

Quelques nouveautés et bonnes pratiques en Biologie Médicale

Dr Eric Sevin, Biologiste Médical

Groupe Biolyss



Focalisation sur:

1. CDT et imprégnation alcoolique
2. Pancréatite
3. PR, FR et Anticorps anti CCP
4. Chlamydia trachomatis
5. Un point sur la situation des laboratoires

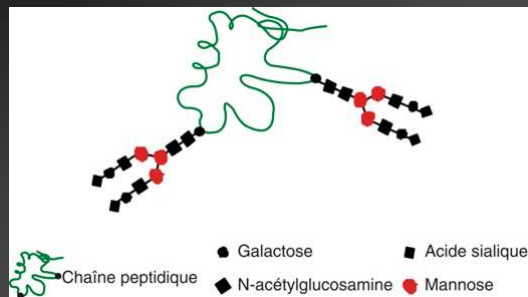
CDT et imprégnation alcoolique



Transferrine

- Transferrine, glycoprotéine présente dans le plasma et de synthèse hépatique.
- Comporte de nombreuses isoformes, de composition variable en résidus glucidiques, en particulier acide sialique.
- Physiologiquement: on retrouve surtout des formes penta et tétrasialylées

Schéma de la transferrine



CDT: définition

- La somme des isoformes à 2, 1 et 0 acides sialiques est appelée CDT = carbohydre déficient transferrin (ou transferrine désialylée)
- L'acide sialique étant un sucre acide, sa perte rend la protéine moins acide, et modifie son point isoélectrique, propriété utilisée pour son dosage (CDT= protéines dont le $pI > 5.7$)

CDT: définition (2)

- La méthode de dosage la plus performante est l'électrophorèse capillaire (séparation des analytes en fonction de leurs taille et charge, sous l'action d'un champ électrique d'électroendosmose)
- Les résultats sont exprimés en % de la somme des formes à 0, 1 et 2 acides sialiques, par rapport à la somme de l'ensemble des fractions.
- Ce mode d'expression permet de s'affranchir des variations physiopathologiques de la transferrine

Intérêt en pathologie

- Alcoolisme chronique → modification de la répartition des isoformes sialylées
 - Augmentation relative des fractions hypo ou désialylées
 - Au détriment des formes tétra ou pentasialylées
 - Mais la concentration de transferrine totale reste normale
- Marqueur d'atteinte hépatique chronique liée à la consommation chronique d'alcool à forte dose
- Effet seuil à 60-80 g d'alcool/j (=6-8 verres). Augmentations moins franches en dessous.
- Les variations sont le reflet d'une situation cumulée, et non instantanée
- La désialylation étant réversible, le CDT est intéressant dans le sevrage

CDT, marqueur de consommation alcoolique

- Le meilleur outil diagnostique d'une consommation excessive et prolongée d'alcool
- Plus spécifique que GGT et VGM, soumis à d'autres causes de variation

CDT, marqueur de consommation d'alcool

- Taux pathologique (>1.7%)
 - apparaît dès 1-2 semaines de consommation excessive
 - GGT: 3 semaines
 - VGM: 1 mois
- Sevrage
 - CDT redevient normal à 2-4 semaines
 - GGT: 2 mois
 - VGM: 3 mois

CDT, marqueur de consommation d'alcool

- Rares faux positifs
 - Anomalie génétique rare (variants): dépistée par électrophorèse capillaire
 - Insuffisance hépatique sévère, carcinomes, VHC
- Mais la spécificité reste > 90%

CDT, marqueur de consommation d'alcool

- Biolyss réalise le dosage 2 fois par semaine, par électrophorèse capillaire
- Sur sérum (Tube sec à bouchon rouge ou jaune)
- Remboursé. Cotation B55 soit 14.85 €

Amylase ou Lipase ?



Pancréatite aiguë?

- La biologie aide au diagnostic en dosant les enzymes pancréatiques
 - Laquelle faut il doser ? Amylase ou Lipase?
 - Les deux enzymes sont elles équivalentes ?
 - Quels sont les seuils décisionnels?

Amylase

- Sécrétée par le pancréas mais aussi par les glandes salivaires
- Elle hydrolyse l'amidon.
- Sa spécificité dans le diagnostic de pancréatite n'est pas bonne.
- Une augmentation $> 3N$ est considérée significative.

Lipase

- d'origine essentiellement pancréatique,
- libérée par le tractus digestif pour la digestion des lipides.
- Sa spécificité dans le diagnostic de pancréatite est bonne
- Une augmentation $> 3N$ dans les 48h suivant les symptômes associée à une douleur abdominale aiguë évocatrice suffit à confirmer le diagnostic de pancréatite aiguë.

Les cinétiques sont différentes

	Augmentation	Pic	Normalisation
LIPASE	4 à 8 heures	24 heures	8 à 14 jours
AMYLASE	2 à 12 heures	48 heures	3 à 5 jours

L'amylase n'a pas d'intérêt dans l'indication de pancréatite aiguë

- La lipase atteint son pic sanguin plus rapidement que l'amylase, et sa cinétique d'élimination est plus lente: la lipasémie, contrairement à l'amylasémie, peut donc détecter une pathologie pancréatique dans sa phase tardive
- Lorsque la lipasémie est normale, il n'a jamais été observé d'amylasémie élevée en cas de pancréatite
- La sensibilité de l'amylasémie est faible pour les pancréatites alcooliques et hypertriglycéridémiques
- Sa spécificité est faible: de nombreuses affections non pancréatiques associent douleurs abdominales et hyperamylasémie

→ En cas de prescription d'amylase, seule la lipase est dosée.
Amylase déremboursée (prescription motivée nécessaire)

A retenir

- 1. La lipasémie a une efficacité diagnostique supérieure à celle de l'amylasémie pour le diagnostic de pancréatite aiguë
- 2. Le diagnostic d'une pancréatite aiguë est établi en présence d'un tableau clinique évocateur et d'une élévation de la lipasémie $> 3N$
- 3. En cas de lipase $< 3N$, il faut tenir compte du délai écoulé entre le début des signes cliniques et le dosage de lipase
- 4. Le diagnostic est à réaliser le plus tôt possible, idéalement $< 48h$
- 5. L'association des 2 dosages amylase et lipase n'apporte rien par rapport à la lipase seule

Polyarthrite rhumatoïde: l'apport de la biologie



Polyarthrite rhumatoïde

- La PR est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent chez l'adulte. Prévalence en France: 0,3%
- Intérêt du diagnostic précoce car un traitement de fond institué précocement peut contrôler l'activité de la maladie et freiner l'atteinte structurale
- La décision de mise en route du traitement repose sur
 - le degré d'activité évalué par l'intensité du syndrome inflammatoire (VS, CRP),
 - l'existence d'érosions osseuses
 - et la présence dans le sérum de FR et d'Ac anti CCP
- Etiologie multifactorielle
 - Facteurs endogènes: HLA, hormonaux (grossesse)
 - Facteurs exogènes: tabac, facteurs environnementaux (germes), psychologiques (choc déclenchant)

PR: rappel clinique

- Pathologie:
 - polyarthrite bilatérale généralement symétrique caractérisée par une raideur matinale (poignets, interphalangiennes, métacarpophalangiennes, métatarsophalangiennes).
 - Evolution par poussées.
 - Phase d'état: atteintes articulaires de mains (déformations caractéristiques) , des poignets, des pieds. Toutes les autres articulations synoviales peuvent être touchées.
 - Atteintes extra-articulaires (altération de l'état général, nodules rhumatoïdes, adénopathies superficielles, atteintes cardiaques, rénale, pulmonaires, oculaires...)

Diagnostic de la PR

- Critères **radiologiques**
 - Images radiologiques typiques d'érosion
 - Mais diagnostic tardif car seulement au stade où l'érosion est déjà observable
- Critères **cliniques**
 - Douleurs articulaires plutôt bilatérales et symétriques,
 - Articulations chaudes et gonflées
 - Raideur matinale
 - Mais ces symptômes ne sont pas spécifiques de la PR (diagnostic différentiel: polyarthrite bactérienne, arthrite réactionnelle (post infectieuse), connectivite (lupus...), maladie de Horton...)
- Critères **biologiques**
 - Syndrome inflammatoire avec augmentation de la CRP et de la VS
 - Marqueurs sérologiques de la PR: FR et Ac anti CCP

Facteurs rhumatoïdes (1)

- = auto anticorps de classe IgM, polyclonaux, dirigés contre le fragment Fc des IgG humaines et animales
- Terminologie:
 - FR= facteur rhumatoïde=IgM anti IgG
 - Latex et Waaler Rose= noms de technique passés dans le langage courant pour désigner le FR, mais qui sont des techniques historiques d'agglutination sur lame (particules de latex sensibilisées par des IgG humaines, hématies de mouton sensibilisées par des IgG de lapin)
 - Pour ces techniques anciennes:
 - Latex: sensibilité 70% , spécificité 80%
 - WR: sensibilité 60%, spécificité 85%
 - = performances insuffisantes...

Facteurs rhumatoïdes (2)

- Les nouvelles techniques = ELISA ou néphélométrie
 - Sensibilité et spécificité 85%
- La présence de FR ne signifie pas PR:
 - Nombreuses pathologies auto immunes, inflammatoires, infectieuses: Gougerot-Sjögren (70%), LES (25-40%), sclérodermie (20-30%), PAN (10-20%), maladie auto immune du foie (10-50%), cryoglobulinémie mixte (100%), endocardite infectieuse (30-50%), leishmaniose (50-80%), hépatite C chronique (50-75%), syphilis (15-25%), infections virales (EBV...: 20-60%)
 - Mais aussi sujets sains: 1% avant 30 ans, 5% de 30 à 65 ans, 15% après 65 ans

Anticorps anti CCP: définition

- = anticorps anti peptides cycliques citrullinés
- Plusieurs auto anticorps appartiennent à cette famille: anti périnucléaires (1964), anti kératine (1979), anti filaggrine (1990)
- Sous l'influence de la PAD (peptidyl-arginine-désiminase), présente dans les synoviocytes et les cellules inflammatoires, l'arginine des peptides des chaînes α et β de la fibrine et du fibrinogène est oxydée en citrulline. Cette réaction est hétérogène et dépend du groupe HLA et du type de PAD. Ces peptides modifiés sont les cibles antigéniques véritables de la réaction immunologique et entretiennent l'inflammation locale. Ils sont la cause de la maladie rhumatologique.

Anticorps anti CCP: définition (2)

- Utile au diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde, à côté du facteur rhumatoïde
- Aussi sensible que le FR
- Mais **beaucoup plus spécifique (spécificité 99%)**
- Bonne valeur prédictive de PR, apparition avant les symptômes cliniques

Anticorps anti CCP: leur intérêt

- Coexistence Ac anti CCP + FR
 - Hautement prédictive de PR
 - Corrélé au développement ultérieur d'érosions osseuses
- Parcontre:
 - Taux non corrélé à la gravité de la maladie
 - Pas utile pour suivre la réponse au traitement

Anticorps anti CCP

- Biolyss les réalise tous les deux jours
- Sur Sérum (tube sec (bouchon rouge ou jaune))
- Remboursé. Cotation B60, soit 16.20€

Chlamydia trachomatis



Les Chlamydiae

- Il y a quatre espèces de Chlamydia :
 - Chlamydia **trachomatis** (19 sérovars) et **pneumoniae** pathogènes principalement pour l'Homme
 - Chlamydia **pecorum** et **psitacci** pathogènes plus particulièrement pour l'animal.
- L'infection à Chlamydia trachomatis est considérée comme la pathologie bactérienne sexuellement transmise ayant la prévalence la plus élevée au monde (sérovars de D à K)

Chlamydia trachomatis et IST

- Chez l'homme
 - Principale étiologie des urétrites non gonococciques (souvent a- ou pauci-symptomatique)
 - Cause majeure d'épididymite aiguë
- Chez la femme
 - peut être à l'origine de
 - cervicites mucopurulentes,
 - algies pelviennes chroniques, périhépatites
 - salpingites aiguës.
 - Si ces infections ne sont pas diagnostiquées, elles peuvent être à l'origine de
 - grossesses extra utérines
 - stérilités

Chlamydia trachomatis: autres pathologies

- Maladie de Nicolas-Favre ou lymphogranulomatose vénérienne (LGV)
 - très répandue dans les régions tropicales et sporadique dans les pays industrialisées (sérovars L1, L2, L3).
- Chez le nouveau né,
 - peut être transmise lors du passage dans la filière génitale infectée entraînant alors une conjonctivite à inclusions ou une pneumopathie.
- Chez l'adulte,
 - conjonctivites à inclusions dues à des souches génitales de Chlamydia.
 - Le trachome est la forme la plus répandue dans les pays en voie de développement. Il s'agit d'une kératoconjonctivite chronique d'origine immunitaire aboutissant à une cécité à terme (sérovars A, B, C)

Le problème...

- Pathologie OCCULTE (50-60% des cas)
→ importante prévalence
- Diagnostic biologique délicat ...
 - un examen faussement positif peut conduire à des décisions inappropriées.
 - A l'inverse, un résultat faussement négatif peut être à l'origine d'atteintes irréversibles en particulier chez la femme (stérilité) et chroniques

Chlamydia trachomatis quels outils diagnostiques ?

- Diagnostic au laboratoire
 - Tests antigéniques rapides: décevants
 - Sérologie: difficilement utilisable pour diagnostiquer une infection aiguë
 - Amplification génique: PCR



Excellente sensibilité
Excellente spécificité

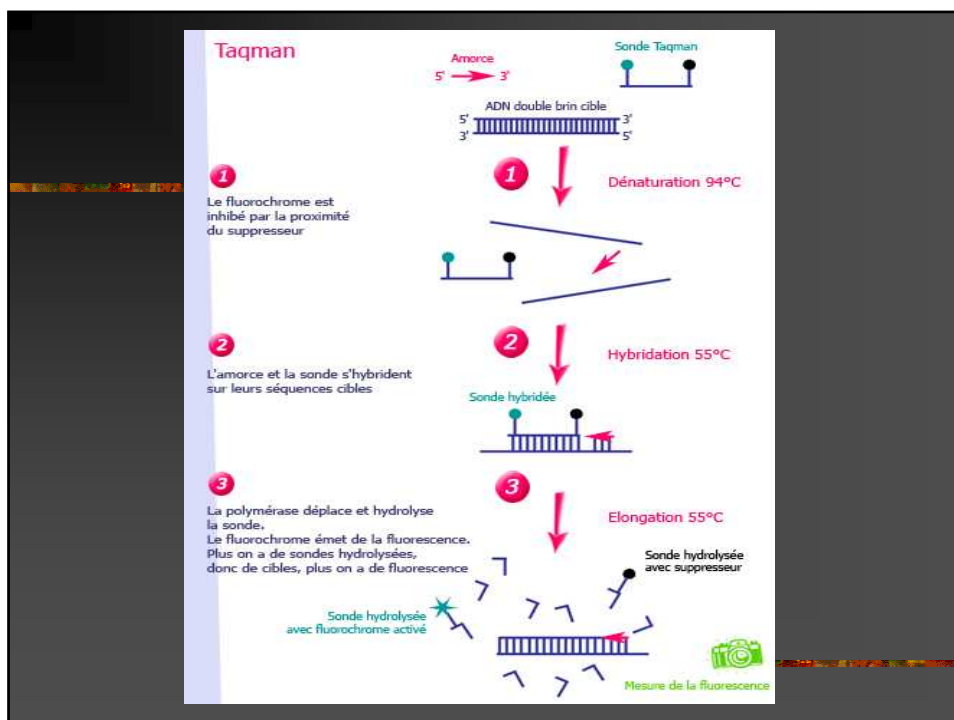
LA technique à utiliser pour détecter les *Chlamydia*

La PCR en temps réel

- La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique
 - amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique
 - mais avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.
- A chaque cycle d'amplification,
 - la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.
 - Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN
 - alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

La méthode Taqman

- Les sondes sont marquées
 - à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter)
 - et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher), qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre
- Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase.
- Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées
- Cette technique est très sensible, très spécifique, et rapide



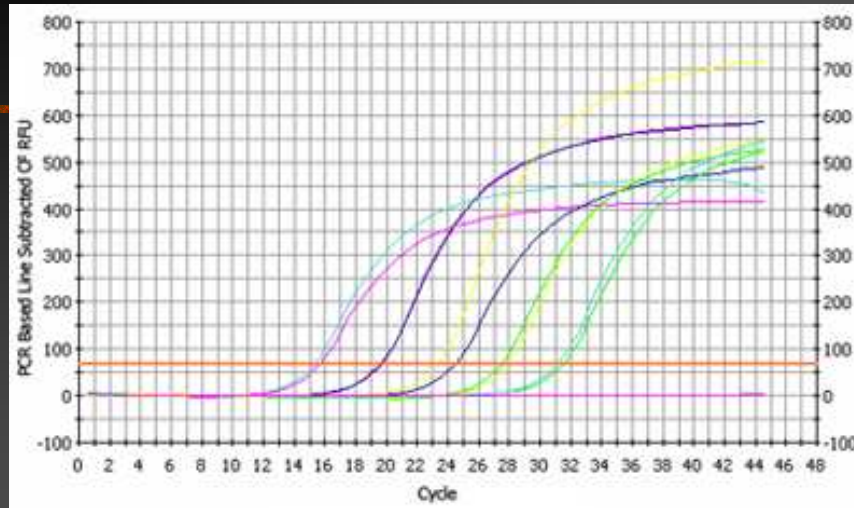
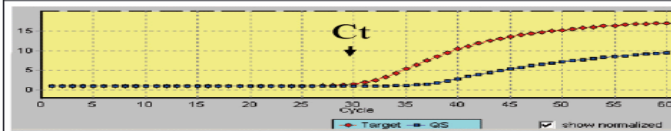
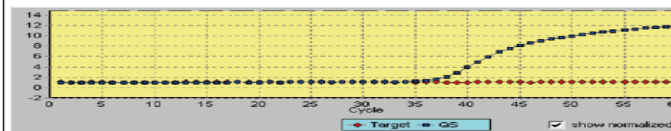


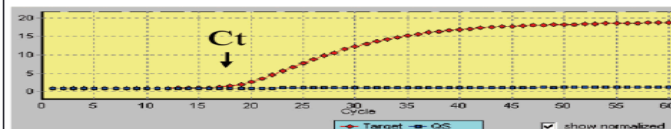
Figure 1 / Exemples d'analyse des résultats obtenus avec le Cobas TaqMan[®].



Echantillon positif
Ct = 30
CI positif



Echantillon négatif
CI positif



Echantillon positif
Ct = 18
CI négatif
Ct = cycle threshold

Trois cas de figure sont présentés, le 1^{er} et le 3^e étant des échantillons positifs (courbe rouge), le deuxième un résultat négatif interprétable puisque le contrôle interne (CI) est positif (courbe bleue). Dans le premier cas, le cycle seuil (Ct) est égal à 30 tandis que celui du troisième cas est égal à 18. Le différentiel est de 12 cycles, ce qui représente une charge bactérienne 1 000 à 10 000 fois plus importante dans le cas 3, sachant qu'il faut théoriquement 3,32 cycles pour obtenir 10 copies à partir d'une copie.

Comment prescrire ?

- La recherche de Chlamydia doit être explicitement prescrite dans le cas des
 - conjonctivites,
 - urétrites,
 - prélèvements coelioscopiques,
 - spermes
 - Stérilets
- Pour les prélèvements chez la femme, la recherche de Chlamydia peut être effectuée à l'initiative du biologiste
- Pour les prélèvements urétraux chez l'homme, la recherche est systématique

Quels prélèvements ?

- Chez l'homme :
 - Urétral
 - Sperme
 - Urine (premier jet urinaire)
- Chez la femme :
 - Endocervical
 - Urétral
 - Stérilet
 - Urine (premier jet urinaire).

Quels prélèvements ? (2)

- La qualité du prélèvement est capitale: riche en cellules pour sensibiliser la recherche.
 - Les échantillons sont prélevés par écouvillonnage
 - Kit de prélèvement spécifique (Micro Test M4RT) , qui comprend
 - un tube conique fermé et stérile contenant 3 ml de milieu de transport avec des billes de verre,
 - un écouvillon tige plastique (femme)
 - et un écouvillon tige inox (homme).
- Prélèvement à distance de tout traitement antibiotique (au moins quinze jours)
- pour les prélèvements urétraux et urinaires : le patient ne doit pas uriner dans les deux heures précédant l'analyse
- dans tous les cas le prélèvement doit être acheminé le plus rapidement possible au laboratoire.

Chlamydia trachomatis par PCR

- Technique réalisée par le laboratoire Biolyss deux fois par semaine
- Remboursé B 85 (22.95 €)

La situation actuelle des laboratoires

- Biologie:
 - contribue à l'élaboration de 60% des diagnostics
 - Pèse 2.4% de la consommation de soins
- Nouvelles contraintes depuis la loi de janvier 2010
 - Preuve de la démarche d'accréditation avant 2013 (ou 2016?)
 - Accréditation avant 2016 (ou 2018 ?)
- Contexte économique défavorable: Pression économique continue depuis 6 ans
 - baisse des tarifs
 - augmentation des charges

Solutions ?... Se regrouper

- Pérenniser les laboratoires
 - Regrouper les activités
 - Meilleure maîtrise des dépenses
- Emmener le groupe à l'accréditation. Sans accréditation ... on ferme !
- Éviter un impact sur les salariés
- Éviter l'arrivée des fonds financiers
 - Détiennent déjà >25% des labos en France
 - Ne visent que la rentabilité à court terme: étouffement des biologistes, coupes dans les frais de structure, fermeture des sites les moins rentables
 - = le contraire de la bonne prise en charge des patients...



Merci de votre attention

Groupe Biolyss