

Réunion annuelle du CNR-MAT
18 octobre 2013

Laboratoire ADAMTS13 du CNR-MAT :
Avancées en 2013

Agnès VEYRADIÈRE
Hôpitaux Universitaires Paris Sud

Mesure de l'activité d'ADAMTS13 pour l'aide au diagnostic des MAT : actualisation 2013

. **Rappel : où en étions-nous en octobre 2012 ?**

. **Evaluation du kit Genprobe**

Thouzeau S, Capdenat S, Stepanian A, Coppo P, Veyradier A. Thromb Haemost 2013 sep; 110(4) : 852-3

. **Evaluation du kit Technoclone (Cryopep)**

En cours (mai-octobre 2013). Résultats préliminaires B. Joly

. **Participation à l'étude internationale NIBSC : développement d'un plasma standard International ADAMTS13**

En cours (septembre – décembre 2013).

Activité d'ADAMTS13

Indication pour le diagnostic médical

- . **Devant une suspicion de MAT en phase aiguë, confirmation ou infirmation du diagnostic de PTT (paramètre sensible et spécifique)**
 - dans 95% des cas : non urgent ! Délai préconisé < 10 jours.
 - dans 5% des cas : urgent car nécessité d'ajustement thérapeutique rapide
 - . confirmation diagnostique de PTT pour indication traitement immuno-modulateur si intolérance à la plasmathérapie ou flare-up
 - . diagnostic d'exclusion de PTT pour indication d'eculizumab
- . **Suivi biologique en rémission des patients ayant un(des) ATCD de poussées de PTT (paramètre ayant une valeur pronostique quant au risque de rechute)**

Activité d'ADAMTS13

Méthodes biologiques

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 :

- électrophorétiques (multimères ou fragments)
- immunologiques (CBA, VWF:Ag, Chr-VWF73)
- d'agrégation plaquettaire (VWF:RCo)
- fluorimétriques (FRETTS-VWF73)
- de spectrométrie de masse (SELDI-TOF)

Normes : 50 – 150 %

Objectif principal

Détection des déficits fonctionnels sévères: activité d'ADAMTS13 <10%

Avantages et inconvénients des méthodes selon le substrat VWF utilisé

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Méthodes VWF full-length	<p>Méthodes de référence, évaluées</p> <p>Sensibles à ~toutes les mutations d'ADAMTS13</p>	<p>Longues (plusieurs jours)</p> <p>Interférence du VWF:Ag endogène du patient</p> <p>Non adaptables en kit commercial</p>
Méthodes VWF-73 Home-made	<p>Méthodes de référence, évaluées</p> <p>Rapides (1 journée)</p> <p>Pas d'interférence du VWF:Ag endogène du patient</p> <p>Adaptables en kit commercial</p>	<p>Interférence selon mode de révélation (autofluorescence spontanée)</p> <p>Non sensible à certaines mutations d'ADAMTS13</p>

Corrélation des différentes méthodes

**Méthodes « home made » de référence entre elles (littérature 2006-2010)
(full-length vs full-length et full-length vs VWF-73)**

Littérature -> bonne corrélation inter-méthodes pour le diagnostic des déficits sévères mais discordances pour les déficits partiels et les valeurs normales

Méthodes «home made» versus kits commerciaux récents

**. Etude multicentrique nationale en 2011 pilotée par le CNR-MAT
(12 labos des Centres de Compétences du CNR-MAT, ~10 échantillons)
-> nécessité d'évaluer les kits commerciaux ADAMTS13 act. pour aider les
Laboratoires des Centres de Compétences du CNR-MAT à choisir le meilleur
kit si volonté de développer la technique sur site pour les urgences**

**. Publication récente : Mackie et al, Thromb Haemost janvier 2013
Evaluation des Kits American Diagnostica (Fret-VWF86) et Technoclone (Chr-
VWF73) versus méthode home made frets-VWF73 : 159 échantillons
-> assez bonne corrélation inter-méthodes pour le diagnostic des déficits
sévéres mais discordances pour les déficits partiels et les valeurs normales**

Evaluations menées par le CNR-MAT en 2013

. **Projet initial** : Evaluation en parallèle du kit Genprobe et du kit Technoclone ... mais rupture de stock du kit technoclone pendant 6 mois

. **Finalemment** :

. Evaluation du kit Genprobe au 1^{er} trimestre 2013
Publication en septembre 2013

. Evaluation du kit Technoclone au 3^{ème} trimestre 2013
Publication prévue début 2014

. **NB** : auto-financement des réactifs (pas de conflit d'intérêt)

Evaluation du kit Genprobe pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13 (1)

Principe de la méthode

Dégradation d'un substrat frets-VWF73 par l'ADAMTS13 du plasma testé.
Révélation par fluorimétrie.

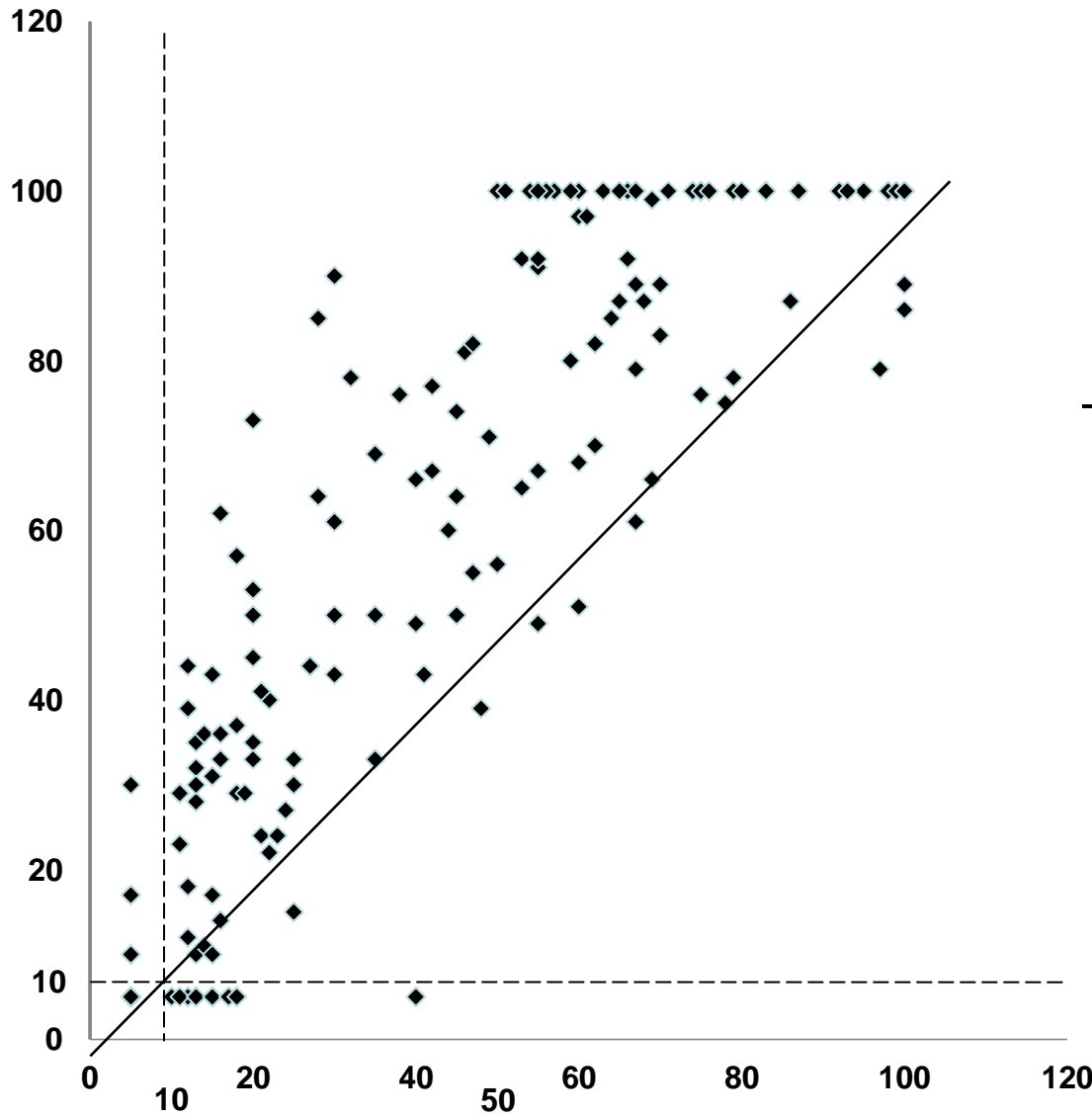
Calibrants et CQ du kit (bas : 16-26% / haut : 47-57%)

CQ internes (PTT < 10%, pool 50%, pool 100%)

Echantillons testés : n = 209

- . 13 PTT héréditaires (USS)
- . 38 PTT acquis en poussée
- . 31 PTT acquis en rémission
- . 97 MAT diverses (SHU, sepsis, cancers, MAI et autres...)
- . 30 sujets sains

ADAMTS13 activity
(ATS-13® Activity Assay) → **Limite de sensibilité : 15%**



Seuil de relevance
clinique : 10%

Limite de sensibilité : 10%

↑
ADAMTS13 activity
(In-house FRETTS-VWF73)

← [51] → [86] → [72] →
[Number] of tested samples
Total = 209

Evaluation du kit Genprobe pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13 (3)

Synthèse des discordances avec le frets-VWF73 de référence

- . Parmi les 51 échantillons <10% : 3 discordants (sur-estimés)**
- . Parmi les 86 échantillons entre 11 et 49% : 65 discordants dont 17 sous-estimés (<10% !) et 48 sur-estimés**
- . Parmi les 72 échantillons entre 50 et 100% : presque tous surestimés**

Evaluation du kit Genprobe pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13 (4)

Conclusion

- . Limites techniques :
Seuil de détection (15%) trop élevé et > seuil de relevance clinique
Calibrants non optimaux
- . Bonne sensibilité pour détecter les taux d'ADAMTS13 < 10%
- . Défaut de spécificité
-> sur-diagnostic de déficit sévère (!) dans 17 cas/65 (~1 cas / 4)
- . Surestimation quasi-systématique des valeurs détectables
-> problème de suivi des patients en rémission +++
(sous-diagnostic d'un début de rechute biologique qui pourrait justifier une
Injection préventive de rituximab ?)

Remerciements

- **Equipe laboratoire ADAMTS13 du CNR-MAT**

Sandrine Thouzeau-Benghezal,

Sylvaine Savigny,

Sophie Capdenat

Paulette Legendre

Dr Martine Wolf

Dr Alain Stepanian

Sandrine Malot

Pr Paul Coppo

Et le CNR MAT

Arbre décisionnel simplifié pour l'investigation d'ADAMTS13

