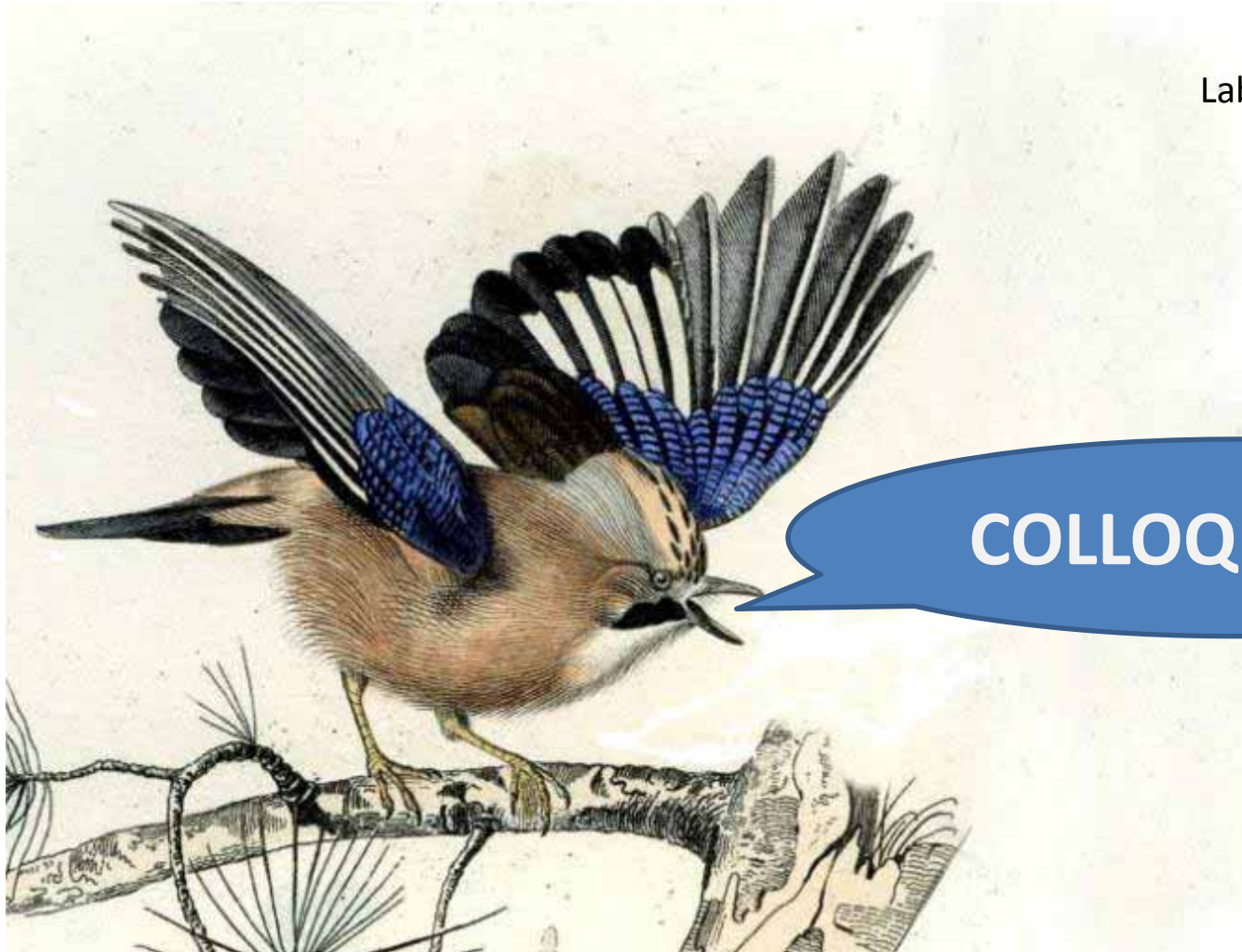


RIA versus ELISA en autoimmunité

F. Fortenfant
Laboratoire d'Immunologie
CHU TOULOUSE



COLLOQUE 2012

Historique

- Roz Yalow et Solomon Berson, Arthur Bauman
- Marquage de l'insuline par I¹³¹, étude métaboliques

INSULIN-I¹³¹ METABOLISM IN HUMAN SUBJECTS: DEMONSTRATION OF INSULIN BINDING GLOBULIN IN THE CIRCULATION OF INSULIN TREATED SUBJECTS¹

By SOLOMON A. BERSON, ROSALYN S. YALOW, ARTHUR BAUMAN,² MARCUS A. ROTHSCHILD,³ AND KATHARINA NEWERLY

(From the Radioisotope Service, Veterans Administration Hospital, Bronx, N. Y.)

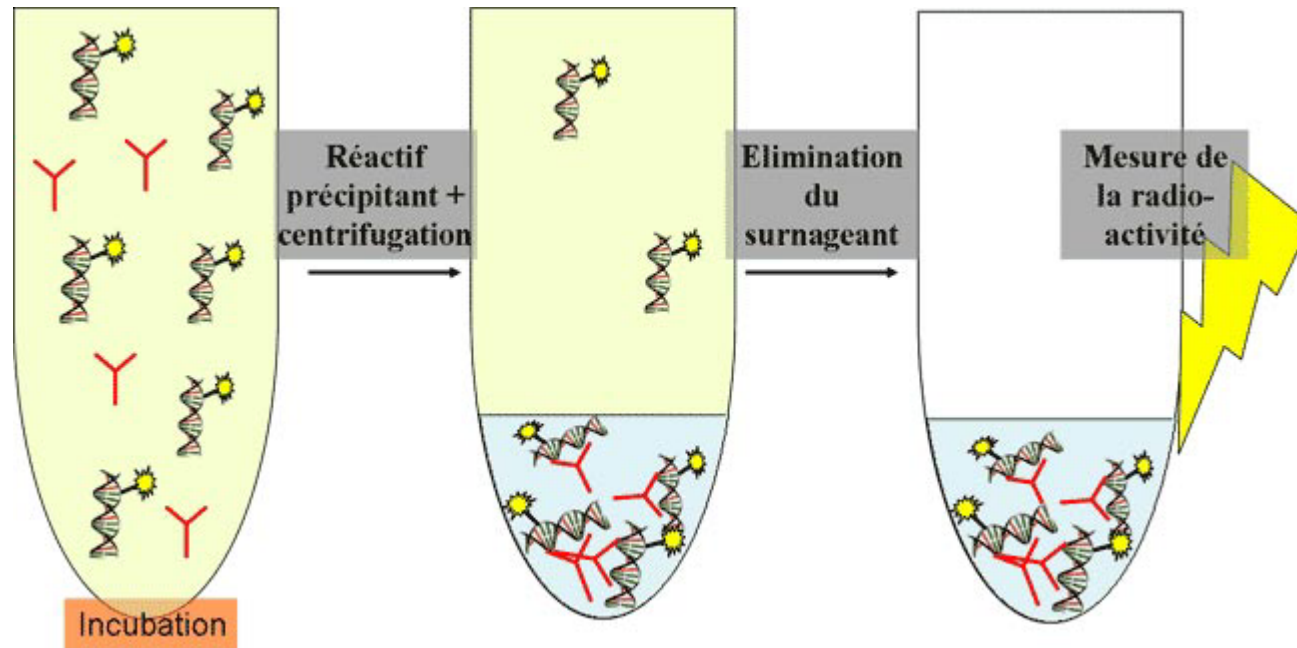
(Submitted for publication August 22, 1955; accepted October 17, 1955)

In recent tracer studies utilizing I¹³¹ labeled insulin, *in vivo* and *in vitro* metabolic degradation of the labeled insulin has generally been presumed to parallel the disappearance of protein precipitable radioactivity and the appearance of non-precipitable radioactivity (1, 2). The present investigations were prompted by the paucity of data on the metabolic fate of insulin in human subjects and the need for a more specific identification of insulin-I¹³¹ in blood and tissues than has heretofore been employed. The methods developed during this study have permitted quantitative evaluation of the rate of insulin-I¹³¹ metabolism and have led to the discovery of an insulin-transporting globulin in the blood of insulin treated subjects.

manipulations involved in iodination even with preparations containing as many as 2 iodine atoms per molecule insulin of 23,000 M.W., which has been suggested as the functional unit of hormonal activity (5). For most of the *in vivo* experiments presented here, the labeled insulin contained an average of 0.1 to 0.5 iodine atoms per molecule 23,000 M.W. insulin.

The specific activity of the labeled insulin at the time of use ranged from 1.0 μ c to 7.5 μ c I¹³¹ per microgram insulin. Doses of 15 to 200 μ c containing 0.1 to 7.0 units of insulin were administered intravenously to human subjects and urine collections and heparinized blood samples were taken at intervals thereafter. On the first day of the studies, insulin was withheld from patients receiving daily insulin therapy except in the case of schizophrenic subjects undergoing insulin shock treatment. Assays of radioactivity were carried out on urine, plasma and packed erythrocytes and on the filtrates and washed precipitates of plasma treated with cold 10 per cent tri-

Principes appliqués à l'autoimmunité



- Méthode, par compétition, en excès d'antigène
- Signal diminue en fonction de la quantité d'élément à doser
- Si phase liquide, séparation Ac libre et Ac lié par précipitation (sulfate d'ammonium, PEG, ...) et centrifugation

RIA avantages et inconvénients

- AVANTAGES

- Spécificité
- Détection d'Ac de haute affinité
- Sensibilité
- Quantitatif



- INCONVENIENTS

- Gestion des déchets
- Normes strictes de sécurité pour les locaux et agréments
- Formation du personnel sur règles de protection
- Surveillance médicale annuelle
- Matériel spécifique
- Décroissance activité du radioélément, livraison après marquage
- Automatisation partielle

Evolution

- Expansion jusque dans les années 1980 du fait de la grande sensibilité
- Puis remplacement par techniques froides et automatisation plus importante
- Indications restantes
 - Endocrino : remplacé par techniques froides pour la plupart
 - Les Ac anti-récepteurs (demandes faibles)
 - Test de Farr : discuté

Anticorps anti-GAD

- Anti-GAD : meilleure sensibilité et spécificité (en ELISA qu'en RIA
 - (diabète nouvellement diagnostiqués : sensibilité 84% pour une spécificité à 98%))
 - Rahmati K, 2008, Clin Lab
 - Torn C, 2008, Diabétologica
- Anti-IA2 : sensibilité équivalente en RIA et ELISA
- Standardisation (Torn C, 2008, Diabetologica)

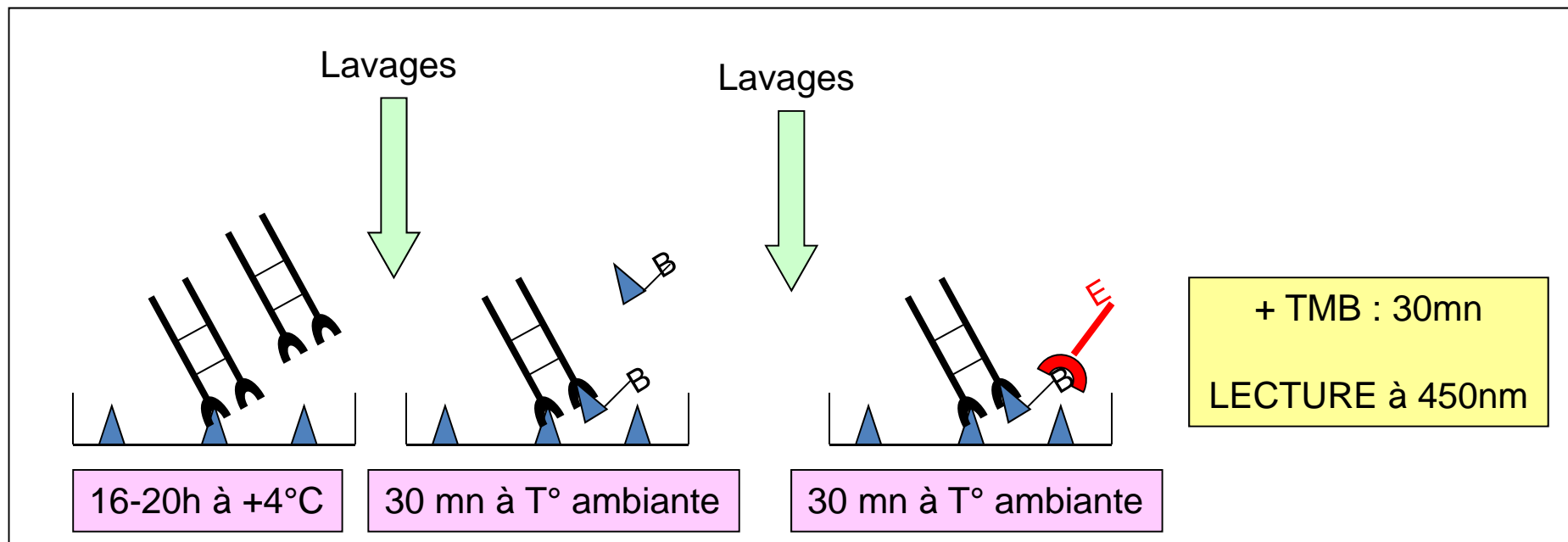
Anti-GAD

- Comparison tests en RIA et 2 ELISA
 - Concordance 98% entre les 2 ELISA
 - Concordances 86% entre ELISA et RIA
 - Discordants : taux faibles en RIA ou ELISA

		ELISA		
RIA		N	P	Total
N		8	6	14
P		5	59	64
Total		13	65	78

Ac anti-ilots positifs

Ac anti-ilots négatifs (4) positif pour 1



Time-resolved Fluorometric Assay for Detection of Autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65)

MATTI ANKELO,^{1*} ANNETTE WESTERLUND-KARLSSON,¹ JORMA ILONEN,² MIKAEL KNIP,^{3,4} KAISA SAVOLA,⁵ PASI KANKAANPÄÄ,⁶ LIISA MERIÖ,⁶ HARRI SIITARI,⁶ and ARI HINKKANEN¹

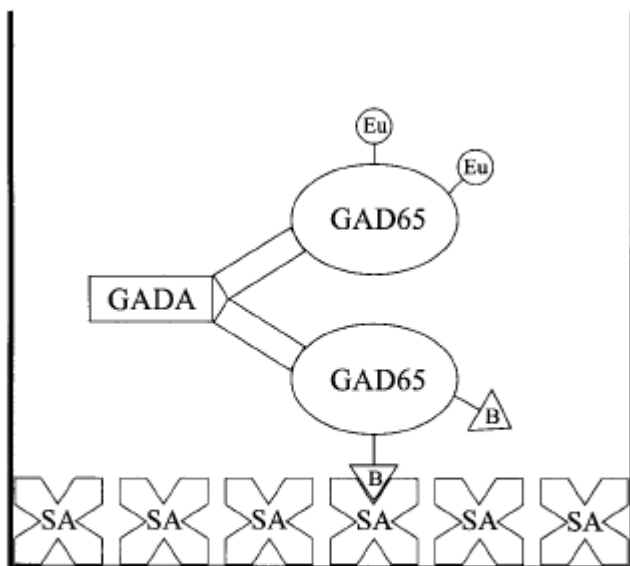


Fig. 1. Schematic of the GADA time-resolved fluorometric assay.

In the first incubation, biotin (B)-labeled GAD65 is bound to streptavidin (SA) coating. Autoantibodies in the sample recognize the antigen in the second incubation and are detected by europium (Eu)-labeled GAD65 in the third phase of the assay.

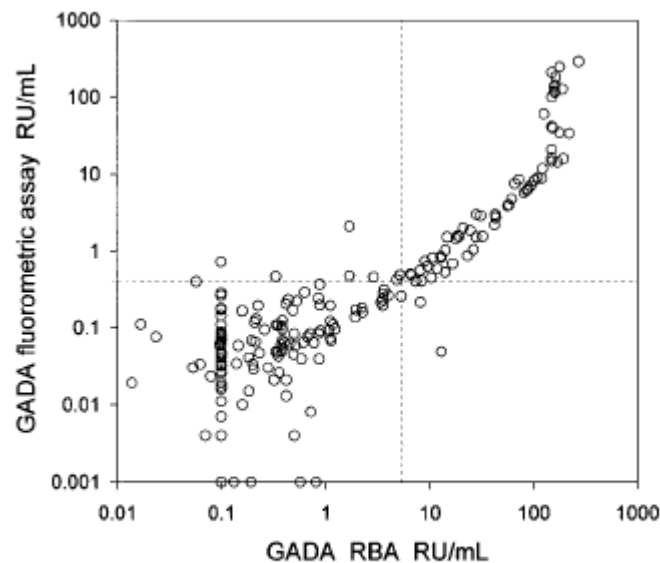


Fig. 5. Comparison of GADA results detected by time-resolved fluorometric assay and RBA.

Dashed lines indicate the cutoff values for both assay methods. $r = 0.731$; $n = 200$.

Ankelo M., 2003, Clin Chem

Anti-récepteur à la TSH

- Indications :
 - Diagnostic de maladie de Basedow
 - Évaluation risque d'hyperthyroïdie néonatale
 - Suivi et pronostic
 - Autres : Dc exophtalmie endocrine chez patients avec euthyroïdie, thyroïdites silencieuses
- Domaine extracellulaire:
 - extrémité N-terminale
 - site de liaison à la TSH et aux Ac stimulants
- L'évolution des tests :
 - Historiquement : tests fonctionnels
 - Tests en phases liquides
 - Tests en phase solide
 - M 22: Ac monoclonal stimulant d'origine humaine

Le dosage des Ac anti-récepteurs à la TSH

- Test en phase liquide
 - TSHRs solubilisés par détergents d'origine bovine (Shewring et Rees Smith 1982)
 - TSHRs recombinante d'origine humaine (Kakinuma 1990) :
 - Performances identiques (sensibilité : 80% spécificité proche de 100%)
 - Début de standardisation (MRC B61/122;LATS)
- Tests en phases solides
 - Ac monoclonaux anti-TSHRs
 - Immobilisation TSHRs sur phase solide (tubes ou microplaques)
 - Ag porcin ou humain
 - En RIA ou froid (luminescence ou ELISA)
 - Calibration IRP (NIBSC 90/672)

Le dosage des Ac anti-récepteurs à la TSH

- Comparaisons
 - Meilleure sensibilité (fonctionnelle et diagnostic) des essais en phase solide
 - Isotopique /EIA : performances équivalentes (humain recombinant isotopique vs porcin natif en EIA biotinylé)
- Ac monoclonal M22 et automatisation
 - Nouveau test automatisé : cut off 1.75 UI/L sensibilité 99% (95% au début non traité) spécificité 99%
 - Problèmes de variabilité interlots
 - Positif à titre faible dans Basedow avec hypothyroïdie

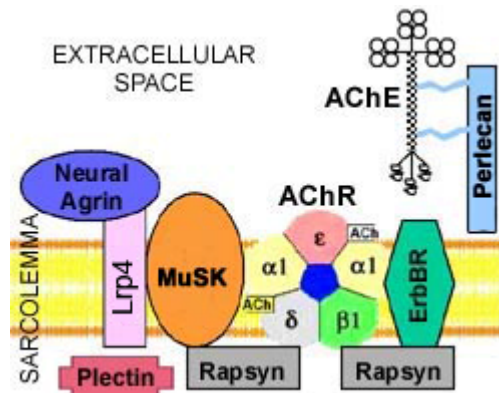
Myasthénie : Ac anti-récepteur nicotinique à l'acétyl-choline (nAChR)

- Récepteurs
 - Canal ionique, pentamères de 9 sous unités protéiques possibles
 - Site antigénique principal au niveau du domaine extracellulaire (région MIR de la sous unité alpha (AA 3 à 120))
- Les autoanticorps :
 - Ac bloquants, réagissant avec le site de liaison du récepteur à l'Ach
 - Titre varie d'un sujet à l'autre; pas d'intérêt pronostic
- Le test : AchR complexés à α -bungarotoxine marquée à I125. Pas d'agent précipitant. Centrifugation à haute vitesse. Rares faux positifs par liaison de l'autoAc à la toxine.



	Sensibilité	Spécificité
Myasthénie oculaire	39 à 71%	95 à 100%
Myasthénie généralisée	87 à 98%	98 à 100%

Myasthénie : anticorps anti-Musk

- Indications : myasthénie généralisée sans Ac anti-AchR (anti-Musk : 5% des MG, mais 45% des MG sans Ac anti-AchR)
- Technique : radioimmunologique avec domaine extracellulaire de Musk –I¹²⁵ (recombinant humain)



Test de Farr / techniques froides : les données du problème

- Large éventail technique pour les anticorps anti-ADNdb :
 - Test de Farr
 - IFI sur *Crithidia lucilliae*
 - ELISA, Divers automates (Unicap[®], Liaison[®], ...)
 - Technologie type Luminex[®]
- Farr : gold standard?
- Indications du dosage des anticorps anti-ADNdb
 - Diagnostic (critère ACR)  Sensibilité, spécificité, VPP, VPN, LR, ...
 - Suivi évolutif du lupus ?
 - Prédiction de l'atteinte rénale du lupus  SLEDAI, atteinte rénale

Test de Farr / techniques froides

- Vaste bibliographie mais difficile (impossible ?) de conclure :
 - Nature du groupe contrôle (donneurs de sang, autres MS, ...) différente de la population « de routine »
 - Population de lupus : au dépistage, à différents stades évolutifs, traitements différents, pathologies associées, ...
 - Méthodologie (statistique, cut off, méthode non précisée dans études cliniques,....)
 - Différents tests de Farr, différentes techniques froides
- Qualité de l'ADN : élément majeur
 - Phage, plasmide circulaire, extrait de thymus de veau, traitement par nucléase S1,
 - !!! Contamination par ADN sb



Significant differences in the analytic concordance between anti-dsDNA IgG antibody assays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus—Implications for inter-laboratory testing

Tyson R. Chiaro^a, Kenneth W. Davis^a, Andrew Wilson^a, Brenda Suh-Lailam^a, Anne E. Tebo^{a,b,*}

Table 1

Characteristics of anti-dsDNA IgG antibody assays.

Assay	dsDNA antigen	Calibrator	Cut-off
AESKU	Human recombinant	6 point	15.0 IU/mL
The Binding Site ^a	Calf thymus dsDNA	5 point	30.0 IU/mL
Bio-Rad	Purified dsDNA	Single	25.0 IU/mL
Euroimmun	dsDNA coupled to nucleosomes	3 point	1.0 IU/mL
Dr. Fooke	Recombinant	Single	1.0 RU ^b
Inova	Calf thymus dsDNA	Single	201.0 IU/mL
CLIFT ^c	<i>Crithidia luciliae</i> , mitochondrial DNA	None	≥ 1:10

^a The dsDNA IgG ELISA was provided by Inova Diagnostics.

^b RU denotes relative unit.

^c CLIFT is an indirect immunofluorescence assay (IFA) that employs *Crithidia luciliae* as substrate.

Table 3

Prevalence of discordant results between anti-dsDNA IgG ELISAs and CLIFT.

Assay	% Positive agreement	% Negative agreement	% Overall agreement	Cohen's kappa, κ (95% CI)
Aesku	76.2	65.5	70.0	0.40(0.28–0.53)
TBS	65.5	82.8	75.5	0.49(0.37–0.61)
Bio-Rad	63.1	92.2	80.0	0.57(0.46–0.69)
Euroimmun	57.1	90.5	76.5	0.50(0.38–0.62)
Dr. Fooke	69.1	84.5	78.0	0.54(0.42–0.66)
Inova	58.3	90.5	77.0	0.51(0.39–0.63)
All ELISAs	45.0 ^a	52.0 ^b	55.0	ND

TBS represents Total Binding Site, kits from this manufacturer were provided by Inova Diagnostics. Agreements between indicated assay and CLIFT for the ANA-positive and healthy control groups unless otherwise indicated. ND: not determined.

^a Indicates % positive agreement between all six ELISAs and CLIFT in the ANA positive group.

^b Represents % negative agreement in the healthy control cohort.

Table 2

% Overall agreement between anti-dsDNA IgG antibody EUSAs.

Assay	TBS	Bio-Rad	Euroimmun	Dr. Fooke	Inova
AESKU	76.5	76.0	75.5	80.0	73.0
TBS		87.5	83.0	87.5	84.5
Bio-Rad			89.5	88.0	89.0
Euroimmun				85.5	86.5
Dr. Fooke					87.0

The overall percent agreements between paired assays for the ANA-positive and healthy control groups are shown. TBS represents Total Binding Site, kits from this manufacturer were provided by Inova Diagnostics.

Table 4

Positive and negative agreement between anti-dsDNA EUSAs and CLIFT.

Assay	% ELISA positive CLIFT negative	% ELISA negative CLIFT positive (1:10)	% ELISA negative CLIFT positive (1:20)	Spearman correlation coefficient
AESKU	20.0	11.0	3.5	0.65
TBS	10.5	13.5	4.0	0.76
Bio-Rad	4.0	16.0	4.5	0.81
Euroimmun	4.5	18.0	7.0	0.67
Dr. Fooke	8.0	12.0	3.5	0.71
Inova	4.0	16.5	6.5	0.76

Estimates for the % positive and negative agreement is based on results from the ANA positive and healthy control groups. Spearman correlation coefficient analyses were significant at $p < 0.0001$ for the indicated EUSAs and CLIFT in the ANA positive group only.

Référence	Tests comparés	Patients	Sensibilité %	Spécificité %	VPP	VPN	LR+/LR-	Commentaire
Mac Closkey, 2010,	Farr / CL/ ELISA avec phage	LED donneurs de sang	Farr : 80/76* ELISA : 80/76	95				* sans/avec contexte clinique
			Farr 76/56 ELISA : 63/58	99				spécificité fixée à 99%
Zigon P., 2010, Croat med J	Farr / CL/ ELISA1 et 2 (thymus de veau)	583 patients de routine 156 MS (76 LED) 150 DS	Farr : 32,9 ELISA1 : 61,8 ELISA2 : 53,9	Farr : 100 ELISA1 : 91,3 ELISA2 : 92,5	Farr : 100 ELISA1 : 87 ELISA2 : 87,2	Farr : 61,1 ELISA1 : 71,6 ELISA2 : 67,9	Farr : - /0.7 ELISA1 : 7,1/0.4 ELISA2 : 7,2/0.5	Farr maison
Julkunen H., 2010, Rheumatol Int	Farr / CL/ ELISA1 (télomère humain) ELISA2 (plasmide circulaire) Farrzyme	233 LED (evol 16,6 an) 98 DS	Farr : 48,6 ELISA1 : 68,8 ELISA2 : 51,7 Farrzyme : 35,9					Farr Medix Biochemica . Sur ensemble des lupus
			Farr : 60 ELISA1 : 68 ELISA2 : 64 Farrzyme : 48	Farr : 53 ELISA1 : 29 ELISA2 : 50 Farrzyme : 66	Farr : 15 ELISA1 : 12 ELISA2 : 15 Farrzym : 16	Farr : 86 ELISA1 : 88 ELISA2 : 91 Farrzym : 90		pour nephropatie active
Launay D., 2010, Clin Chim Acta	Farr/ELISA (thymus de veau) / Automate (plasmide circulaire) / Automate (ADN humain recombinant)	99 LED 101 DS 53 autres MS	Farr : 79,8 ELISA1 : 77,8 Autom1 : 66,3 Autom2 : 78,6	Farr : 79,2 ELISA1 : 86,8 Autom1 : 94,3 Autom2 : 84,9			Farr : 3,8 /0.25 ELISA1 : 5,9/0.26 Autom1 : 11,7/0.36 Autom2 : 5,2/0.25	Farr Trinity Biotech groupe controle MS en utilisant cut off fournisseur
			Farr : 75,8 ELISA1 : 35,4 Autom1 : 62,1 Autom2 : 67,3	95			Farr : 15,2 /0.25 ELISA1 : 7,1/0.68 Autom1 : 11,4/0.40 Autom2 : 13,5/0.34	avec spécificité fixée à 95 %
Antico A., 2010, Lupus	ELISA 1(ONT de synth) 2 (Plasmide circ) 3 (ADN recomb) 4 (ADN purifié)	52 LED 28 autres MS 60 avec infection virale	Farr : 78,8 ELISA1 : 84,6 ELISA2 : 73 ELISA3 : 82,7 ELISA4 : 84,6	Farr : 90,9 ELISA1 : 82,9 ELISA2 : 97,7 ELISA3 : 96,5 ELISA4 : 94,3				

Anti-ADN comparaisons entre techniques

- Comparaison entre techniques ELISA : performances variables selon les kits (Chiaro TR, 2011, Clin Chim Acta)
- Comparaisons avec techniques de type « Luminex »
 - Comparaison Farr /Bioplex (Bardin N, 2009, Autoimmunity) : kappa coeff = 0.59
 - Comparaison entre techniques multiplex (Hanly JG, 2010 J. Immunol Meth): discordances entre les techniques et leur association à l'activité et à la NP lupique
- Comparaisons Luminex / ELISA
 - (Kim Y, 2012, Clin Chim Acta) : Concordance 98.7% pour dosage des anti-ADN

Anti-ADNdb : critère diagnostic

- Nombreuses études mais non comparatives sur lupus au diagnostic non traités : prévalence des anti-ADN au diagnostic 50-55%
 - (Cerovec M. Clin Sci 2012) (K. Op De Beéck Autoimmunity Rev 2012)
- Sensibilité - Spécificité
 - Techniques froides : sensibilité au moins équivalente au Farr
 - Techniques froides : spécificité équivalente au Farr ou légèrement inférieure selon les tests
 - Les LR semblent un peu meilleurs avec Farr

Lien avec évolutivité et atteinte rénale

- Conclusions très variables selon les études
- Association TEST DE Farr évolutivité clinique et activité NP

Table 2

Performances of the two assays in the determination of systemic lupus erythematosus activity when using the manufacturers' and the ROC thresholds.

	Fidis™ (manufacturer cut-off: 30IU/mL)	Farrzyme™ (manufacturer cut-off: 30IU/mL)	Fidis™ (ROC cut-off: 212IU/mL)	Farrzyme™ (ROC cut-off: 68.8IU/mL)
Se (%)	100.0 (88.7–100.0)	93.6 (78.5–99.0)	83.87 (66.3–94.5)	70.97 (52.0–85.7)
Sp (%)	9.8 (3.3–21.4)	62.8 (48.1–75.9)	86.27 (73.7–94.3)	96.1 (86.5–99.4)
pLR	1.11	2.51	6.11	18.1
nLR	0.0	0.1	0.19	0.3

For sensitivity and specificity, data are presented as percentages, with 95% confidence intervals indicated in parentheses. pLR: positive likelihood ratio; nLR: negative likelihood ratio.

(Martin J. 2012, Path Biol)

- Association significative entre activité du LED (SLEDAI) et la présence d'anti-ADN par techniques Luminex Biorad et taux élevé simultanément à la NP (Bioplex) (Hanly JG, 2010, J. Immunol Meth)

Conclusions

- En endocrinologie, passage aux techniques froides souvent automatisées
- RIA : pour des paramètres très spécialisés : dosage des anticorps anti-récepteurs par exemple
- Anti-ADN
 - Très discuté
 - Performances proches pour certaines techniques froides et RIA
 - Utilité d'un test de confirmation par IFI sur CL, Farr, ...