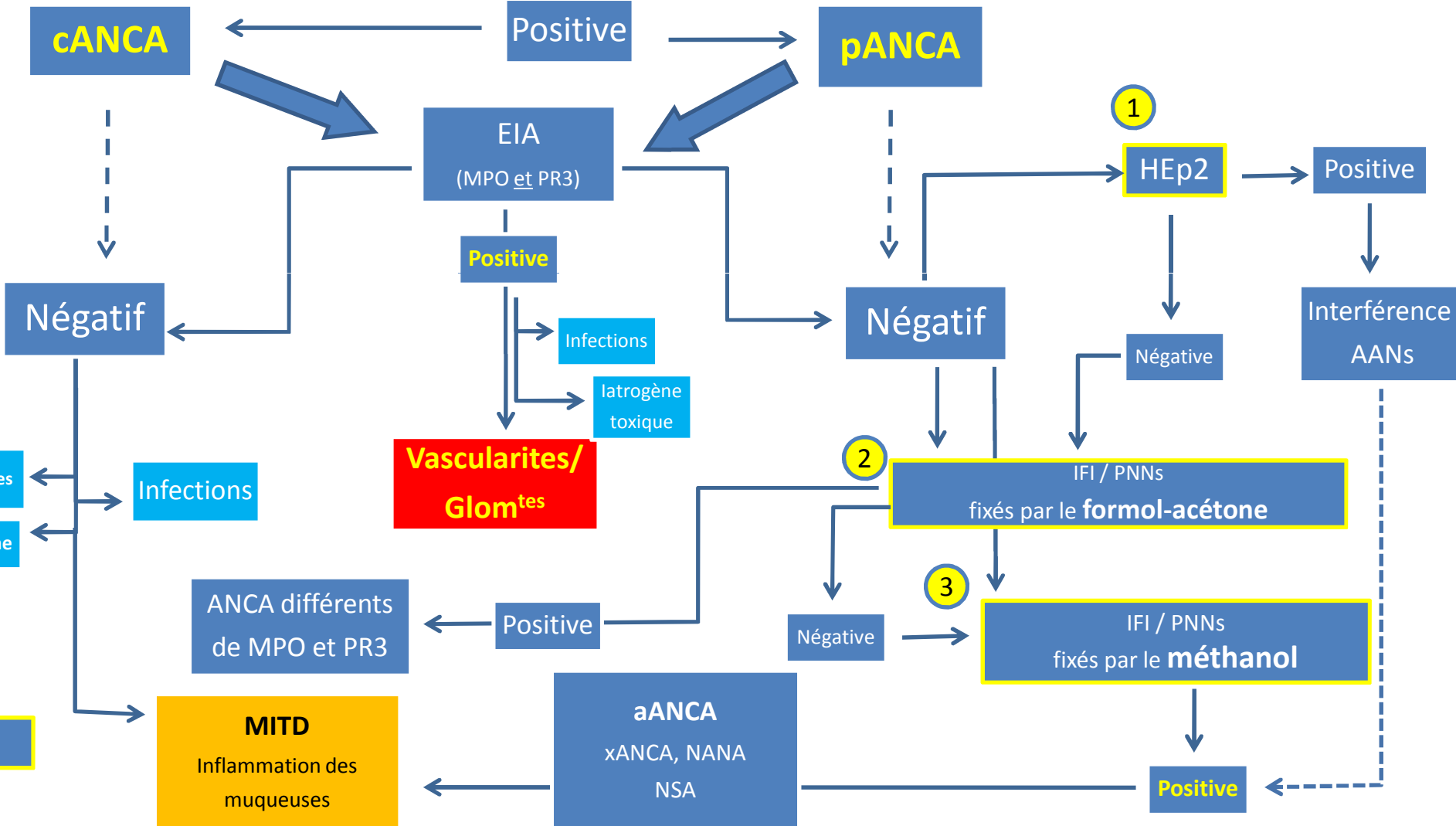
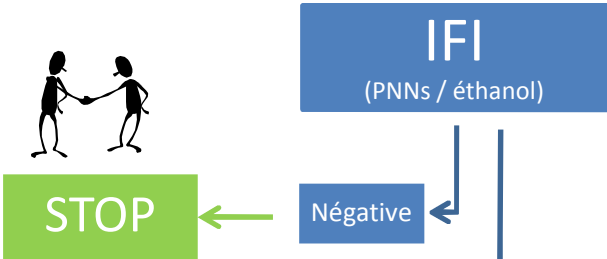
Images : Alain Chevaller, CHU d'Angers



Interférence

Interférences

Stratégies de dépistage



ANCAs

Que disent les experts internationaux ?

Morceaux choisis :

- **cANCA et PR3 (ou MPO) dosés à 3 + ou 2 +**

Commentaire type : Ces résultats sont observés au cours des vascularites actives type granulomatose de Wegener, micro-polyangéite microscopique (sa forme limitée au rein) et le syndrome de Churg et Strauss. Le diagnostic doit être confirmé histologiquement si possible.

Les patients dont le diagnostic est connu chez lesquels les ANCA réapparaissent sont suspects de rechute.

- **cANCA et PR3 (ou MPO) négatifs ou dosés à 1 +**

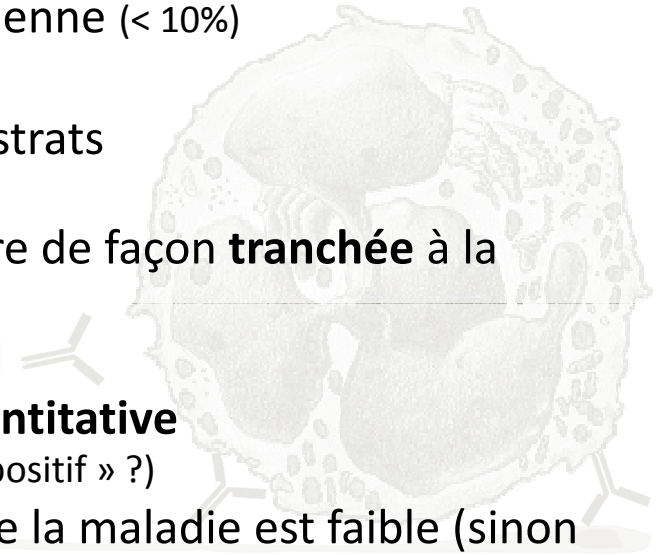
Commentaire type : Ces résultats peuvent être observés au cours des vascularites (WG, MPA (MPA-R), SCS) chez des patients traités ou en phase inactive de la maladie mais aussi **alors que le patient rechute.**

Ces résultats peuvent aussi s'observer lors d'infections chroniques et occasionnellement de maladies inflammatoires du tube digestif (MITD), ou d'autres maladies auto-immunes. La pertinence clinique de tels résultats n'est alors pas définie.

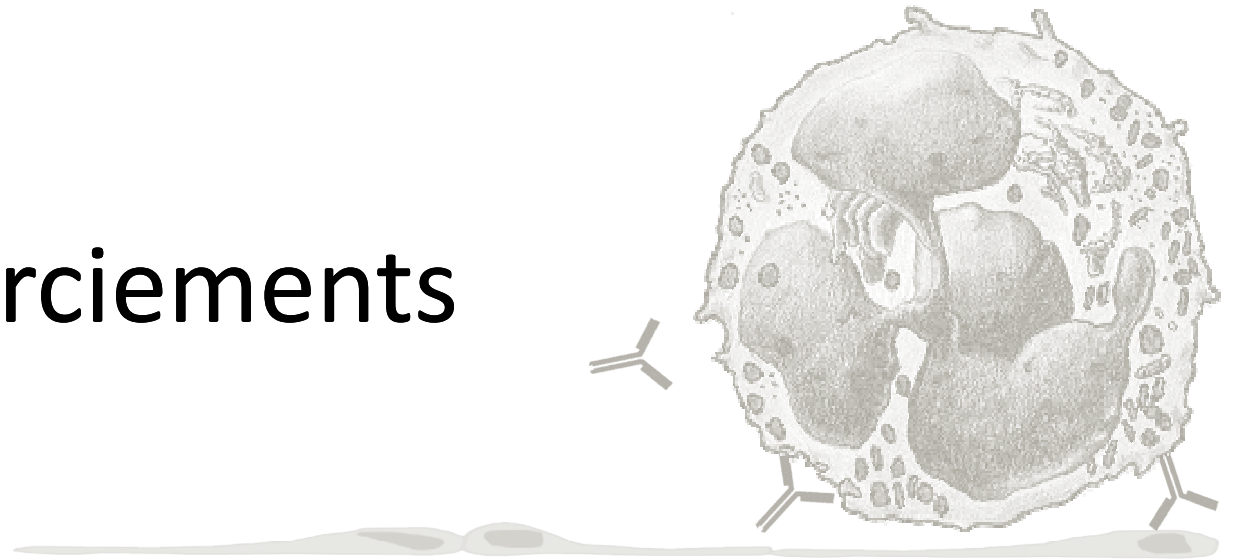
ANCAs

Take Home Messages

- Faible prévalence des ANCA MPO PR3 en pratique quotidienne (< 10%)
- Nombreuses « interférences » (> 20%)
- S'aider des résultats des dosages réalisés sur d'autres substrats (HEp2, « formol », « méthanol »).
- Chercher la cohérence des résultats (IFI, EIA) pour conclure de façon **tranchée** à la présence (ou l'absence) d'ANCA MPO ou PR3
 - Ne pas conclure à la présence d'ANCA sur la seule IFI
- Estimer les titres des ANCA MPO / PR3 de façon **semi quantitative** (négatif / 1 à 3 x le seuil = « faiblement positif » / > 3x le seuil = « très positif » ?)
- La relation entre titres d'ANCA MPO / PR3 et l'évolution de la maladie est faible (sinon nulle).
- Des progrès à faire : La **standardisation** (Acteurs : biologistes-cliniciens / industriels)



Remerciements



sylvain.dubucquoi@chru-lille.fr

<http://biologiepathologie.chru-lille.fr/pathologies/liste.html>