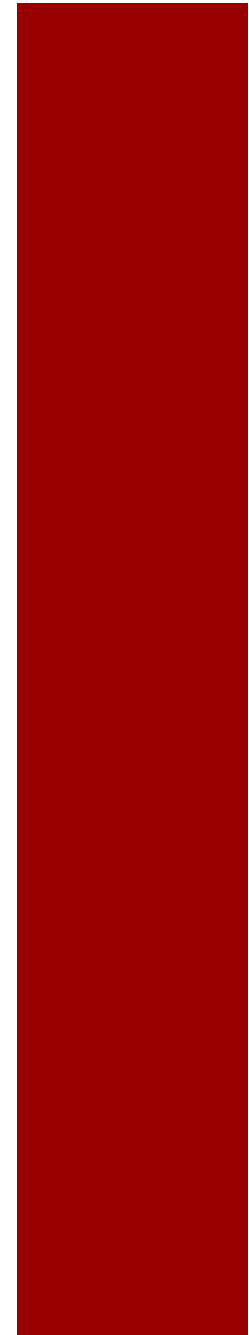




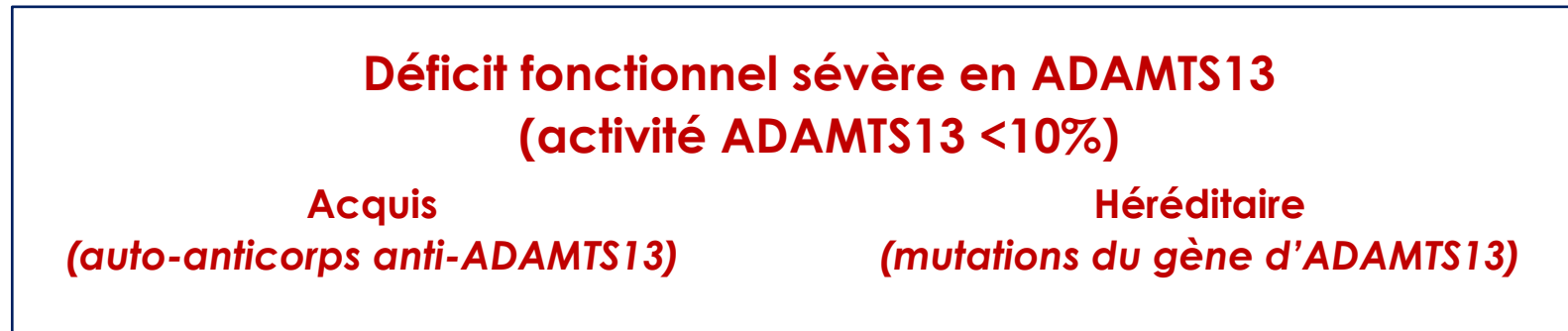
Evaluation du kit Technoclone® pour le dosage de l'activité d'ADAMTS13

CNR MAT
Dr Bérange JOLY
17 octobre 2014

Dosage de l'activité d'ADAMTS13



Physiopathologie du purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

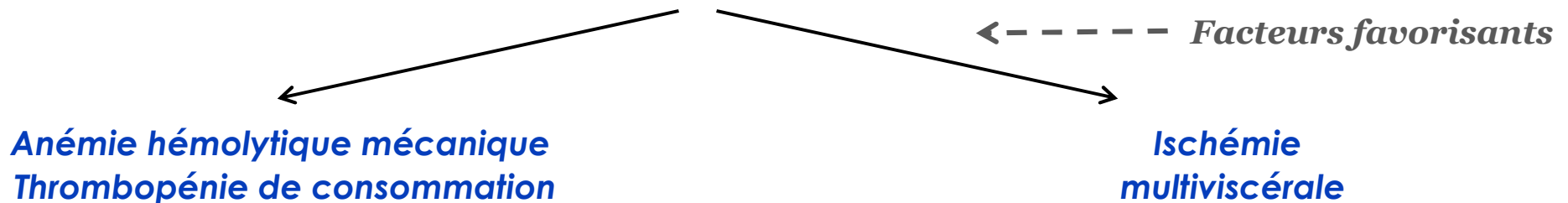


↓

**Accumulation de très grands multimères du VWF très adhésifs
en circulation dans le plasma**

↓

**Formation spontanée de thrombi plaquettaires
dans la microcirculation sanguine**



Dosage de l'activité d'ADAMTS13 (1)



■ Indications

- Devant une suspicion de MAT en phase aiguë, confirmation ou infirmation du diagnostic de PTT
- Suivi biologique en rémission des patients ayant des antécédents de poussées de PTT

■ Recherche clinique => diagnostic médical

■ Multiplicité des techniques de mesure de l'activité d'ADAMTS13

- Méthodes Home made *versus* kits commerciaux
- Substrat utilisé : VWF full-length *versus* peptide VWF73
- Limites et validité des méthodes ? Standardisation

Dosage de l'activité d'ADAMTS13 (2)



■ Conditions pré-analytiques

- Plasma citraté ou sérum
- Si absence de traitement extemporané : congélation à -20°C ou -80°C
- Si traitement sur un site extérieur, envoi dans la carboglace
- Limites
 - Communes à toutes les techniques
 - EDTA : inactivation d'ADAMTS13 *in vitro*
 - Hémolyse : inactivation d'ADAMTS13 *in vitro*
 - Propres aux méthodes VWF full-length : taux VWF:Ag > 300 UI/dl
 - Propres aux méthodes fluorimétriques
 - Autofluorescence de certains plasmas / sérum
 - Hyperbilirubinémie

Dosage de l'activité d'ADAMTS13 (3)

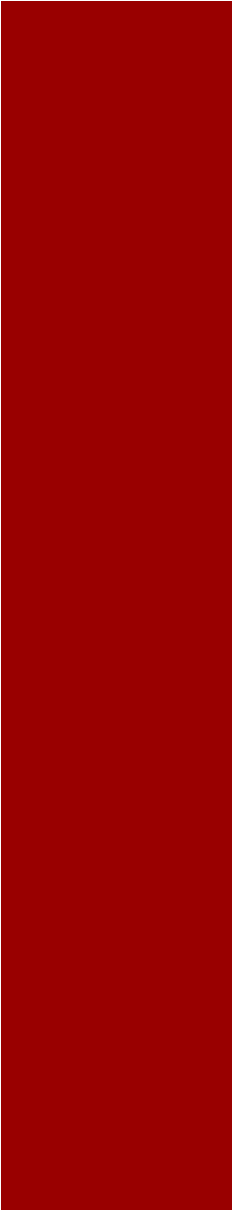


■ Principe

- Dégradation d'un substrat exogène (VWF full-length ou courts peptides de VWF) par l'ADAMTS13 du plasma testé
- Les produits de dégradation du VWF clivé par ADAMTS13 sont mesurés par des techniques :
 - Electrophorétiques (fragments ou multimères)
 - Immunologiques (CBA, VWF:Ag, Chr-VWF73)
 - D'agrégation plaquettaire (VWF:RCo)
 - Fluorimétriques (FRETs-VWF73)
 - De spectrométrie de masse SELDI-TOF

■ Objectifs

- Détection des déficits fonctionnels sévères : activité d'ADAMTS13 < 10%
- Mesure précise des taux d'ADAMTS13 entre 11 et 100%



Evaluation du kit Technoclone® pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13

**Joly B, Stepanian A, Hajage D, Thouzeau S, Capdenat S, Coppo P, Veyradier A
Thrombosis Research, 2014**

Principe de la méthode (1)



TEST PRINCIPE - TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA

1. Plaque coâtée avec des anticorps anti-GST



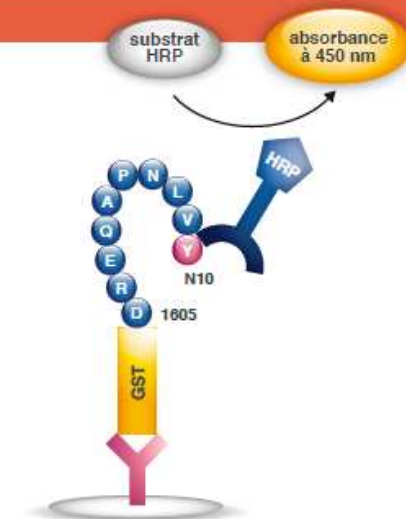
2. Incubation du substrat GST-vWF73



3. Incubation de l'échantillon -> ADAMTS-13 de l'échantillon clive le substrat vWF73



4. Incubation du conjugué HRP et fixation sur le substrat vWF73
Mesure de l'absorbance



Principe de la méthode (2)



- Test chromogénique
- Substrat : GST-VWF73
- 6 Calibrants
- 2 Contrôles (haut & bas)
- Contrôles internes
- Dosages réalisés en duplicate
- Estimation de la durée totale du test :
 - Test ELISA : 4H
 - Calculs, validation technique : 1H
 - Et validation biologique

Résultats (1)

Echantillons testés



Pathologies	Nombre de patients
Sujets normaux	30
Upshaw-Schulman	19
PTT acquis idiopathique	34
PTT acquis secondaire	41
Rémission PTT acquis	52
Autres (<i>SHU, néoplasie, sepsis, dysimmunité...</i>)	71
Total	247

Résultats (2)

Activité d'ADAMTS13 mesurée par FRETs-VWF73

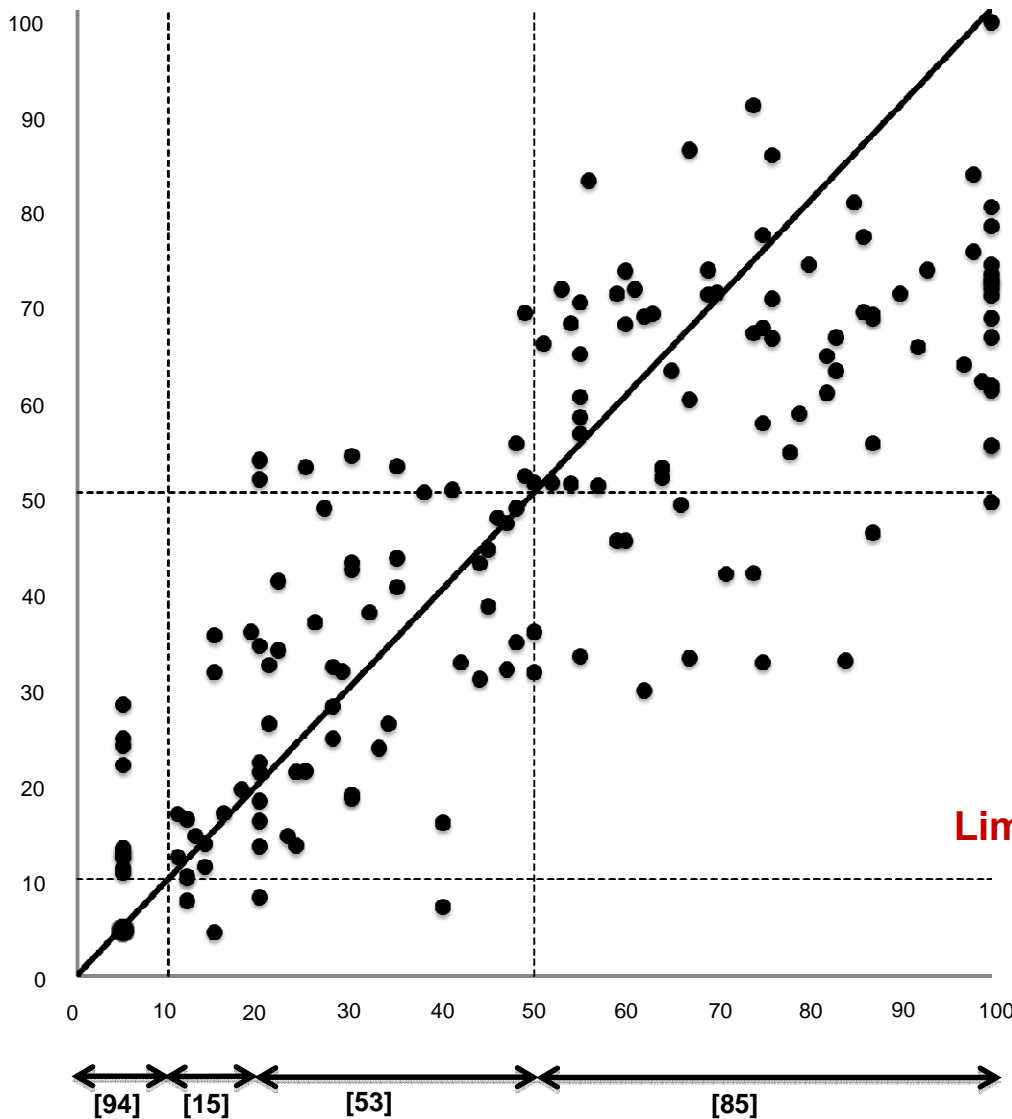


Activité d'ADAMTS13 (FRETs-VWF73)	Nombre de patients
<10%	94
10-19%	15
20-49%	53
50-100%	85
Total	247



ADAMTS13 activity (%)
(Technozym® ADAMTS13 activity ELISA)

→ **Limite de sensibilité : 3%**



----- **Seuil de relevance clinique : 10%**

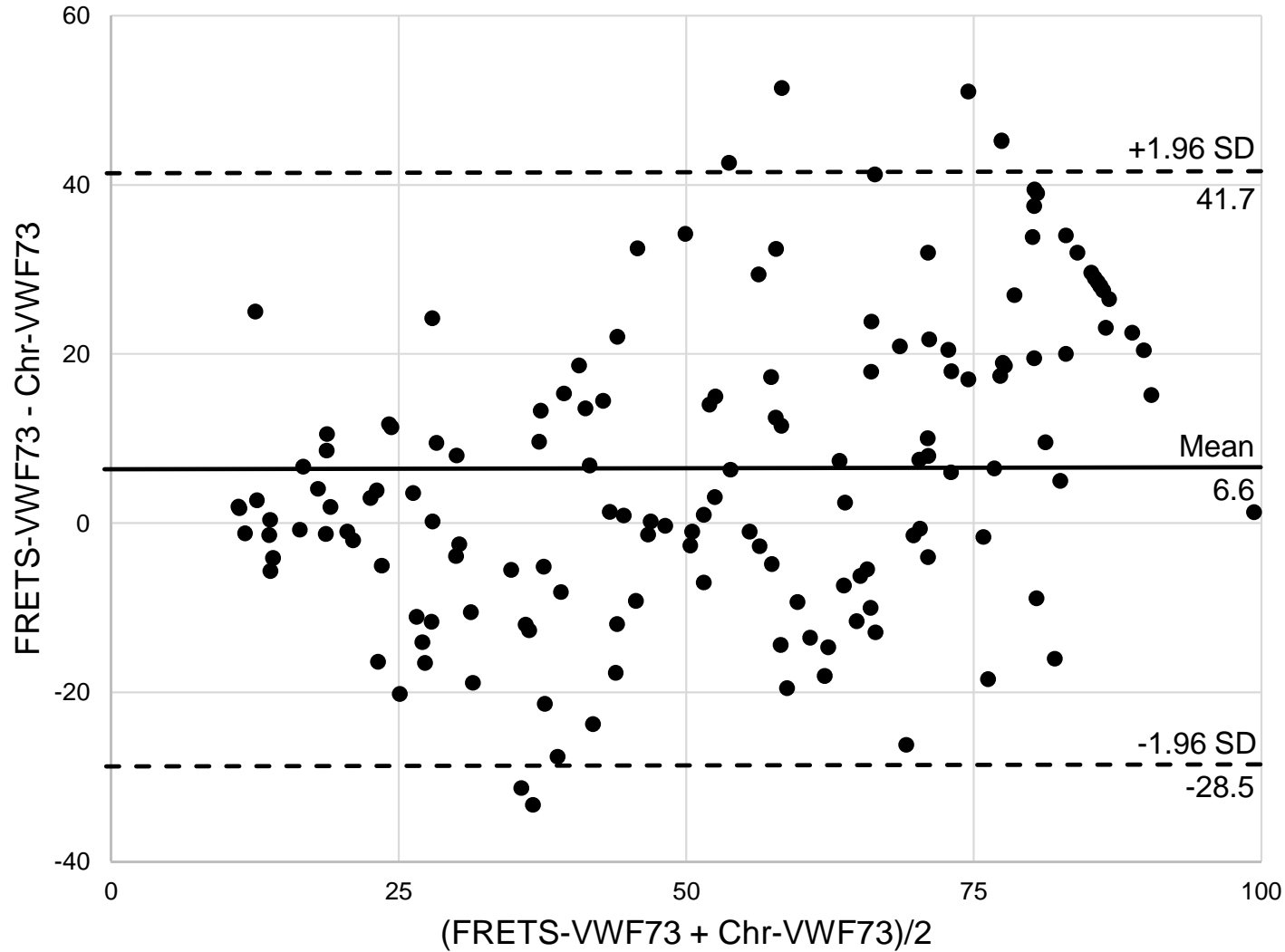
94 échantillons <10% :
 11 discordants (sur-estimés)
68 échantillons entre 11 et 49% :
 4 sous-estimés (<10% !)
 Autres plutôt sous-estimés
85 échantillons entre 50 et 100% :
 Globalement sous-estimés

Limite de sensibilité : 10%

ADAMTS13 activity (%)
In-house FRET-VWF73)

[Number] of tested samples
Total = 247

Graphe de Bland et Altman
149 échantillons dont l'activité d'ADAMTS13 est > 10%



Le test Chr-VWF73 (Technoclone) :

- a tendance à sous-estimer l'act. A13
- mesure des valeurs très dispersées de manière aléatoire

Conclusion



- **Seuil de détection (3%)** bien adapté au seuil de relevance clinique (10%)
- Pistes d'amélioration techniques : ajouter un calibrant (~80%) et des CQ
- **Pour la détection d'une activité d'ADAMTS13 < 10%**
 - assez bonne concordance avec la méthode de référence FRET5-VWF73
 - mais 12% de résultats faux négatifs
 - **Attention à ne pas « manquer » le diagnostic biologique de PTT**
- **Pour la mesure précise d'une activité d'ADAMTS13 >10% (entre 11 et 100%)**
 - tendance à la sous-estimation systématique des valeurs détectables
 - grande variabilité des mesures, de manière aléatoire
 - **Attention à ne pas surestimer le risque de rechute** et par conséquent, l'indication d'une injection préventive de rituximab lors du suivi des patients PTT en rémission clinique

Recommandations du CNR-MAT pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13 à des fins de diagnostic médical (1)



- **Idéalement, la mesure de l'activité d'ADAMTS13 (technique et interprétation) effectuée dans le cadre de la documentation biologique d'une suspicion de MAT :**
 - relève d'une activité biologique experte supraGH dédiée aux maladies rares (plateforme biologique du CNR-MAT)
 - repose en 1^{ère} intention sur la technique FRETs-VWF73
 - doit être contrôlée par une 2^{ème} méthode utilisant un substrat VWF full-length
 - systématiquement pour les patients pédiatriques
 - en cas de discordance avec la présentation clinique ou de problème analytique (autofluorescence par ex.) pour les patients adultes

Recommandations du CNR-MAT pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13 à des fins de diagnostic médical (2)



- **Le kit commercial Technoclone® est le plus performant en 2014.**
- Les utilisateurs doivent cependant en **connaitre les limites** et ne pas hésiter à avoir recours au laboratoire ADAMTS13 du CNR-MAT en cas de doute ou de problème technique et/ou d'interprétation.

Remerciements

Professeur Agnès VEYRADIER

Professeur Paul COPPO

Docteur Alain STEPANIAN

Madame Sandrine BENGHEZAL

Madame Sophie CAPDENAT

Madame Sylvaine SAVIGNY

CNR MAT