

L'auto-immunité au laboratoire en 2024

Dr Lionel MEYER

Laboratoire Ouilab-Biosphère

Plateau technique de biologie spécialisée

STRASBOURG

Quels enjeux ?

- Plateaux techniques avec des volumes d'activité important suite aux regroupements – externalisation d'activité de certains CH, augmentation des volumes de prescription en ville (médecins généralistes inclus) et à l'hôpital.
- Délais de sortie des résultats
- Assurance qualité / accréditation
- Standardisation
- Dialogue clinico-biologique – interprétation/avis
- Économiques/ examens HN / limites

Introduction : examens/techniques

- IFI : ANA, ANCA, anti-tissus, anti-endomysium, anti-peau, (anti-neuronaux)
- Immunoturbidimétrie : Facteurs rhumatoïdes, C3, C4...
- Immuno-enzymatique, CLIA, immunoblot : anti-ADNn, ENA, CCP, Tg, TPO, TG, TRAK, Phospholipides, Fact intrinsèque, MPO/PR3, MBG, synthétases, SLA, typages anti-foie, CH50, ENA rares...

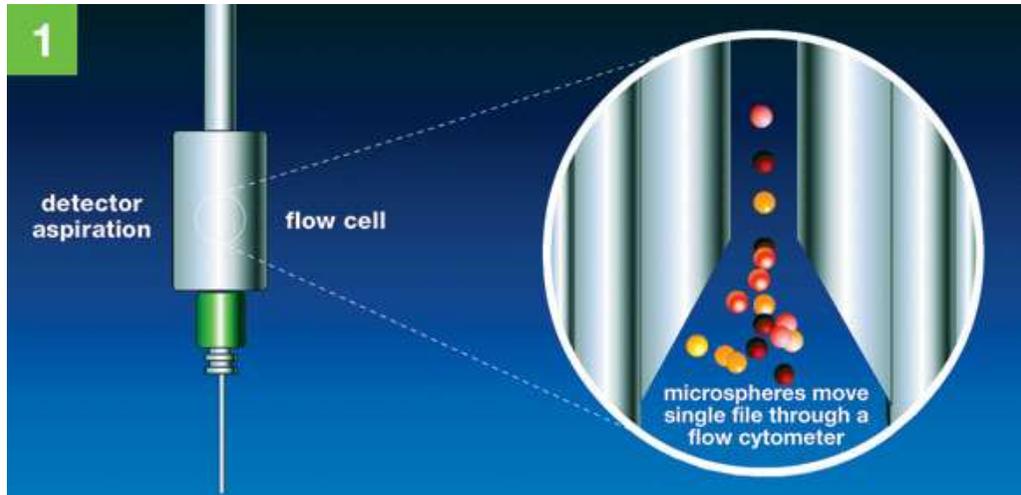
Gestion des volumes importants/Délais

- Solution chaînées/labo biochimie : FR, CCP, anti-TPO/TG, C3, C4.
 - Attention aux performances (EEQ++)
- Automates dédiés de dosages immuno-enzymatiques - Solutions multiplexées
- Préparateurs de lames : IFI ++ (peuvent gérer également microplaques)
- Lecteur (automatisé) de lames / Intelligence artificielle
- Automates d'immunodot/blot avec lecture par caméra
- Informatique ++ (Serveurs / Middleware / SIL)

Exemple d'analyseur d'immuno-analyse avec multiplexage

- Billes magnétiques, infusées dans différentes proportions de teintures fluorescentes pour créer des jeux de billes uniques
- Les billes de chaque jeu sont enduites d'un ligand (antigène ou anticorps) spécifique à un test donné
- Les jeux de billes sont alors mélangés dans un même pack de réactifs, ce qui permet de détecter simultanément plusieurs analytes à partir d'un échantillon unique
- Méthode de détection type cytomètre de flux à double laser
- Résultats en 20 à 40min, cadence importante (100 échant/h – résultats toutes les 30 sec)



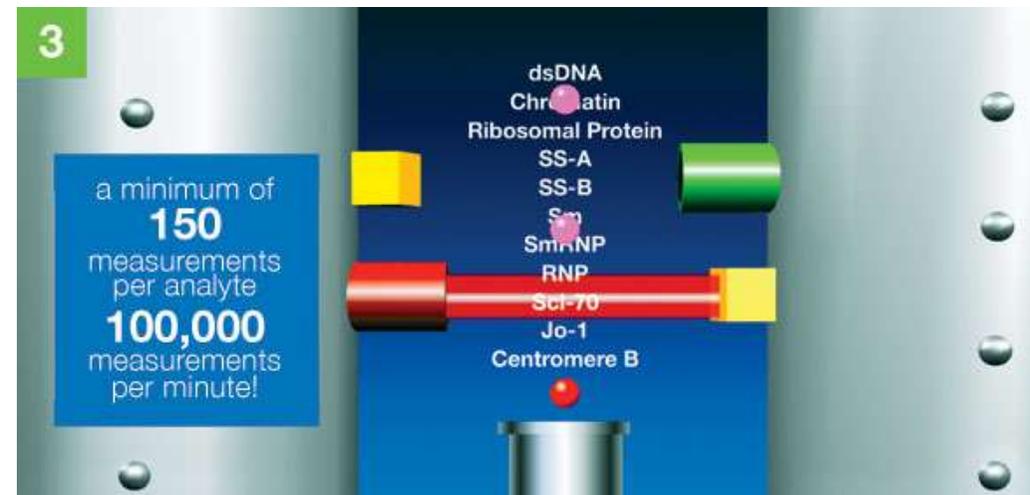


Détection 1. Un échantillon du mélange de réaction final est aspiré dans le détecteur.

Détection 2. Le mélange de billes passe au travers du détecteur, où un laser identifie l'analyte des billes et un autre mesure la concentration de l'analyte

Détection 3. Le détecteur du système réalise un minimum de 150 mesures par analyte à une vitesse de 100 000 mesures par minute.

Exemple du PANEL ANA screen intéressant +++ 11 spécificités d'un coup !



Avantages - inconvénients

- Analyseur type **random-access** / pas de travail en série (contrairement à l'ELISA sur microplaque, Phadia...) :
 - disponible tout au long de la journée/nuit
 - pas besoin de refaire toute une série si un/des contrôles sont HB
 - nécessité d'encadrer toutefois les échantillons passés par des contrôles de début et fin de journée
- Résultats **titrés immédiats de multiples spécificités** avec un seul kit réactif : cf AADN/ENA, ACPHOS, MPO/PR3/MBG (contrairement aux analyseur de chimiluminescence type Liaison (Diasorin), Bioflash (Werfen)...Rajouts possibles après le dosage initial
- **Quelques problèmes de spécificités connus** (anti-RNP-A, SSb, SCL70, anti-DNA-biothérapies ou infections) et facilement détectables avec l'IFI en //

Préparateur de lame IFI

- Lecteur code barre (tubes / lames) / Connexion au SIL-middleware : évite les erreurs d'identité patient / inversions...
- Lancement de la série : aucune intervention humaine nécessaire jusqu'à la fin (libère du temps technicien)
- Temps d'incubations respectés du 1^{er} au dernier patient traité
- Lavage des puits et incubation des réactifs optimisée (pas de manipulation, pas de risque d'endommager les cellules)
- Traçabilité des lots réactifs, lames, et opérateurs

Préparateur de lames IFI

- Pipetage efficace sans transfert grâce à quatre aiguilles de pipetage lavables, deux bras robotisés indépendants et un calcul de flux de travail optimal.



- Configuration variable pour différentes exigences de laboratoire : jusqu'à 240 échantillons / 30 lames et 6 plaques ELISA en un seul run.

Lecteur de lames IFI

- Chargement des lames – lecture intégrée des CB / association des positions patients.
- Lecture des CQI – validation par l'opérateur
- Classement négatif / positif +++ (gain de temps)
- IA : Auto-titrage et proposition d'aspect avec niveau d'erreur (en %)
- Validation / lecture par l'opérateur sur écran calibré / traçabilité lecteur.
- Apprentissage/optimisation des habitudes de d'auto-lecture dans le temps (personnalisable)
- Standardisation des lectures +++
- Interface de validation / rajouts personnalisable – connexion à un automate de typage personnalisable (ELISA, immunodot...) > + AADN, ENA, MPO/PR3...

Exemple de lecteur de lame



Accueil > Saisie des résultats > Page de résultats IFI

Dilutions

- 1:160 IgG
- 1:640 IgG
- 1:1280 IgG

Substrats

- HEp-20-10 (HEp-2)

Actions

Aperçu des lames

Lame 5 - Puits 3

BF 230808 AA 34896

SPRINTERXL, 13/04/2024 07:51

EPA, 13/04/2024 10:06

Informations sur le lot

208977 - BRECHEISEN, DENISE (88) ♀

12/04/2024

- JO1 <0.2 AI
- 3_AADN 1 IU/mL

Analyses

- ANA
- ANCA

Résultat qualitatif

- Postif
- Négatif
- Douteux
- Non évaluable

ANA

CLASSIFIER

- Homogène ?
- Moucheté ?
- Nucléolaire ?
- Centromère ?
- Dots nucléaires ?
- Membranaire 2560
- Cytoplasmique ?

Navigation

684041206041

14 patients / contrôles non vérifiés

Ignorer les attributions des utilisateurs

PRÉCÉDENT SUIVANT

A large microscopy image showing green fluorescence in HEp-20-10 cells. The cells are densely packed and show bright green spots, indicating positive results for ANA. The image is displayed in a central window of the software interface.

Automates d'immunodot/blot

- Standardisation des temps d'incubation
- Lecture par caméra calibrée : standardisation des lectures de dot/blot (ce n'est pas l'œil qui lit)
- Maintien dans l'obscurité pdt la technique
- Réduction des manipulations des bandelettes fragiles/ Gain de temps technique.
- Connexion bidirectionnelle – middleware (ATCD...)
- Sauvegarde des résultats /traçabilité des lots
- Permet la recherche/confirmation de marqueurs rares



EUROLineScan - Evaluation

GU

Protocole de DOT 27/04/23
 Effectué par : MAB

Date : 27/04/2023
 Imprimé : 27/04/2023

ID Patient Nom du patient Test N°	EUROLINE / Allergie / EUROASSAY											Western-blot											
	Abréviation											Résultats		Abréviation									
	Intensité											Résultat		Intensité									
	Caract.													Caract.									
1 41930050 Hépatique 2	Et	Co	SLA/LP	LC-1	LKM-1	M2-3E	M2																
	o	***																					
	LEBER2/ 146-16																						
	Et	Co	SLA/LP	LC-1	LKM-1	M2-3E	M2																
	o	***	o	(+)	o	(+)	o																
2 683042634037 Myositis-EL_3	Et	Co	Ro-52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	MI-2										
	o	***	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o										
	MYO 3/ 85-85																						
3 CQ+ CQ+ lot:D230111A0 exp:10/07/24 Hépatique 2	Et	Co	SLA/LP	LC-1	LKM-1	M2-3E	M2																
	o	***	***	***	***	o	o																
	LEBER2/ 146-17																						
4 CQ+ CQ+ ANA_23	Et	Ko	ds70	PCNA	gp210	RP-11	PM75	PM100	CB	CA	Ku	MI-2b	MI-2a	Ssm	SSB	Ro-52	SSA	HI	NUC	dsDNA			
	o	***	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o			
	ANA-23/ 72-43																						

✓ VS

✓ OK

✓ OK

B, S, conjugué lot D230111A0 exp: 10/07/24
 LIVER lot: D230111A0 exp: 10/07/24
 ANA Profil 23 lot: D230314AH exp: 13/09/24
 Myosite lot: D220531A0 exp: 30/11/23

ENA/ANA Profile EUROLINE (IgG)

Bestell-Nr./Order-no.: DL 1590-23 G

Reaktivität der Kontrolle der Testsatz-Charge/ *Reactivity of the control serum included*

in the test kit with Lot no.: D230314AH

: 2024-09-13

Die Charge wurde verifiziert und erfüllt die Spezifikationen.

The lot has been verified and meets the QC-specifications.

Kontrolle/Control	Reaktivität/reactivity visuell/visual	EUROLiNeScan Intensität/intensity
Positivkontrolle/Positive control	SSA pos	> 40
	Scl-70 pos	> 25
	Nuc pos	> 31

Applications en assurance de la qualité

- Méthodes quantitatives (ELISA ++) : CV de répétabilité et de fidélité intermédiaires < 10%, suivi mensuel CV simplifié. Incertitudes de mesures assez simples à calculer (bien que peu pertinentes en auto-immunité) – Traçabilité (opérateurs, maintenance...optimisée)
- Méthodes qualitatives (et semi-quant) : traçabilité, tests de répétabilité et contamination à mettre en œuvre quand même - simples à effectuer (ex des anti-nucléaires, test de répétabilité scanner/caméra lecture des immunoblots). Sauvegardes/archivage des résultats bruts facilités...
- **Habilitation du personnel +++** Tests à effectuer et à archiver/tracer simplement grâce aux logiciels embarqués des automates.
- Choix des programmes d'évaluation externe de la qualité important, pour avoir un groupe de pairs

Interprétation – dialogue clinico-biologique

- = valeur ajoutée – fortement apprécié des généralistes à présent (nombreux prescripteurs). Exemple du LUPUS. > Groupe de travail « Parcours Lupus » créé par le CNR (Strasbourg) dans le but d'améliorer le dépistage et prise en charge. Rôle du biologiste +++
- Mise en place de commentaires sur les CR, avec standardisation d'interprétation des titres d'ANA. En cas de positivité ENA, affichage du % d'association avec telle ou telle maladie uniquement pour le médecin...
- Idéalement mettre en place dans les grands groupes de labo, une politique de transmission des appels à un bio référent en AI pour avis à donner par téléphone aux prescripteurs qui le demandent.

Réunion d'harmonisation (31 Janvier 2023) – Parcours LUPUS – CNR MAI Strasbourg

- **Titre AAN < 1/100-160** : (pour les enfants, le seuil de 1/80eme est recommandé)

Recherche d'ANA négative au [titre]*

En cas de suspicion clinique forte, merci de contacter le biologiste médical pour ajout d'éventuels d'examens biologiques complémentaires.

*En cas de suspicion de polyarthrite rhumatoïde, une recherche de FR et d'ACPA (anti-CCP) est nécessaire.

- **Titre AAN = 1/160** :

présence d'ANA à titre faible*

En cas de suspicion clinique forte, merci de contacter le biologiste médical.

*En cas de suspicion de polyarthrite rhumatoïde, une recherche de FR et d'ACPA (anti-CCP) est nécessaire.

[Selon le laboratoire] : si aspect homogène : ajout automatique anti-ADNn + anti-ENA et adaptation de la conclusion selon les résultats.

- **Titre AAN > ou = 1/320 :**

1) **Recherche d'anti ENA ou anti-antiADNn négative***: positivité de la recherche d'anticorps anti-nucléaires au [titre]. Le profil des anticorps antinucléaires n'oriente pas vers une maladie auto-immune en particulier. Un avis spécialisé est souhaitable en cas de suspicion clinique.

2) **Recherche d'anti ENA ou anti-antiADNn positive***: positivité de la recherche d'anticorps anti-nucléaires au [titre]. Conclusion centrée sur la suspicion diagnostique. Avis spécialisé nécessaire.

*En cas de suspicion de polyarthrite rhumatoïde, une recherche de FR et d'ACPA (anti-CCP) est nécessaire.

[commentaire pour le laboratoire] : Ajout des Ac anti-ENA, quel que soit l'aspect / Si aspect homogène : ajout automatique des anti-DNAn en plus des anti-ENA.

Cas particuliers :

ANA - / anti-ENA+ : Résultats discordants, avis spécialisé nécessaire en cas de suspicion de maladie auto-immune.

Quelques limites - difficultés

- Discordances ELISA / immunoblot : privilégier contexte clinique et titre/Aspect IFI (gold standard). Ajouter des commentaires sur le CR
- La plupart des systèmes sont « fermés »
- Marqueurs rares, examens HN : difficiles à rajouter en ville sans l'accord du patient et sans le contexte clinique

Exemples:

- anti-Ku ou Mi-2 : moucheté fort avec ENA neg.
- anti-synthétase : cytoplasmique avec ENA (et tissus) neg
- anti-fibrillarine (U3-RNP) : nucléolaire fort avec ENA neg
- anti-SP100 : dots nucléaires

Conclusion

- Les progrès techniques/IA et un bon paramétrage informatique permettent d'assurer des délais rapides d'obtention des résultats malgré des volumes croissants de prescription
- Avec un niveau de qualité grandement amélioré (risques d'inversion de patients quasi nul, standardisation des temps d'incubation, des lectures ++)
- Dossiers de validation de méthode facilités, audits externes (COFRAC...) sans craintes, traçabilité efficace des opérateurs et des lots produits.
- Les avis et interprétations sur les CR sont essentiels. Dialogue clinico-biologique+++