

Performances diagnostiques du nouvel EliA Symphony^S lors du dépistage d'anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires solubles (ENA)



Marco W.J. Schreurs

Laboratoire d'immunologie médicale, Service d'immunologie,
Centre médical Erasmus, Centre médical universitaire Rotterdam,
Pays-Bas

Objectif : les anticorps antinucléaires (ANA) caractérisent les maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (MRAS) comme le lupus érythémateux systémique (LES), le syndrome de Sjögren (SSj), la sclérodermie systémique (ScS), la connectivite mixte (CM) et la polymyosite/dermatomyosite (PM/DM). Il existe un sous-groupe d'ANA associés spécifiquement à ces MRAS et les antigènes cibles respectifs sont désignés par le terme générique d'antigènes nucléaires solubles (extractable nuclear antigens, ENA). Les ENA les plus courants comprennent SS-A/Ro, SS-B/La, U1RNP, Sm, Scl-70, Centromère B et Jo-1. Il y a 15 ans environ, TFS/Phadia a développé un dosage fluoro-immuno-enzymatique (FEIA), EliA Symphony, qui permet de rechercher simultanément des anticorps dirigés contre ces ENA au cours d'un même test réalisé sur ses instruments en random access.

TFS/Phadia a récemment mis au point une nouvelle version d'EliA Symphony, EliA Symphony^S. Les puits d'EliA Symphony^S sont recouverts d'U1RNP recombinant humain (RNP70, A, C), de SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), de SS-B/La, de Centromère B, des protéines Scl-70 et Jo-1, et du peptide synthétique SmD₃. Par rapport à l'EliA Symphony d'origine, le substrat Scl-70 a été biotinylé et est lié à la streptavidine de la phase solide. De plus, le substrat Sm purifié a été remplacé par le peptide synthétique SmD₃. Ces deux modifications sont destinées à améliorer la sensibilité globale du dépistage d'anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles (ENA). De plus, les antigènes d'EliA Symphony^S sont désormais harmonisés avec ceux des tests EliA spécifiques pour l'anti-Scl-70 et l'anti-Sm, dans lesquels ceux mentionnées précédemment ont été exécutées au préalable.

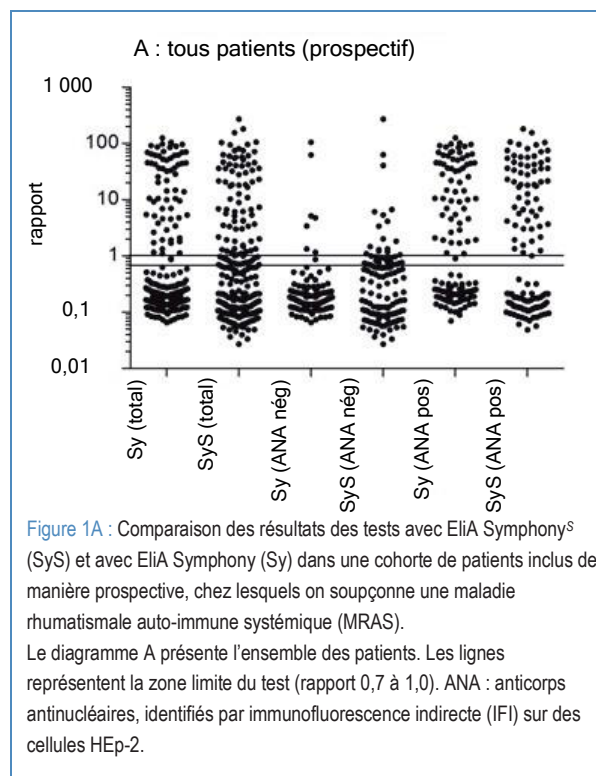
L'étude actuelle évalue les performances diagnostiques d'EliA Symphony^S pour détecter les anticorps anti-ENA, de manière prospective chez des patients chez lesquels une MRAS est soupçonnée et de manière rétrospective chez des patients chez lesquels une MRAS a déjà été diagnostiquée. La sensibilité et la spécificité d'EliA Symphony^S sont comparées directement à celles d'EliA Symphony.

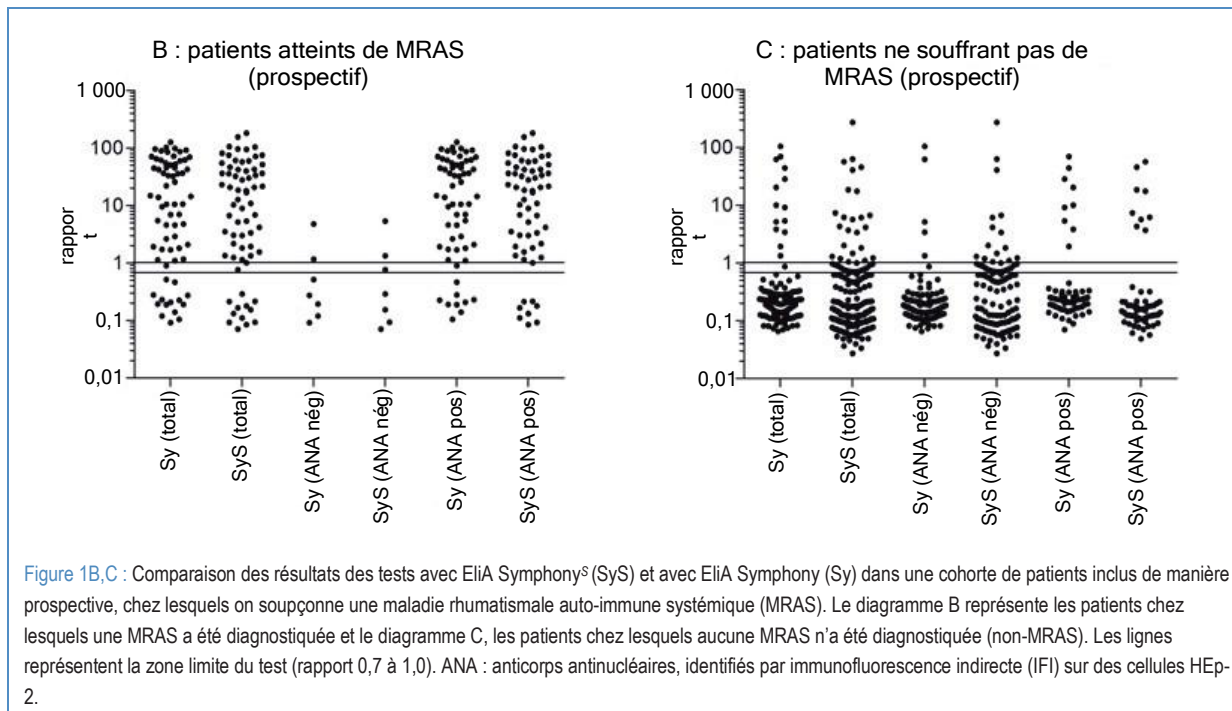
Patients et méthodes : l'étude comprenait une population prospective non sélectionnée de 247 patients chez lesquels une MRAS était soupçonnée, soumis à une recherche d'ANA en routine au Laboratoire d'immunologie médicale du centre médical Erasmus (centre de soins secondaires/tertiaires) pendant deux mois.

Après cela, on a recherché un diagnostic de MRAS dans les dossiers médicaux des sujets. Dans cette étude, la MRAS était définie comme un LES, un SSj, une ScS, une CM ou une PM/DM. Une MRAS en rémission n'était pas considérée comme une MRAS. En outre, une deuxième population d'étude composée de 150 patients chez lesquels une MRAS avait déjà été diagnostiquée, a été incluse rétrospectivement. Elle était composée de patients chez lesquels un LES (n = 50), une ScS (n = 30), un SSj (n = 40) ou une PM/DM (n = 30) avait déjà été diagnostiqué(s). Des échantillons ont été prélevés chez les patients dans le cadre d'une détection de routine d'auto-anticorps en laboratoire. Un consentement éclairé a été obtenu pour cette étude. Le groupe témoin (rétrospectif) était constitué de donneurs de sang apparemment sains (n = 100).

On a recherché des ANA dans les 247 sérums inclus de manière prospective, par immunofluorescence indirecte (IFI), en utilisant des cellules HEP-2 NOVA Lite (Inova Diagnostics). L'analyse a été réalisée selon les instructions du fabricant, en utilisant une dilution au 1:80 pour le sérum de dépistage. Tous les sérums du groupe prospectif, les sérums des MRAS du groupe rétrospectif et les sérums provenant des donneurs de sang sains ont été testés en parallèle à la fois avec EliA Symphony et EliA Symphony^S sur un instrument Phadia250, selon les instructions du fabricant. Les résultats ont été exprimés sous forme de rapport, en utilisant des valeurs de référence < 0,7 (négatives) ; de 0,7 à 1,0 (limites) et > 1,0 (positives). La sensibilité et la spécificité ont été calculées pour la cohorte prospective d'après le diagnostic MRAS ou non-MRAS. Les résultats obtenus à partir du sérum provenant des patients chez lesquels une MRAS avait été diagnostiquée ont été associés aux résultats obtenus chez les donneurs sains pour calculer la sensibilité et la spécificité pour la cohorte prospective. Pour tous les calculs de sensibilité et de spécificité, les résultats limites d'EliA ont été considérés comme négatifs.

La reproductibilité d'EliA Symphony^S a été déterminée en calculant le coefficient de variation (CV, en pourcentage) des résultats obtenus à partir d'échantillons individuels testés sept fois au cours de la même analyse le même jour (variation intra-test) et testés une fois au cours d'analyses distinctes menées pendant sept jours consécutifs (variation inter-test).





Résultats : au total, 247 patients soumis à un test pour ANA IFI en raison d'une suspicion de MRAS ont été inclus de manière prospective. Les résultats des tests effectués avec EliA Symphony et EliA Symphony[®] pour l'ensemble des patients inclus sont représentés dans la figure 1A. Un résultat positif avec EliA Symphony a été obtenu chez 27 % (67/247) des patients tandis que 32 % (79/247) des patients étaient positifs avec EliA Symphony[®]. Au total, 49 % (121/247) des patients étaient ANA IFI positifs. Parmi ceux-ci, 50 % (60/121) étaient positifs avec EliA Symphony et 51 % (62/121) avec EliA Symphony[®]. Parmi les 51 % (126/247) de patients ANA IFI négatifs restants, 0,06 % (7/126) étaient positifs avec EliA Symphony et 0,13 % (17/126) étaient positifs avec EliA Symphony[®]. Ces résultats initiaux

suggèrent une augmentation de la sensibilité globale d'EliA Symphony[®]. Après avoir reçu leur diagnostic final, tous les patients inclus de manière prospective ont ensuite été divisés en MRAS (28 %, 68/247) et non-MRAS (72 %, 179/247). Le groupe MRAS était constitué de 41 patients LES, 16 patients SSJ, 4 patients ScS, 3 patients CM et 4 patients PM/DM, avec une positivité de 90 % (61/68) en ANA IFI. Les 10 % (7/68) restants des patients ANA IFI négatifs atteints de MRAS consistaient en 4 SSJ et, étonnamment, 3 patients LES. Le groupe non-MRAS présentait une positivité de 34 % (60/179) à ANA IFI. Les résultats obtenus par EliA Symphony et EliA Symphony[®] pour les patients MRAS et non-MRAS sont présentés respectivement dans la figure 1B et 1C.

Tous les patients du groupe prospectif					
	total	Sy nég	Sy pos	SyS nég	SyS pos
MRAS (n)	68	15	53	13	55
non-MRAS (n)	179	165	14	155	24
sensibilité (%)			77,9		80,9
spécificité (%)			92,2		86,6
patients ANA positifs du groupe prospectif					
	total	Sy nég	Sy pos	SyS nég	SyS pos
MRAS (n)	61	10	51	8	53
non-MRAS (n)	60	51	9	51	9
sensibilité (%)			83,6		86,9
spécificité (%)			85,0		85,0
patients ANA-négatifs du groupe prospectif					
	total	Sy nég	Sy pos	SyS nég	SyS pos
MRAS (n)	7	5	2	5	2
non-MRAS (n)	119	114	5	104	15
sensibilité (%)			28,6		28,6
spécificité (%)			95,8		87,4

Tableau 1 : Comparaison des performances diagnostiques des tests EliA Symphony[®] (SyS) et des tests EliA Symphony (Sy) dans une cohorte de patients inclus de manière prospective, chez lesquels on soupçonne une maladie rhumatismale auto-immune systémique (MRAS). ANA : anticorps antinucléaires, identifiés par immunofluorescence indirecte (IFI) sur des cellules HEp-2.

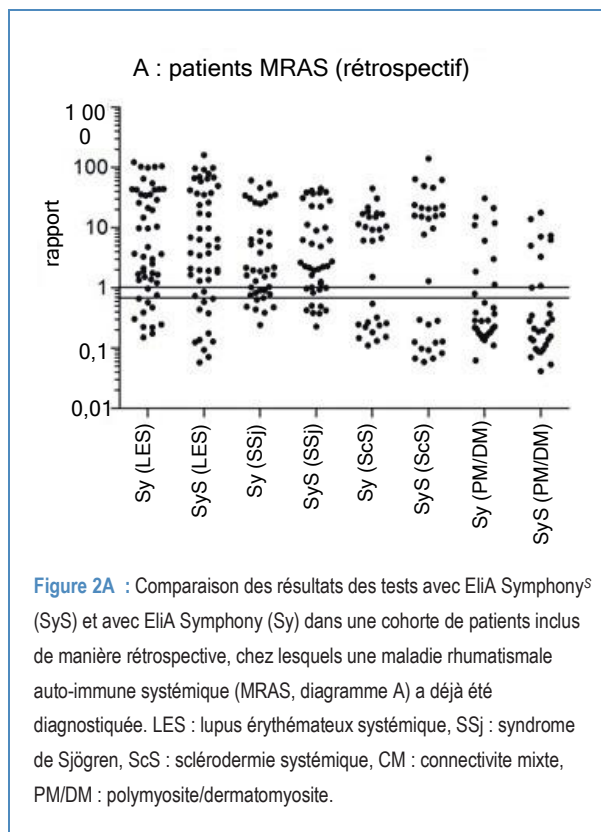


Figure 2A : Comparaison des résultats des tests avec EliA Symphony^s (Sys) et avec EliA Symphony (Sy) dans une cohorte de patients inclus de manière rétrospective, chez lesquels une maladie rhumatismale auto-immune systémique (MRAS, diagramme A) a déjà été diagnostiquée. LES : lupus érythémateux systémique, SSj : syndrome de Sjögren, ScS : sclérodémie systémique, CM : connectivite mixte, PM/DM : polymyosite/dermatomyosite.

Dans le groupe MRAS, 78 % (53/68) des patients étaient positifs avec EliA Symphony et 81 % (55/68) étaient positifs avec EliA Symphony^s. Cette augmentation correspond à 2 patients, 1 atteint de LES et 1 atteint de ScS, tous deux ANA IFI positifs. Par la suite, une augmentation similaire a été observée dans le groupe MRAS ANA IFI positif, c'est-à-dire de 84 % (51/61) à 87 % (53/61). Les 8 patients MRAS ANA IFI positifs dont le test était négatif à la fois par EliA Symphony et EliA Symphony^s étaient tous des patients atteints de LES, à l'exception de 1 patient atteint de ScS. Dans le groupe non-MRAS ANA IFI positif, 0,15 % (9/60) des patients étaient positifs à la fois lors des tests par EliA Symphony et par EliA Symphony^s, dans certains cas en raison d'anticorps anti-SS-A. Curieusement, certains des patients de ce groupe étaient classés comme atteints de « MRAS incomplète » et éligibles à un suivi clinique. Les 7 patients MRAS ANA IFI négatifs ont présenté à la fois un résultat positif avec EliA Symphony et EliA Symphony^s dans 2 cas (29 %), 1 LES et 1 SSj. Cependant, dans le groupe non-MRAS ANA IFI négatif, les résultats obtenus avec EliA Symphony^s étaient davantage positifs que ceux obtenus avec EliA Symphony, soit 0,13 % (15/119) contre 0,04 % (5/119), ce qui affecte la spécificité d'EliA Symphony^s. D'après les résultats décrits ci-dessus, on observe une augmentation de la sensibilité d'EliA Symphony^s pour détecter la présence des anticorps anti-ENA associés à une MRAS. Cette augmentation semble en partie avoir pour raison l'utilisation des substrats modifiés Scl-70 et Sm dans EliA Symphony^s, comme l'illustrent respectivement 1 patient ScS et 1 patient LES. En outre, la sensibilité globale semble elle aussi améliorée. Toutefois, on observe simultanément une diminution de la spécificité chez les patients ANA IFI négatifs chez lesquels on soupçonne une MRAS. Cette diminution de la spécificité peut être éliminée en utilisant la recherche d'anti-ENA par EliA Symphony^s uniquement chez les patients ANA IFI positifs chez lesquels on soupçonne une MRAS, comme c'est le cas dans de nombreux laboratoires effectuant une sérologie des MRAS. Les résultats des performances d'EliA Symphony et d'EliA Symphony^s dans la cohorte des patients inclus de manière prospective sont résumés dans le tableau 1.

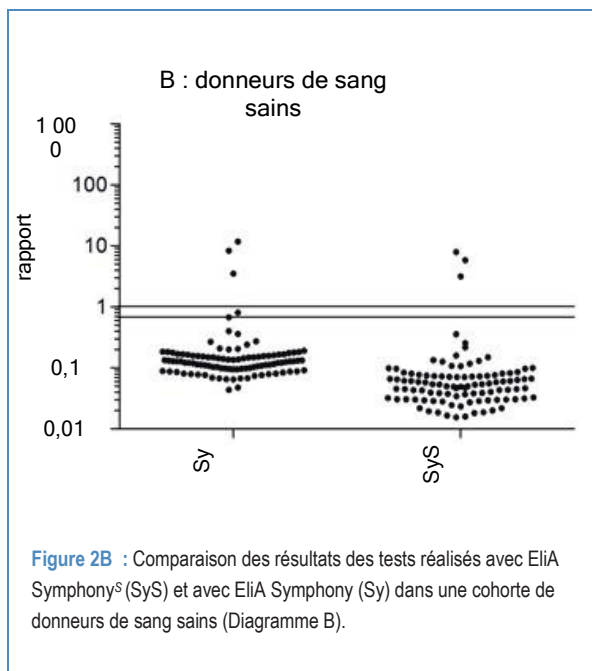


Figure 2B : Comparaison des résultats des tests réalisés avec EliA Symphony^s (Sys) et avec EliA Symphony (Sy) dans une cohorte de donneurs de sang sains (Diagramme B).

Pour la deuxième partie, rétrospective de cette étude, 150 patients atteints de MRAS ont été inclus, chez lesquels un LES, un SSj, une ScS ou une PM/DM avait déjà été diagnostiqué(s). Les résultats des tests effectués avec EliA Symphony et avec EliA Symphony^s pour ces patients inclus sont représentés dans la figure 2A. Dans le groupe LES, les résultats de 74 % (37/50) des patients étaient positifs à la fois avec EliA Symphony et avec EliA Symphony^s. Dans le groupe SSj, les résultats de 70 % (28/40) des patients étaient positifs avec EliA Symphony et 73 % (29/40) avec EliA Symphony^s. Dans le groupe ScS, les résultats de 60 % (18/30) des patients étaient positifs à la fois avec EliA Symphony et avec EliA Symphony^s. Dans le groupe PM/DM, les résultats de 30 % (9/30) des patients étaient positifs à la fois avec EliA Symphony et avec EliA Symphony^s. D'après ces résultats, la sensibilité d'EliA Symphony^s est légèrement supérieure à celle d'EliA Symphony. Ils sont cependant basés sur un seul patient atteint de SSj qui n'a montré qu'une augmentation mineure du rapport (0,89 à 1,02).

La figure 2B présente les résultats obtenus avec EliA Symphony et EliA Symphony^s chez les donneurs de sang sains inclus. Seuls 0,03 % (3/100) des patients étaient positifs à la fois avec EliA Symphony et EliA Symphony^s, dans tous les cas en raison de la présence d'anticorps anti-SS-A. Ce résultat indique une spécificité similaire pour EliA Symphony et EliA Symphony^s. Les résultats des performances d'EliA Symphony et d'EliA Symphony^s dans la cohorte des patients inclus de manière rétrospective sont résumés dans le tableau 2.

Dans la dernière partie de cette étude, la reproductibilité des résultats des tests par EliA Symphony^s a été établie. Pour cela, des échantillons individuels correspondant à des valeurs négatives/seuils limites (rapport 0,7) et limites/seuils positives (rapport 1,0) ont été sélectionnés et testés de manière répétée lors d'une série unique de tests (variation intra-test) et lors de tests effectués au cours de journées consécutives (variation inter-test). Les résultats, exprimés sous forme de CV (en %), sont présentés dans le tableau 3 et indiquent une forte reproductibilité dans la région correspondante (seuil) du test. La variation intra-test et la variation inter-test se trouvent toutes deux dans la gamme attendue pour les tests d'auto-anticorps basés sur le FEIA (< 20 %).

Conclusions : L'ensemble des résultats de notre étude indique une amélioration de la sensibilité diagnostique du test de dépistage des anticorps anti-ENA avec le nouvel EliA Symphony^s. Lorsque EliA Symphony^s est utilisé uniquement pour les patients ANA IFI positifs chez lesquels on soupçonne une MRAS, stratégie en cascade pratiquée par la plupart des laboratoires effectuant

Patients du groupe rétrospectif et témoins					
	total	Sy nég	Sy pos	SyS nég	SyS pos
LES (n)	50	13	37	13	37
SSj (n)	40	12	28	11	29
ScS (n)	30	12	18	12	18
PM/DM (n)	30	21	9	21	9
MRAS (n)	150	58	92	57	93
témoins (n)	100	97	3	97	3
sensibilité (%)		61,3		62,0	
spécificité (%)		97,0		97,0	

Tableau 2 : Comparaison des performances diagnostiques d'EliA Symphony^S (SyS) et d'EliA Symphony (Sy) dans une cohorte de patients inclus de manière rétrospective, chez lesquels une maladie rhumatismale auto-immune systémique (MRAS) avait déjà été diagnostiquée et chez des témoins (donneurs de sang sains). LES : lupus érythémateux systémique, SSj : syndrome de Sjögren, ScS : sclérodémie systémique, CM : connectivite mixte, PM/DM : polymyosite/dermatomyosite.

Variation intra-test SyS		
	échantillon 1	échantillon 2
moyenne (n = 7)	0,77	0,92
ET	0,14	0,11
CV (%)	17,7	11,6
Variation inter-test SyS		
	échantillon 1	échantillon 2
moyenne (n = 7)	0,78	1,1
ET	0,11 0,66 > 0,78 > 0,90	0,09 1,01 – 1,18
CV (%)	14,8	8,1

Tableau 3 : La reproductibilité d'EliA Symphony^S (SyS), déterminée en testant sept fois des échantillons individuels au cours de la même analyse le même jour (variation intra-test) et une fois au cours d'analyses distinctes menées pendant sept jours consécutifs (variation inter-test). ET : écart-type, CV : coefficient de variation.

la sérologie des MRAS, la spécificité du diagnostic n'est pas affectée par rapport à EliA Symphony. Toutefois, sans test initial d'ANA IFI, EliA Symphony^S peut présenter une diminution de la spécificité par rapport à EliA Symphony, comme l'illustre notre population de patients inclus de manière prospective (soins secondaires/tertiaires). Selon la population locale de patients, c'est-à-dire soins primaires, secondaires ou tertiaires, les performances diagnostiques d'EliA Symphony^S peuvent varier, ce qui justifie une vérification locale de ses performances diagnostiques. Enfin, EliA Symphony^S présente une forte reproductibilité dans la région correspondant au seuil du test.

Remerciements : L'auteur remercie José Huybers, Jac Kuijpers-Entrup, Roseri Roelofsen-de Beer et Pieter van der Pol pour leurs contributions majeures à cette étude.

Addendum :

Le Laboratoire d'immunologie médicale du centre médical Erasmus sert de centre national de référence pour la sérologie des MRAS aux Pays-Bas et coordonne l'assurance qualité externe nationale pour la sérologie des MRAS (ANA/anti-ENA/anti-dsDNA) organisée par la Fondation hollandaise pour l'évaluation de la qualité dans les laboratoires médicaux (SKML).

Important :

Peu après la fin de cette étude, pendant une sérologie de routine pour les MRAS, 2 échantillons sériques positifs pour les anti-SmD dont les résultats étaient négatifs lors d'un test initial par EliA Symphony ont été identifiés avec EliA Symphony^S.

EliA™ Symphony^S - Partie intégrante de votre algorithme de dépistage diagnostique pour les connectivites

Gerben Zuiderveld

Marketing international pour l'auto-immunité, Phadia GmbH, Freiburg, Allemagne

Les connectivites (CTD) représentent des modèles classiques de maladies auto-immunes systémiques. Il s'agit d'un groupe hétérogène de maladies caractérisées par la structure ou la fonction anormale d'un ou plusieurs éléments du tissu conjonctif, par exemple le collagène, l'élastine ou les mucopolysaccharides. Le diagnostic différentiel des CTD est essentiellement basé sur des observations cliniques, mais il est compliqué par la ressemblance de leurs symptômes. C'est pourquoi les auto-anticorps sont des marqueurs utiles pour étayer le diagnostic ou exclure les CTD. Les principales CTD sont le lupus érythémateux systémique (LES, qui peut affecter tous les organes), le syndrome de Sjögren, (SSJ, caractérisé par une diminution de la sécrétion des glandes lacrymales et salivaires), la sclérodermie (sclérose systémique, ScS : une dermatose évolutive chronique), la sclérose systémique limitée (une sclérodermie anciennement connue sous le nom de syndrome CREST, avec une évolution moins importante de la maladie), la polymyosite/dermatomyosite (PM/DM, une maladie inflammatoire aiguë ou chronique des muscles et de la peau) et la connectivite mixte (CM, un syndrome avec des caractéristiques de sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde, LES et PM/DM).

Pourquoi un nouveau test EliA Symphony ?

Conformément à notre mission : « Nous permettons à nos clients de bâtir un monde plus sain, plus propre et plus sûr », nous voulons offrir au laboratoire le test le meilleur et le plus fiable, afin que soient fournis au médecin (demandeur) les résultats exacts des tests qui l'aideront à établir le diagnostic correct et à débiter le traitement approprié.

Contexte – Test Sm le plus novateur

Avant 2012, nos clients du monde entier nous ont demandé d'améliorer notre test EliA Sm, qui utilisait l'antigène SmD natif (référence 14-5502-01). EliA Sm avait une excellente spécificité clinique, mais sa sensibilité clinique était inférieure de 50 % à celle des autres fournisseurs. Les anticorps anti-Sm dirigés contre la protéine SmD sont hautement spécifiques du LES et représentent l'un des critères de l'ACR 1997 et du SLICC 2012 pour le lupus érythémateux systémique (LES). Alors que la plupart des antigènes nucléaires solubles peuvent être produits dans des bactéries ou, même mieux, dans des cellules d'insectes en utilisant la technologie de l'ADN recombinant, le SmD ne peut pas être produit par recombinaison car il ne présente pas d'antigénicité. En recherchant la source optimale d'antigènes, nous avons découvert que le peptide SmD₃ satisfaisait à toutes les exigences pour être utilisé dans un test diagnostique de haute qualité.^{1,2} En 2012, nous avons lancé avec succès SmD^P (référence 14-5624-01), le seul test disponible dans le commerce pour des anticorps anti-Sm utilisant un peptide synthétique. La spécificité du test reste exceptionnelle tout en parvenant à une sensibilité très élevée. Se reporter au tableau 1 des performances, évaluées avec 350 échantillons définis cliniquement, se reporter au tableau 2.

	EliA SmD ^P	EliA Sm	Sm Fournisseur1
Sensibilité	23,0 %	9,0 %	22,0 %
Spécificité	98,4 %	98,8 %	97,2 %
VPP	85,2 %	75,0 %	75,9 %
VPN	76,16 %	73,1 %	75,7 %
LR (+)	14,38	7,50	7,86
LR (-)	0,78	0,92	0,80

Tableau 1 : Performances d'EliA SmD^P comparées à EliA Sm et à un test avec Sm provenant d'un concurrent.⁸

Groupe de maladies	Nombre
LES	100
Témoins pathologiques :	
Sclérodermie	30
Syndrome de Sjögren	20
Polyarthrite rhumatoïde	50
Poly-/dermatomyosite	10
CM	20
Maladies thyroïdiennes auto-immunes	20
Infections (bactériennes et virales)	60
Tumeur	40
Total	350

Tableau 2 : Gamme des sérums utilisés pour développer EliA SmD^P.⁸

Nécessité d'une spécificité importante

Le lupus érythémateux systémique (LES), comme toutes les connectivites, est une maladie rare. Pourtant, les marqueurs diagnostiques pour le LES sont souvent commandés au laboratoire d'immunologie car les médecins veulent écarter la possibilité d'un LES chez les patients présentant des symptômes non spécifiques tels que fatigue, fièvre, douleur, irritations cutanées, douleurs articulaires ou autres. Les anticorps anti-Sm sont présents seulement chez environ un cinquième des patients atteints de LES^{9,10,11} ce qui ne permet pas de les utiliser pour éliminer la probabilité d'un LES. En revanche, ils sont hautement spécifiques du LES. La plupart des cliniciens pensent qu'un anticorps anti-Sm positif est un signe manifeste de LES. Pourtant, des tests distincts ont une spécificité clinique différente pour le LES. Certains tests comprennent non seulement du SmD mais également du SmBB'. Puisque SmBB' et les antigènes U1snRNP A et C ont en commun un épitope responsable d'une réaction croisée, les anticorps dirigés contre SmBB' sont considérés comme moins spécifiques du LES (voir tableau 3).^{1,3,4} Par conséquent, il est de la plus haute importance d'utiliser l'antigène approprié dans un test Sm, afin d'éviter les faux positifs et d'apporter une utilité clinique élevée.

	LES	CM	autres
U1RNP(A,C,70)	30 à 40 %	> 95 %	PR, PM/DM, ScS
SmD	20 à 30 %		

Tableau 3 : Fréquence des anticorps anti-U1snRNP et anti-Sm dans la LES, la sclérodermie et la connectivite mixte^{1,3,4}

Avantages d'EliA SmD^P

- Une meilleure identification des patients atteints de LES
- Un diagnostic différentiel plus sûr

Contexte – Test Scl-70 hautement sensible

En 2013, un comité conjoint de l'American College of Rheumatology (ACR) et de la Ligue européenne contre le Rhumatisme (European League Against Rheumatism, EULAR) a établi de nouveaux critères de classification pour la sclérose systémique (ScS).⁵ L'un de ces huit nouveaux critères correspondait aux auto-anticorps spécifiques de ScS, c'est-à-dire anti-Scl-70 (anti-topoisomérase I), anti-centromère et anti-ARN polymérase III. Les anticorps anti-Scl-70 sont un signe de sclérose systémique évolutive.⁵ Au cours de la même année, nous avons lancé un test Scl-70 amélioré sur EliA, avec une nouvelle manière de recouvrir le puits d'antigènes, ce qui s'est traduit par une meilleure présentation des antigènes, une plus grande accessibilité des épitopes et de ce fait, une sensibilité plus élevée (voir tableau 4). Le nouvel EliA Scl-70^S (14-5637-01) a été évalué à l'aide de 336 échantillons définis cliniquement, voir tableau 5.

Avantages d'EliA Scl-70^S

- Facilite la différenciation entre la sclérose systémique et les autres connectivites
- Permet d'orienter précocement le diagnostic

Les nouveaux tests EliA SmD^P et EliA Scl-70^S présentent de meilleures performances et une sensibilité plus élevée que les tests plus anciens. Les antigènes sont tous deux des éléments importants du test de dépistage EliA Symphony, spécifique des antigènes. Un test de dépistage doit non seulement être aligné sur les tests correspondants pour les antigènes individuels, mais il doit également présenter une sensibilité aussi élevée que possible (sans perdre de spécificité). Par conséquent, l'alignement de Symphony avec l'amélioration des marqueurs Sm et Scl-70 était une conséquence logique et nécessaire.

EliA Symphony^S

EliATM Symphony^S est le premier test de dépistage d'ENA utilisant exclusivement des antigènes recombinants humains associés à un peptide synthétique. C'est pourquoi le test présente tous les avantages des antigènes recombinants : des antigènes purs sans contamination, ce qui conduit à une spécificité élevée ; une production contrôlée de l'ensemble des composants du test offrant une cohérence élevée au cours du temps ; des lots d'antigènes qui durent plusieurs années, ce qui garantit une variation faible d'un lot à l'autre. Le résultat est un test de dépistage cliniquement pertinent, sensible et hautement spécifique. C'est un outil qui facilite grandement les décisions cliniques et de ce fait, son utilisation est très utile dans un contexte diagnostique.

	EliA Scl-70 ^S	EliA Scl-70	Scl-70 Fournisseur 1	Scl-70 Fournisseur 2
Sensibilité	30,7 %	26,7 %	28,7 %	28,7 %
Spécificité	99,5 %	99,5 %	98,0 %	99,5 %
VPP	96,9 %	96,4 %	87,9 %	96,7 %
VPN	74,2 %	73,1 %	73,3 %	73,6 %
LR (+)	61,4	53,4	14,4	57,4
LR (-)	0,7	0,7	0,7	0,7

Tableau 4 : Performances des tests EliA Scl-70^S comparées à celles des tests EliA Scl-70 et Scl-70 provenant d'autres fournisseurs.⁸

Groupe de maladies	Nombre
Sclérodermie	101
CREST*	33
Témoins pathologiques :	
CTD (LES, SSj, CM, PM/DM)	102
Polyarthrite rhumatoïde	30
Infections (bactériennes et virales)	50
Tumeur	20
Total	336

Tableau 5 : Gamme des sérums utilisés pour développer EliA Scl-70^S.⁸

** Des échantillons de CREST ont été utilisés seulement pour calculer les correspondances entre les tests mais ils n'ont pas servi à établir la sensibilité ni la spécificité, car il n'y a pas d'association évidente avec les anticorps anti-Scl-70.

EliA Symphony^s	U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, CENP B, Scl-70, Jo-1, peptide SmD
EliA Symphony	U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, CENP B, Scl-70, Jo-1, SmD
EliA CTD	U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, CENP B, Scl-70, Jo-1, SmD, dsDNA, Rib-P, Fibrillarine, ARN Polymérase III, PM-Scl, PCNA et Mi-2
Fournisseur 1	U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, Scl-70, Jo-1, Sm (pas de CENP)
Fournisseur 2	U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, CENP B, Scl-70, Jo-1, Sm, dsDNA
Fournisseur 3	U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, CENP B, Scl-70, Jo-1, Sm, dsDNA, Rib-P, Chromatine, complexe U1RNP-Sm

Une structure tridimensionnelle intacte des antigènes (conformation) est fondamentale pour qu'ils soient reconnus par les anticorps. C'est pourquoi la plupart de nos antigènes recombinants humains sont produits dans le système eucaryote baculovirus/cellules d'insectes. Ce système, au contraire des systèmes bactériens, est capable d'exprimer les antigènes dans la conformation correcte et d'effectuer les modifications post-traductionnelles complexes nécessaires pour que la protéine soit identique à la forme humaine native d'un point de vue antigénique.

La protéine SmD naturelle est constituée de trois parties : SmD₁, D₂ et D₃ Mahler et al. ont démontré qu'un peptide particulier, le SmD₃, représente les épitopes correspondant à Sm et constitue un substrat plus sensible et plus fiable pour détecter les anticorps anti-Sm.^{1,2} EliA Symphony^s et EliA SmD^P utilisent tous deux le peptide SmD₃, car il s'est révélé être l'antigène le plus spécifique et le plus sensible pour le LES.²

Performances cliniques

L'utilisation d'antigènes et de techniques de coating d'antigènes comme décrit ci-dessus doit être cohérente afin d'améliorer les performances diagnostiques. Par conséquent, les performances diagnostiques d'EliA Symphony^s ont non seulement été comparées à EliA Symphony mais aussi à d'autres tests de dépistage (EliA CTD Screen et 3 tests de dépistage d'ANA provenant d'autres fournisseurs). Les six tests de dépistage contiennent U1RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, Jo-1 et Sm (peptide Sm ou SmD₃ purifié dans le cas d'EliA Symphony^s). Tous sauf un (fournisseur 1) contiennent la protéine B du centromère. EliA CTD Screen ainsi que les tests provenant des fournisseurs 2 et 3 contiennent du dsDNA, et EliA CTD Screen ainsi que le test du fournisseur 3 comportent d'autres marqueurs pour les connectivités (voir encadré, selon les sites Internet des fournisseurs).

Les tests ont été comparés en utilisant 404 échantillons définis cliniquement, provenant de patients atteints de différentes connectivités, ainsi que de 229 patients souffrant de différentes maladies non auto-immunes servant de témoins. (Se reporter au tableau 6) Nous devons indiquer ici que, avec un rapport de 404:229, la proportion de patients atteints d'une CTD dans cette cohorte est bien plus élevée que celle des patients sans CTD dans toutes les situations de routine. Une proportion de 0 à 5 % de patients atteints d'une connectivité est plus réaliste dans une cohorte de diagnostic classique. Plus il y a de patients sans CTD inclus, plus la pertinence de la spécificité est évidente, même lorsque ce test est utilisé comme test de première intention.

Maladie	N = 404	Témoins pathologiques	N = 229
LES	97	Polyarthrite rhumatoïde	85
Syndrome de Sjögren	96	VHB	36
Sclérodémie	87	VHC	36
Poly-/dermatomyosite	78	VIH	27
CM	46	Tumeur	25
		Infection bactérienne	20

(les échantillons monospécifiques anti-CENP B n'ont pas été inclus car cet antigène était absent chez le fournisseur 1)

Tableau 6 : Gamme des sérums utilisés pour développer EliA Symphony^s. On ignore s'il s'agissait d'« échantillons diagnostiques » (première analyse, avant traitement) ou d'échantillons de suivi. On ne dispose pas non plus des informations concernant l'activité de la maladie ou le traitement.⁸

Fabricant	Sensibilité En %	Spécificité En %	Rapport de vraisemblance positif	Rapport de vraisemblance négatif
EliA Symphony^s	66,6 %	93,0 %	9,53	0,36
EliA Symphony	66,1 %	92,1 %	8,41	0,37
EliA CTD Screen	71,3 %	89,1 %	6,53	0,32
Fournisseur 1 dépistage d'ENA	67,6 %	91,7 %	8,14	0,35
Fournisseur 2 dépistage d'ENA	77,5 %	53,3 %	1,66	0,42
Fournisseur 3 dépistage d'ENA	76,8 %	84,9 %	5,10	0,27

Tableau 7 : Performances des tests de dépistage d'EliA Symphony^s comparées à celles d'EliA Symphony, EliA CTD Screen et aux tests de dépistage d'ENA provenant d'autres fournisseurs.⁸

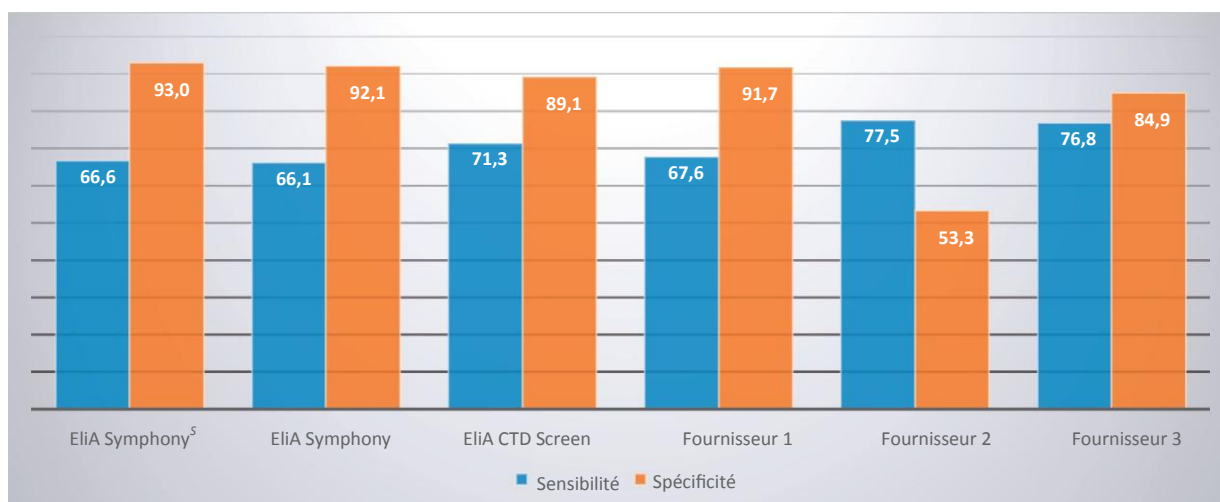


Figure 1 : Sensibilité et spécificité des tests de dépistage d'EliA Symphony^S, EliA Symphony, EliA CTD Screen et des tests de dépistage d'ENA provenant de 3 autres fournisseurs.⁸

Les données montrent qu'EliA Symphony^S présente une sensibilité légèrement supérieure à celle d'EliA Symphony, en raison de l'utilisation d'une méthode améliorée de coating qui se traduit par une meilleure présentation des antigènes et une meilleure accessibilité des épitopes. Comme prévu, les principales améliorations de la sensibilité ont été observées dans la cohorte du lupus érythémateux systémique et de la sclérodémie (voir tableau 8).

	EliA Symphony ^S	EliA Symphony
Sensibilité pour le LES	59,8 %	58,8 %
Sensibilité pour la sclérodémie	67,8 %	64,4 %

Tableau 8 : Sensibilité d'EliA Symphony^S et d'EliA Symphony dans une cohorte de patients atteints de LES (n = 97) et une cohorte de patients atteints de sclérodémie (n = 87).

Sensibilité améliorée pour les anticorps anti-SmD

Dans notre cohorte des 404 échantillons provenant de patients atteints de connectivites, seuls trois échantillons étaient monospécifiques positifs pour les anticorps anti-SmD. La plupart des échantillons SmD comprenaient aussi d'autres anticorps comme Ro52, Ro60, U1RNP ou La. Cependant, ces trois échantillons étaient négatifs avec le système EliA Symphony actuel mais étaient nettement positifs avec EliA Symphony^S en raison de l'amélioration de la sensibilité pour ces trois anticorps (voir tableau 9).

Échantillon	Rapport EliA Symphony ^S Seuil 1,0	Rapport EliA Symphony Seuil 1,0	EliA SmD ^P En U/ml Seuil 10
1	6,73	0,45	137,7
2	1,47	0,41	14,1
3	1,06	0,23	11,8

Tableau 9 : 3 échantillons avec des anticorps anti-SmD, positifs avec EliA Symphony^S mais négatifs avec EliA Symphony.

EliA Symphony^S est utilisé en association avec le test EliA dsDNA

Bien sûr, les trois tests qui ne comprennent pas de dsDNA (EliA Symphony^S, EliA Symphony et le test provenant du fournisseur 1) présentent une sensibilité inférieure à celle des trois tests comprenant du dsDNA (EliA CTD Screen et les tests provenant des fournisseurs 2 et 3). À l'inverse, tous les tests sans dsDNA sont nettement supérieurs en termes de spécificité et EliA Symphony^S présente la spécificité la plus élevée (93 %). Parmi les tests de dépistage contenant du dsDNA, seul EliA CTD Screen présente une bonne spécificité d'environ 90 %.

En tenant compte de l'approche de routine d'un laboratoire d'immunologie, les résultats d'EliA Symphony^S et d'EliA Symphony ont été associés à un test spécifique avec du dsDNA (voir figure 2). Malheureusement, les résultats du test de dépistage provenant du fournisseur 2 n'ont pas pu être associés à ceux d'un test spécifique avec de l'anti-dsDNA car les sérums n'étaient pas disponibles en un volume suffisant.

Cette étude interne reflète l'amélioration prévue des performances d'EliA Symphony^S pour une utilisation en routine. EliA CTD Screen et l'association EliA Symphony^S et EliA dsDNA ont montré la spécificité et le rapport de vraisemblance positif les plus élevés.

La spécificité est-elle importante pour un test de dépistage ?

Les tests de dépistage sont utilisés pour écarter le risque de maladies auto-immunes lors du diagnostic des connectivites. Par conséquent, les médecins attendent d'un test de dépistage qu'il soit extrêmement sensible afin de ne pas manquer d'identifier un patient atteint d'une connectivite, alors que la spécificité n'est généralement pas considérée comme importante. Toutefois, cette approche est risquée, en particulier dans le cas des maladies rares telles que les connectivites. Comme la probabilité d'un pré-test est souvent inférieure à 1 %, le résultat d'un test de dépistage non spécifique est bien plus souvent un faux positif qu'un authentique positif (valeur prédictive faiblement positive). Même si un test de dépistage n'est pas censé être décisif pour le diagnostic d'une maladie, quelle qu'elle soit, il est souvent utilisé de la sorte, ce qui conduit à un nombre élevé de diagnostics erronés. Jusqu'à 50 % des patients chez lesquels on a diagnostiqué un LES en raison d'une positivité à ANA IFI n'en sont en réalité pas atteints.^{6, 7} Outre les 633 échantillons définis cliniquement indiqués ci-



Figure 2 : Sensibilité et spécificité d'EliA Symphony^S plus EliA dsDNA, d'EliA Symphony plus EliA dsDNA, et de trois tests de dépistage différents contenant du dsDNA.⁸

dessus, 400 donneurs de sang sains ont été testés avec EliA Symphony^S.

Sept des 400 échantillons ont donné un résultat positif. Lors d'une analyse plus poussée, tous ces échantillons contenaient des anticorps spécifiques, comme le montre le tableau 10. Par conséquent, techniquement ces résultats n'étaient pas des faux positifs car les donneurs de sang possédaient réellement des auto-anticorps. Toutefois, sans symptôme clinique, une positivité unique aux anticorps antinucléaires n'est pas significative pour le diagnostic. Il reste à déterminer si les individus possédant des anticorps antinucléaires (titre élevé et persistant) développeront une connectivite lors du suivi à long terme.

7 échantillons positifs	EliA Symphony ^S [Rapport]	Résultat
1	1,2	EliA Ro52 positif
2	2,4	EliA U1RNP positif
3	33,7	EliA Ro52 et Ro60 positif
4	11,4	EliA Ro60 positif
5	1,1	EliA U1RNP positif
6	23,0	EliA U1RNP et Ro60 positif
7	25,9	EliA CENP positif

Tableau 10 : Résultats de sept échantillons provenant de donneurs de sang apparemment sains positifs avec EliA Symphony^S.⁸

EliA Symphony^S Conclusions

- Qualité reconnue d'EliA, premier test de dépistage d'ENA entièrement recombinants
- Haute spécificité (supérieure à celle des tests concurrents) à l'origine d'une précision clinique élevée
- EliA Symphony^S et ENA EliA individuel sont parfaitement alignés
- Sensibilité améliorée et spécificité préservée
- Entièrement automatisé : peut être effectué sur Phadia100/250/2500/5000

Références

1. Mahler M, Stinton LM, Fritzler MJ. Improved serological differentiation between systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease by use of an SmD3 peptide-based immunoassay. *Clin Diag Lab Immunol.* 2005;12:107-113.
2. Mahler M, Fritzler MJ, Blüthner M. Identification of a SmD3 epitope with a single symmetrical dimethylation of an arginine residue as a specific target of a subpopulation of anti-Sm antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R19-R29 (DOI 10.1186/ar1455).
3. van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA. Anti-U1snRNP antibodies and clinical associations. In: vanVenrooij WJ, Maini RN (eds), *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1996; pp C3.1, 1-8.
4. Peng SL, Craft JE. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds), *Autoantibodies.* Elsevier, Amsterdam. 1996; pp 774-782.
5. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. Classification Criteria for Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2737-2747.
6. Rasmussen A, Radfar L, Lewis D, et al. Previous diagnosis of Sjögren's Syndrome as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2016;1195-1201.
7. Narain S, Richards HB, Satoh M, et al. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. *Arch Intern Med.* 2004;164:2435-2441.
8. Unpublished, internal study by our Research and Development department in Freiburg.
9. Wenzel J, et al. Antibodies targeting extractable nuclear antigens. *Br J Dermatol* 2001;145(6):859-67
10. Peng SL, Craft JE. Sm antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds), *Autoantibodies* 1996; pp 774-782, Elsevier, Amsterdam
11. Benito-Garcia E, et al Guidelines for Immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-Smand anti-RNP antibody tests. *Athrits Rheum* 2004;51:1030-1044