

Article original

Dosage des IgE spécifiques sur l'Immulite® 2000 DPC, étude analytique et comparaison avec la technique Immunocap RIA Pharmacia pour 35 pneumallergènes¹

Measurement of specific IgE on the DPC Immulite 2000 Instrument, analytical evaluation and comparison with the Pharmacia CAP RIA System for 35 inhalant allergens

L. Guilloux^{a,*}, C. Hamberger^b

^a Laboratoire Marcel-Mérieux, unité d'immunoallergologie, 19, avenue Tony-Garnier, 69007 Lyon, France

^b Laboratoire LCL, département d'allergologie, 78, avenue de Verdun, 94200 Ivry-sur-Seine, France

Reçu le 17 septembre 2004 ; accepté le 6 octobre 2004

Disponible sur internet le 06 novembre 2004

Résumé

La société DPC a récemment développé une gamme de réactifs de dosage quantitatif des IgE spécifiques par chimiluminescence adaptés à l'automate Immulite® 2000. Nous avons évalué les caractéristiques analytiques (répétabilité, reproductibilité, capacité de liaison, spécificité) de cette méthode pour la mesure des IgE spécifiques de 35 allergènes et d'un mélange de pneumallergènes (test de dépistage de l'allergie respiratoire, Al atopTM). Les résultats obtenus sur 2409 sérums ont été comparés à la technique ImmunoCAP® RIA (Pharmacia), utilisée en routine dans notre laboratoire. La concordance globale des résultats, Immulite® 2000 vs ImmunoCAP® RIA, est de 97 % pour le test de dépistage et de 90 % pour le dosage des IgE spécifiques unitaires. Par rapport au CAP System, l'Immulite 2000 présente une sensibilité de 89 % et une spécificité de 91 %. Les performances analytiques de cette méthode automatisée et les caractéristiques de l'Immulite 2000 Allergie permettent une intégration aisée du système dans la routine d'un laboratoire.

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

An automated method for quantitative specific IgE measurements was recently released by DPC on Immulite® 2000 system based on chemiluminescence. We evaluated the analytical performances (intraassay and interassay precision, binding capacity, specificity) of this method for 35 individual inhalant allergens and an inhalant screening panel (Al atopTM). The results obtained with 2409 sera were compared to those obtained with Pharmacia CAP System (RIA), the routine method used in our laboratory. Using CAP System as a comparative method, Immulite 2000 has a sensitivity of 89% and a specificity of 91%. Analytical characteristics of this method are good. Agreement with Pharmacia CAP System is 97% for the screening test and 90% for individual allergens. Immulite® 2000 features allow for its easy integration in the laboratory for routine use.

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : IgE spécifiques ; Dosages in vitro, Immulite 2000

Keywords: Specific IgE assay; Immulite 2000; Inhalant allergens

¹ Nous tenons à remercier Bernard Poggi, Rédacteur en Chef de IBS pour avoir donné son autorisation de reproduire l'article actualisé ci-dessus déjà paru dans IBS volume 19-N°1-2004-pages 71/80.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : lguilloux@lab-merieux.net (L. Guilloux).

1. Introduction

Les bases du diagnostic étiologique d'une maladie allergique reposent sur la mise en évidence d'immunoglobulines E (IgE) spécifiques circulantes (tests *in vitro*) et/ou d'IgE spécifiques cellulaires (tests cutanés) et les résultats de ces examens sont confrontés à l'interrogatoire et à l'examen clinique du patient pour établir une relation de cause à effet entre l'exposition à l'allergène et le déclenchement des signes cliniques.

La société DPC a récemment développé une gamme de réactifs de dosage quantitatif des IgE spécifiques adaptés à l'automate Immulite® 2000. Nous avons évalué les caractéristiques analytiques de cette nouvelle méthode pour la mesure des IgE spécifiques de 35 allergènes, les plus couramment prescrits en allergie respiratoire, et pour un mélange de pneumallergènes utilisé comme test de dépistage (Alatop™). Les résultats obtenus sur l'Immulite® 2000 ont été comparés à ceux de la technique ImmunoCAP® RIA (Pharmacia), utilisée en routine dans notre laboratoire.

2. Matériel et méthodes

Les sérums testés proviennent de prélèvements consécutifs, tout venant du laboratoire, complétés de sérums sélectionnés à partir des résultats ImmunoCAP® RIA, afin d'obtenir un équilibre entre le nombre de résultats négatifs et positifs, et de couvrir toute l'étendue de la gamme de concentrations.

Les 35 allergènes sont :

- d1 *Dermatophagoides pteronyssinus* ;
- d2 *Dermatophagoides farinae* ;
- d201 *Blomia tropicalis* ;
- h2 Poussière de maison ;
- e1 Chat (poils et squames) ;
- e2 Chien (épithélium) ;
- e5 Chien (poils et squames) ;
- e3 Cheval (poils et squames) ;
- e6 Cobaye (épithélium) ;

- e82 Lapin (épithélium) ;
- e84 Hamster (épithélium) ;
- g2 Chiendent digité ;
- g3 Dactyle pelotonné ;
- g5 Ivraie vivace ;
- g12 Seigle ;
- g15 Blé ;
- i1 Venin abeille ;
- i3 Venin guêpe vespula ;
- i4 Venin guêpe poliste ;
- i6 Blatte ;
- i75 Venin de frelon (*Vespa crabro*) ;
- k81 Ficus ;
- k82 Latex ;
- m3 *Aspergillus fumigatus* ;
- m6 *Alternaria tenuis* ;
- t3 Bouleau ;
- t6 Genévrier ;
- t7 Chêne ;
- t15 Frêne ;
- t9 Olivier ;
- t23 Cyprès ;
- w1 Ambroisie ;
- w6 Armoise commune ;
- w9 Plantain ;
- w21 Pariétaire.

L'Immulite® 2000 est un automate d'immunoanalyse multiparamétrique qui, s'il est dédié uniquement à l'allergie, permet de disposer simultanément de 138 allergènes différents. Le principe de l'immunodosage par chimiluminescence est représenté dans la Fig. 1. Les extraits allergéniques sont couplés à une matrice soluble biotinylée grâce à différents agents, variables selon la nature des allergènes (liaison covalente : 1,4-butanedioldiglycidyl éther ; 1,1' carbonyldiimidazole) [2]. Au cours d'une première étape, l'allergène, le sérum du patient et une bille coâtée à la streptavidine sont incubés pendant 30 minutes sous agitation constante. Après lavage, un mélange d'anticorps monoclonaux anti-IgE conjugués à la phosphatase alcaline est ajouté (2^e incubation de 30 minutes). La révélation se fait grâce à un substrat

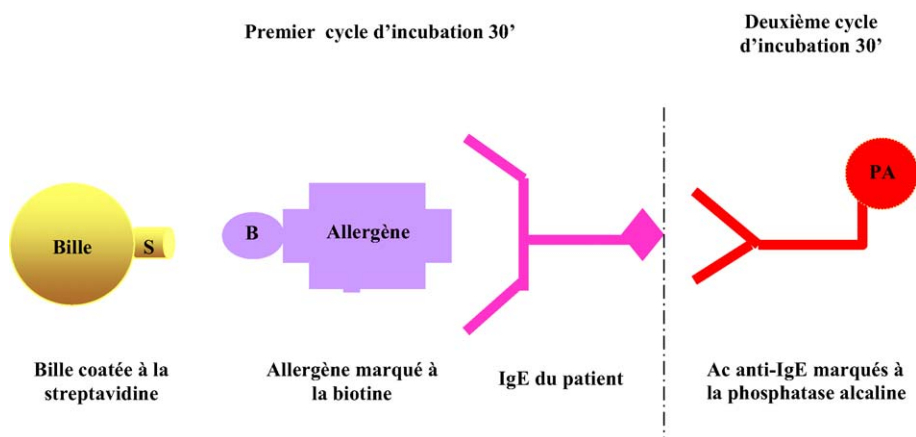


Fig. 1. Principe du dosage des IgE spécifiques par Immulite 2000 (DPC).

Tableau 1
Répétabilité et reproductibilité IgE spécifiques Immulite 2000

Intra-essai			Inter-essais		
d1	m6	g3	Allergènes	g3	d1
11	12	12	Nombre d'essais	30	27
0,88	1,9	12,1	Moyenne kU/l	1,1	18,0
4,1	5	4,1	CV %	9,0	12,0
					e1
					30
					46,6
					10,2

chimiluminescent et l'intensité de la lumière produite est corrélée à la quantité d'IgE. La cadence de l'automate est de 100 tests/heure et le premier résultat est obtenu après 65 minutes. Une seule calibration est suffisante pour tous les allergènes.

La technique ImmunoCAP® RIA, utilisée en routine dans le laboratoire, est fondée sur le même principe de dosage [3], mais les allergènes sont couplés de façon covalente (bromure de cyanogène) à une matrice solide et la révélation se fait par des anticorps anti-IgE marqués à l'iode¹²⁵. Dans les deux méthodes, les gammes sont calibrées par rapport au standard international IgE totales (OMS 2nd IRP75/502) et les résultats sont exprimés en kU/l et en classes (classe 0 : < 0,35, classe 1 : 0,35–0,7, classe 2 : 0,7–3,5, classe 3 : 3,5–17,5, classe 4 : 17,5–52,5, classe 5 : 52,5–100, classe 6 : > 100 kU/l).

3. Résultats des performances analytiques de l'Immuline® 2000

3.1. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité ($n = 12$) et la reproductibilité ($n = 30$) ont été étudiées pour d1, m6, e1, et g3. Les coefficients de variation intrasérie sont inférieurs à 5 % et ceux des interséries inférieurs à 12 % (Tableau 1).

Concernant les allergènes, la reproductibilité a été testée sur deux lots différents pour d1, d2, e1, g3, k82, t9, w9 sur un total de 102 sérums. Le coefficient de corrélation R^2 obtenu est de 0,957 ($y = 1,027x + 1,11$) (Fig. 2).

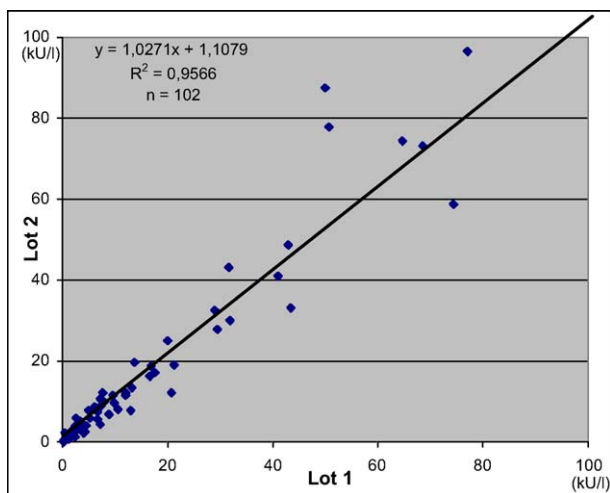


Fig. 2. Reproductibilité interlots avec les allergènes d1, d2, g3, k82, t9, w9.

3.2. Étalonnage

Six standards Pharmacia ont été dosés en double en utilisant une phase liquide couplée à un premier anti-IgE (au lieu de l'allergène). Les résultats obtenus correspondent aux valeurs attendues (Tableau 2).

3.3. Capacité de couplage

La capacité de couplage des allergènes à la phase liquide a été évaluée par des tests de dilution de sérums positifs (valeurs allant de 6 à plus de 100 kU/l, dont cinq sérums compris entre 60 et 100 kU/l et six sérums > 100 kU/l) vis-à-vis d'un ou plusieurs des allergènes suivants : d1 (15 sérums), d2 (un sérum), e1 (un sérum), g3 (huit sérums), k82 (un sérum), et t3 (quatre sérums). Les coefficients de corrélation R^2 obtenus sont supérieurs à 0,98 (Tableau 3). Les résultats de ces tests de dilution sont illustrés, respectivement pour d1 et t3, dans les Figs. 3 et 4.

3.4. Comparaison des résultats Immuline® 2000–ImmunoCAP® RIA

3.4.1. Tests de dépistage

La concordance globale entre les deux tests de dépistage, Alatorp™ (DPC) et Phadiatop™ (Pharmacia) sur 320 sérums est de 96,6 %. Les résultats de ces tests sont qualitatifs et rendus « positifs » ou « négatifs » selon le seuil de chaque test. Une zone « limite » a été intégrée pour chacun d'eux :

Tableau 2
Comparaison des standards Immuline 2000/CAP System

Valeurs standards Pharmacia (kU _A /l)	Valeurs obtenues sur Immuline 2000 (kU/l)
0,35	0,46
0,7	0,76
3,5	3,6
17,5	18,9
50	48,4
100	90,1

Tableau 3
Tests de dilution, analyse de régression

Allergènes	Pente (moyenne, écart-type)	R^2 (moyenne, écart-type)
d1 ($n = 15$)	$0,936 \pm 0,107$	$0,990 \pm 0,009$
d2 ($n = 1$)	0,975	0,978
g3 ($n = 8$)	$1,063 \pm 0,0922$	$0,980 \pm 0,036$
e1 ($n = 1$)	0,949	0,996
k82 ($n = 1$)	0,877	0,997
t3 ($n = 4$)	$1,047 \pm 0,060$	$0,992 \pm 0,007$

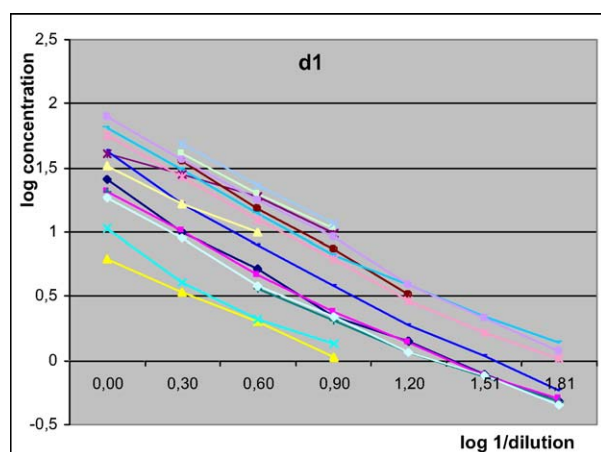


Fig. 3. Tests de dilution pour d1.

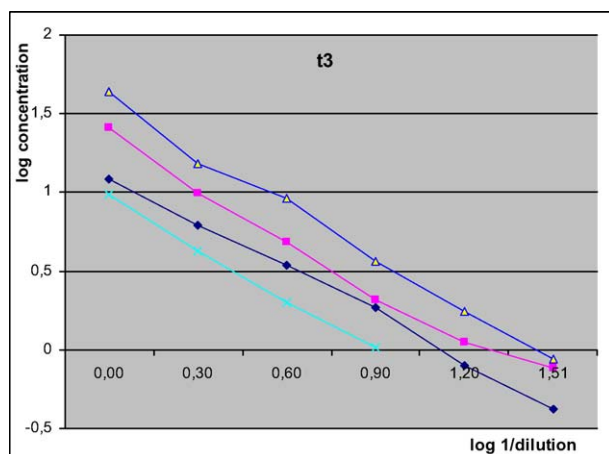


Fig. 4. Tests de dilution pour t3.

pour AlatopTM, elle est de $\pm 10\%$ de la valeur seuil exprimée en cps et pour PhadiatopTM elle est comprise entre 0,35 et 0,59 kU_A/l (Tableau 4).

3.4.2. IgE spécifiques unitaires

La concordance globale entre les deux méthodes sur 2409 sérums, pour les 35 allergènes testés, est de 90 % (782 négatifs et 1375 positifs) et la concordance à une classe de 87 %. Par rapport au CAP System, la sensibilité sur l'ensemble des allergènes de la technique Immulite 2000 est de 89 % et sa spécificité de 91 % (Tableaux 5 et 6, Figs. 5-1–5-35). Le nombre de résultats négatifs discordants à deux classes et plus (classe 0 avec une méthode vs classe 2 ou plus avec l'autre) est de 4,7 %. Les discordances DPC+/Pharmacia– ($n = 34$) sont à rapporter dans 53 % des cas à quatre allergènes : d1, e1, i3 et i75. Les discordances

DPC–/Pharmacia+ ($n = 80$) concernent dans 54 % des cas quatre autres allergènes : i6, m3, t7 et w6.

La spécificité de chacune des techniques a été évaluée par épreuve d'inhibition : le sérum est dosé avant et après incubation avec un allergène en phase liquide à différentes dilutions (Stallergènes) supposé réagir avec les IgE spécifiques. Une diminution du taux des IgE spécifiques de plus de 50 % est observée en cas de bonne spécificité [6]. Les tests d'inhibition ont été réalisés sur des sérums discordants, négatifs dans une technique et positifs ($> 0,7$ kU/l) avec l'autre méthode. Pour 15 sérums étudiés sur les 34 échantillons donnant des résultats DPC+/Pharmacia–, les pourcentages d'inhibition sont toujours supérieurs à 50 %. Pour 14 sérums étudiés sur les 80 échantillons donnant des résultats DPC–/Pharmacia+, les pourcentages d'inhibition pour g3, i4, i6, t3, t15, w1, sont supérieurs à 50 %, exceptés pour quatre sérums (2 sérums i1 où le pourcentage est $< 40\%$, 1 sérum i4 où il est à 42 % et 1 sérum i6 où il est à 48 %).

4. Discussion

Dans le diagnostic de l'allergie où les symptômes dus à un mécanisme IgE dépendant sont souvent difficiles à distinguer d'autres causes par la seule clinique et par les résultats de tests cutanés, des dosages exactes et reproductibles d'IgE spécifiques, montrent toute leur importance [1,8,11].

Dans cette étude, nous avons étudié les performances analytiques d'un nouveau dosage d'IgE spécifiques entièrement automatisé sur l'Immulite 2000.

Les répétabilités et reproductibilités observées sont conformes aux recommandations publiées par le *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), à savoir des coefficients de variation $< 10\%$ pour l'intrasérie et $< 15\%$ pour les interséries [12]. La standardisation par rapport aux IgE totales est confirmée, ce qui n'est pas le cas de toutes les techniques [5,9]. La reproductibilité interlots pour les allergènes est bonne. Les tests de dilution réalisés sur 30 sérums vis-à-vis de six allergènes sont excellents, les R^2 et les valeurs des pentes obtenus sont comparables aux résultats observés avec la technique ImmunoCAP System Pharmacia [10] et meilleurs que ceux observés avec la méthode Alastat (DPC) où la linéarité n'était obtenue qu'en dessous de 60 kU/l [7]. Dans nos essais de dilutions, 11 sérums sur 30 ont des valeurs pures largement supérieures à 60 kU/l. L'ensemble de ces performances permet d'obtenir un dosage quantitatif et reproductible d'IgE spécifiques.

La concordance de 97 % avec le PhadiatopTM est très bonne et supérieure à celle observée avec d'autres tests de

Tableau 4
Concordance AlatopTM versus PhadiatopTM

$n = 320$		Alatop TM		
		Négatif	Limite	Positif
Phadiatop TM	Négatif	202	17	7
	Limite	8	5	3
	Positif	4	2	72

Concordance globale 96,6 %. Limite : Alaton, $\pm 10\%$ valeur seuil en cps ; Limite: Phadiatop, 0,35 à 0,59 kU/l.

Tableau 5

IgE spécifiques Immulite 2000/CAP System

Allergènes testés	Concordance globale (%)	Sensibilité relative (%) ^a	Spécificité relative (%) ^a	Concordance à 1 classe (%)	Concordance à 2 classes (%)
d1 (n = 147)	93	95	88	88	99
d2 (n = 123)	95	98	89	76	98
d201 (n = 60)	100	100	100	98	100
e1 (n = 142)	89	95	78	87	98
e2 (n = 60)	93	89	100	97	100
e3 (n = 58)	90	88	92	84	98
e5 (n = 86)	87	85	92	93	100
e6 (n = 57)	93	92	94	96	98
e82 (n = 68)	91	87	97	85	97
e84 (n = 27)	96	100	96	100	100
g2 (n = 29)	90	79	100	97	100
g3 (n = 145)	94	96	90	88	100
g5 (n = 58)	98	100	92	76	97
g12 (n = 61)	92	93	87	87	100
g15 (n = 52)	92	95	80	73	96
h2 (n = 44)	100	100	100	100	100
i1 (n = 66)	89	93	91	89	97
i3 (n = 85)	89	98	62	91	99
i4 (n = 66)	80	75	91	97	100
i6 (n = 82)	59	42	100	76	98
i75 (n = 45)	80	69	84	78	96
k81 (n = 25)	96	100	93	96	100
k82 (n = 54)	91	96	87	83	98
m3 (n = 51)	80	74	94	69	96
m6 (n = 127)	96	94	100	96	100
t3 (n = 94)	89	90	87	63	90
t6 (n = 59)	92	87	97	78	93
t7 (n = 48)	73	62	100	63	88
t9 (n = 32)	91	100	70	81	100
t15 (n = 100)	89	85	97	94	99
t23 (n = 74)	93	93	94	100	100
w1 (n = 60)	87	90	75	88	100
w6 (n = 64)	80	75	94	83	98
w9 (n = 30)	97	100	90	97	100
w21 (n = 32)	84	71	100	94	100
Tout allergène confondu (n = 2409)	90	89	91	87	98

Sensibilité, nombre de sérums positifs avec les deux techniques/nombre de sérums positifs avec le CAP ; Spécificité, nombre de sérums négatifs avec les deux techniques/nombre de sérums négatifs avec le CAP.

^a Exprimé par rapport aux résultats obtenus avec le CAP System.

Tableau 6

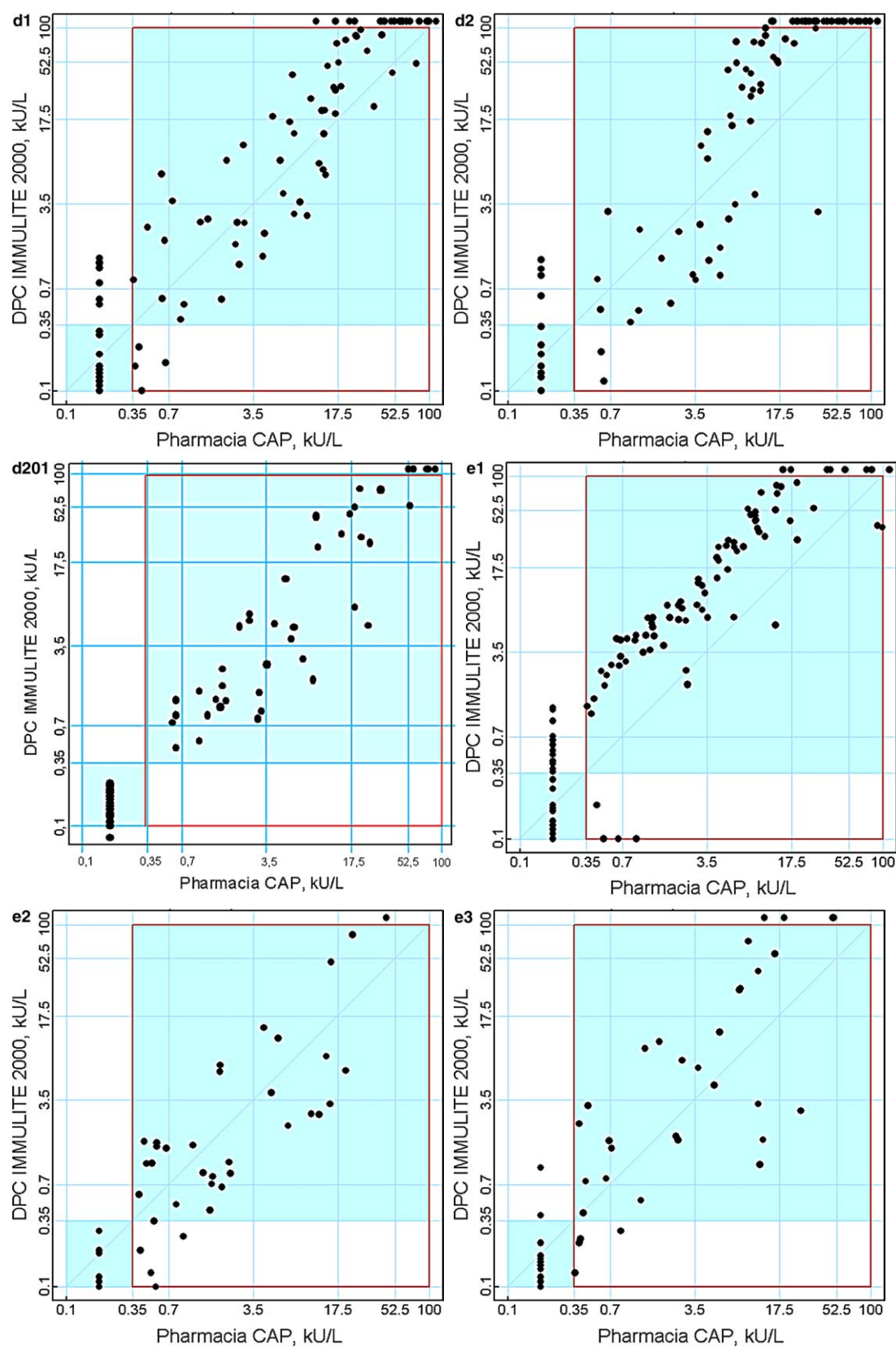
Concordance IgE spécifiques Immulite 2000/CAP System

CAPkUA/I							
>100			3	2	1	45	
52,5–100		2	2	15	8	68	
17,5–52,5	1	10	29	29	31	93	
3,5–17,5	9	10	125	176	104	38	21
0,70–3,5	71	70	248	102	8		1
0,35–0,70	94	46	76	11			
< 0,35	782	44	31	2	1		
< 0,35	< 0,35	0,35–0,70	0,70–3,5	3,5–17,5	17,5–52,5	52,5–100	> 100
							DPC kU/I

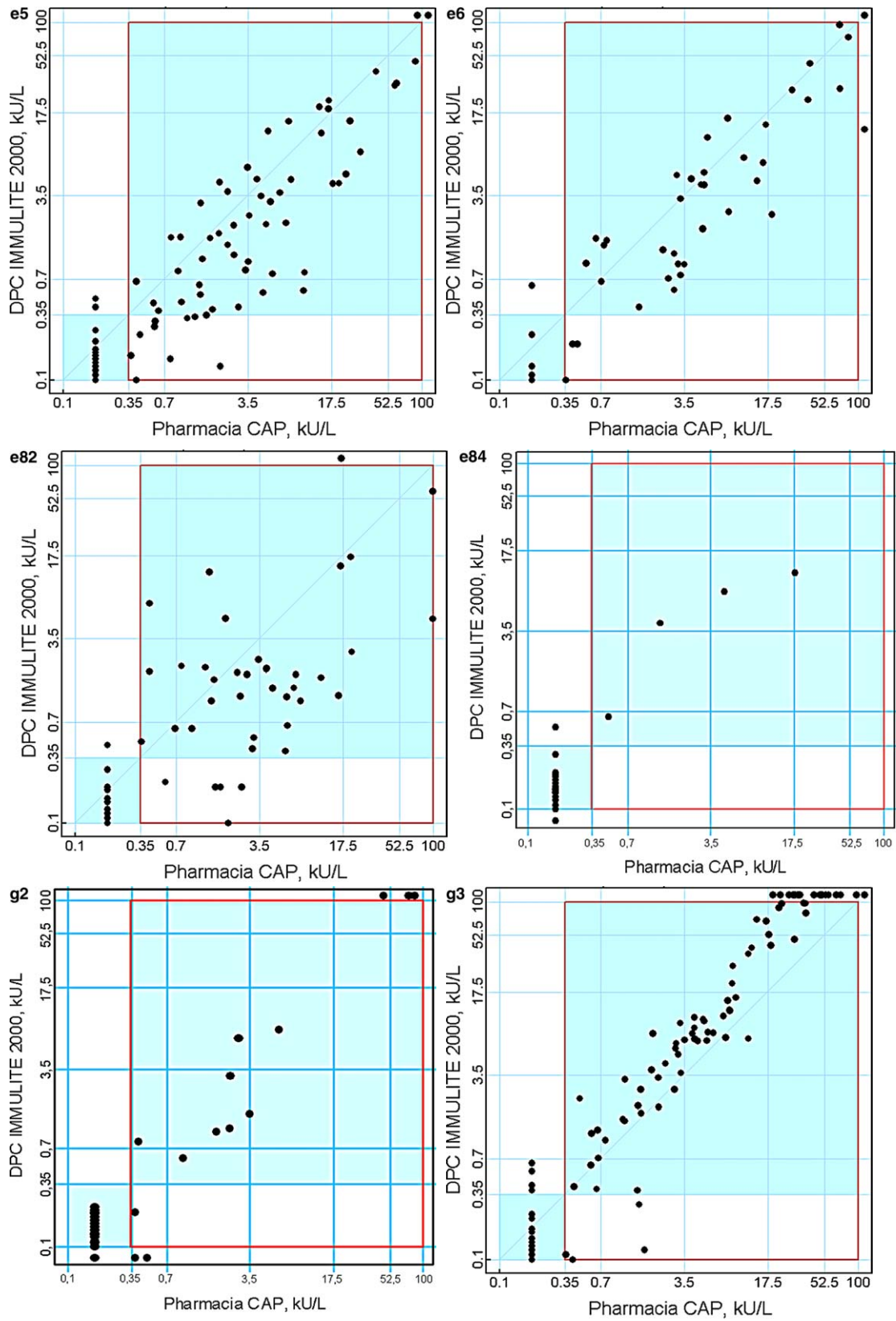
n = 2409 ; Concordance globale : 90 % ; Concordance à une classe : 87 %.

dépistage [4]. La concordance entre Immulite 2000 et CAP system, tout allergène confondu, est globalement de 90 % et de 87 % à une classe d'écart. Par comparaison au CAP System, les sensibilités et spécificités relatives sont bonnes.

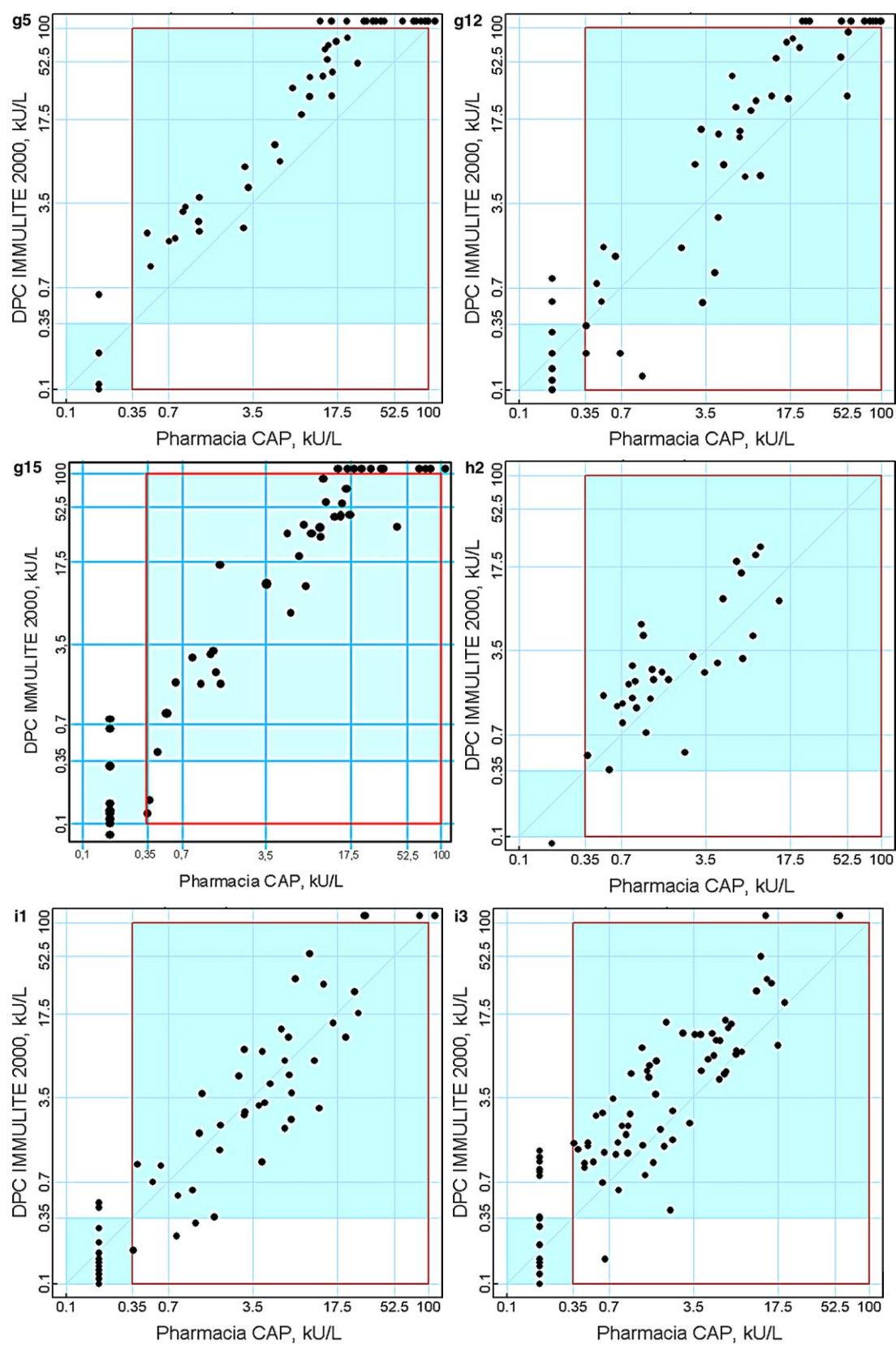
Le biais de recrutement pour comparer un grand nombre de sérums positifs explique pour partie le plus grand nombre de sérums trouvés positifs en technique Pharmacia et négatifs en technique DPC par rapport à l'inverse. Les spécificités des



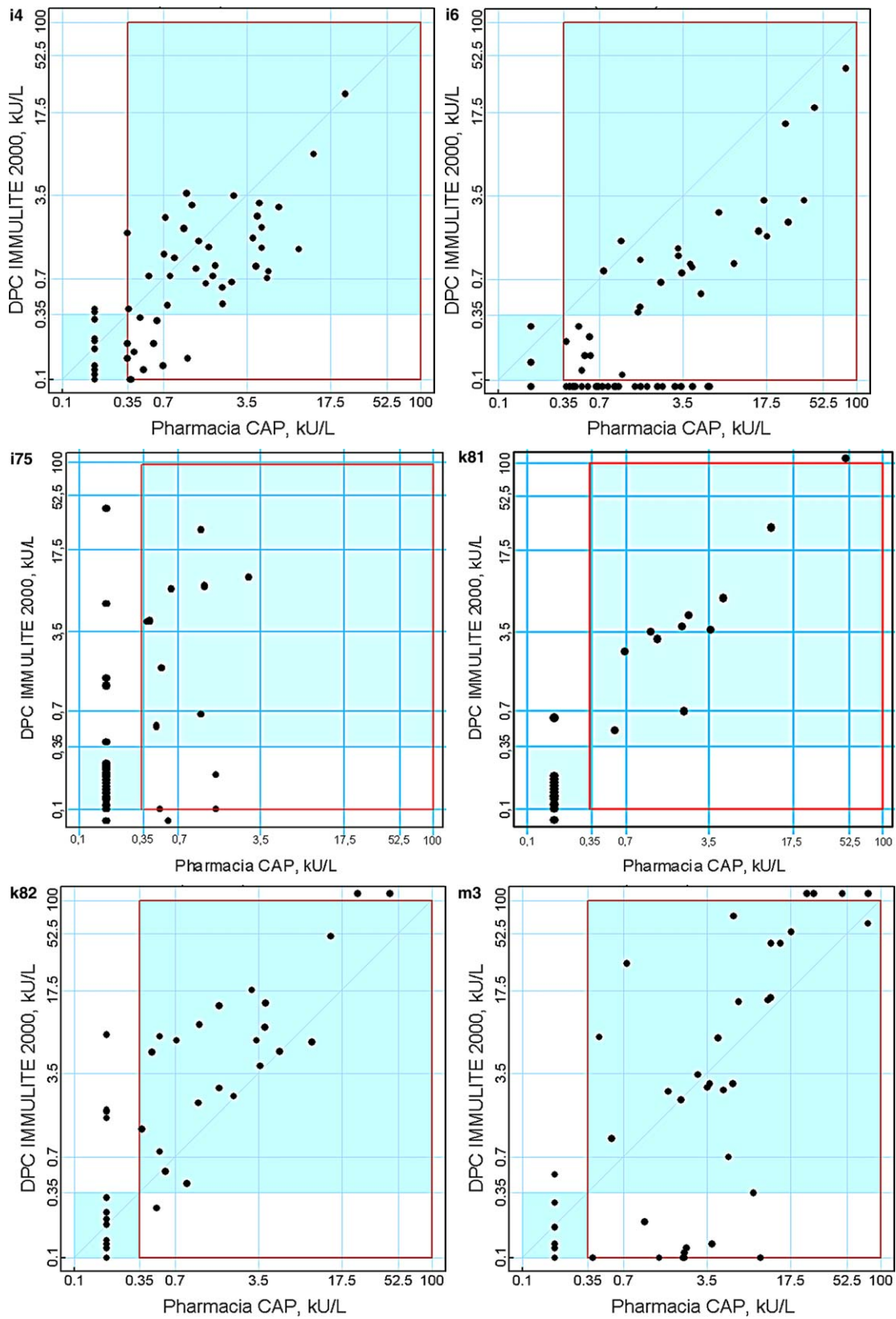
Figs. 5-1–5-35. Comparaison des résultats IgE spécifiques Immulite® 2000 vs CAP System pour les 35 allergènes étudiés.



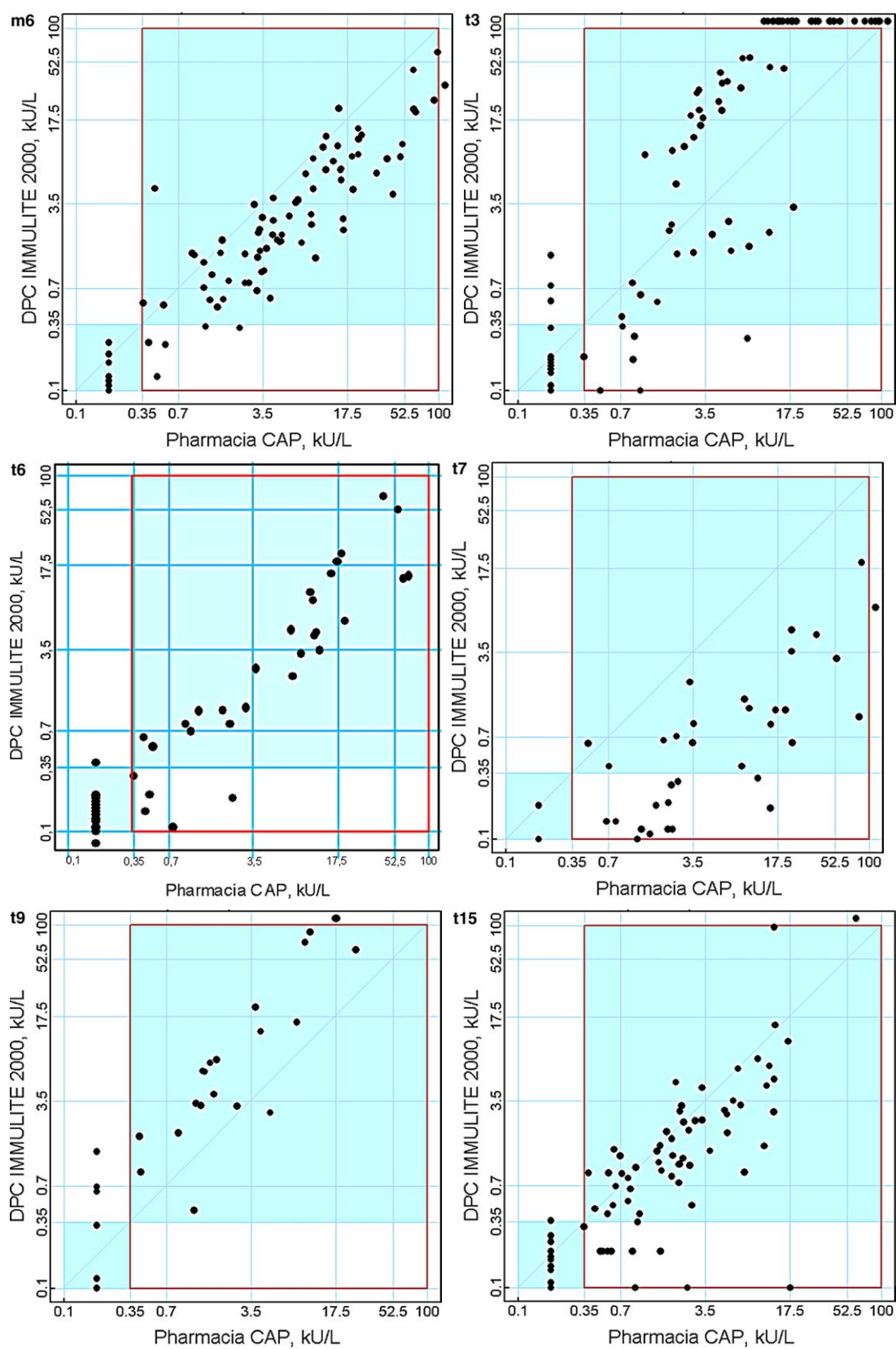
Figs. 5-1–5-35. (Suite).



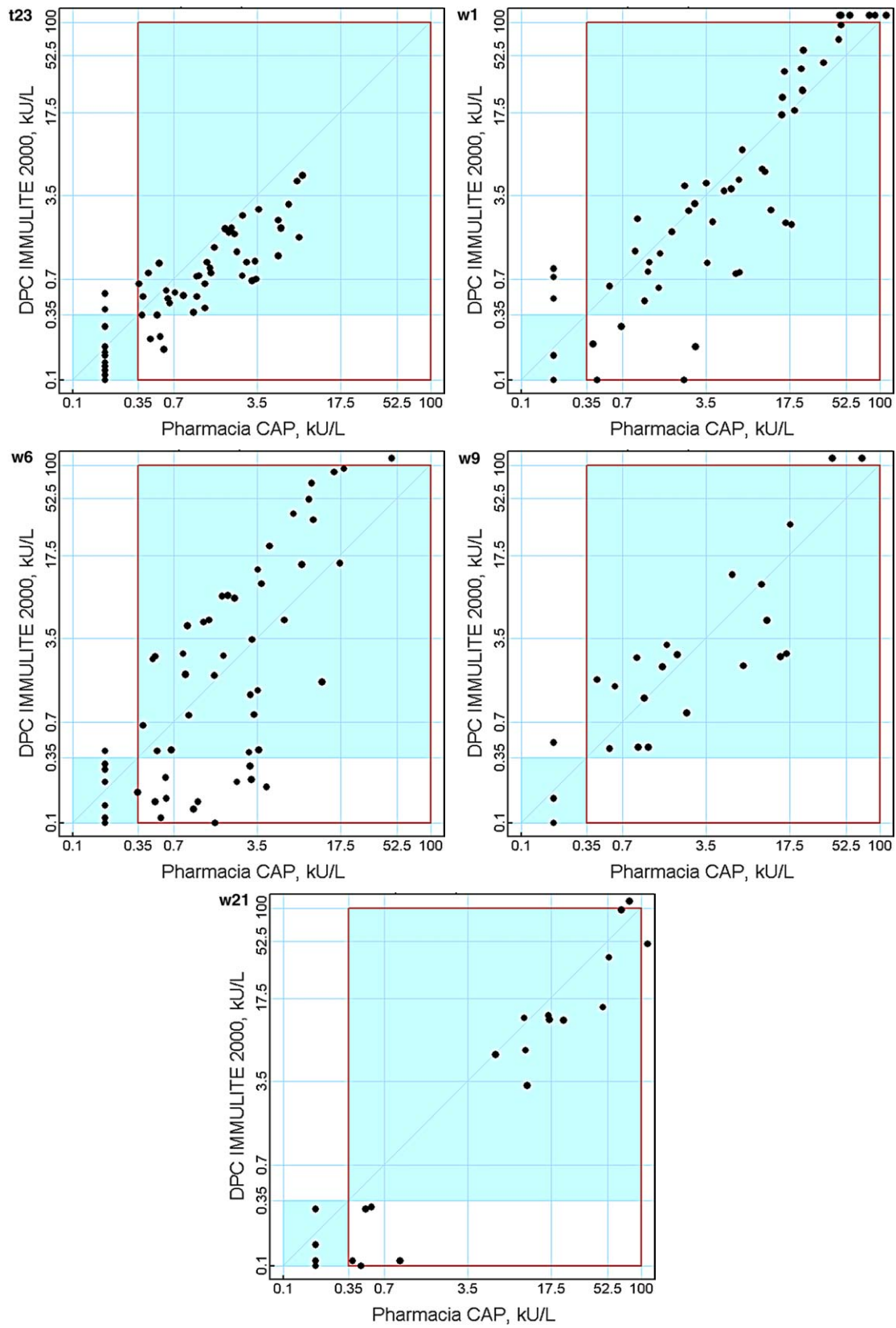
Figs. 5-1–5-35. (Suite).



Figs. 5-1–5-35. (Suite).



Figs. 5-1–5-35. (Suite).



Figs. 5-1–5-35.

deux techniques sont confirmées puisque les tests d'inhibition réalisés sont positifs, à l'exception faite des sérums positifs avec la technique CAP System vis-à-vis des venins d'hyménoptères i1 et i4 et peut être également des sérums positifs vis-à-vis de la blatte (pour 3 sérums sur 4, le % d'inhibition est bien supérieur à 50 %, mais les concentrations d'inhibiteur ajoutées sont largement supérieures à celles des autres allergènes). Le manque de sensibilité de l'une ou l'autre de ces techniques pour certains allergènes pourrait provenir d'une matière première à l'origine différente et/ou d'un mode de couplage occultant certains épitopes [2].

Les résultats analytiques de cette étude sont performants. S'ils se maintiennent dans le temps, et se confirment avec la majorité des allergènes proposés, cette technique ouvre la porte vers une nouvelle génération de dosages dans le domaine de l'allergologie avec tous les avantages d'une automatisation complète : fiabilité accrue du dosage notamment au niveau de la distribution des allergènes, technique plus courte et délai de rendu des résultats amélioré, gestion automatisée des réactifs, ce qui améliorent grandement l'intégration technique de ce dosage dans les laboratoires.

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement A. Burnichon et L. Siard pour leur excellente compétence technique et leur grande disponibilité.

Références

- [1] Ahlstedt S. Understanding the usefulness of specific IgE tests in allergy. *Clin Exp All* 2002;32:11–6.
- [2] El Shami AS, Alaba O. Liquid-phase in vitro allergen-specific IgE assay with in situ immobilization. In: El Shami AS, Merrett TG, editors. *Allergy and Molecular Biology*. Pergamon Press; 1988. p. 191–201 collection: *Advances in the biosciences*, vol. 74.
- [3] Ewan PW, Coote D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (The ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 1990;45:22–9.
- [4] Felden F, Croizier A. Vidas Stallertest: clinico-biological evaluation of a new global test for respiratory allergy. *Pathol Biol* 1998;46:819–23.
- [5] Frémont S, Felden F, Masson C, Abuaf N, Haudeberque N, Nicolas JP. Évaluation analytique des réactifs de dosage des IgE spécifiques Stallergy TM. *Ann Biol Clin* 2001;59:334–8.
- [6] Miralles JC, Caravaca F, Guillén F, Lombardero M, Negro JM. Cross reactivity between platanus pollen and vegetables. *Allergy* 2002;57:146–9.
- [7] Moneret-Vautrin DA, Halpern G, Kanny G, Brignon J, Nicolas JP. Intérêt du test AlaSTAT pour la mise en évidence d'IgE spécifiques aux allergènes alimentaires. Étude comparative avec le RAST Phadebas Cap System. *Rev Fr Allergol* 1992;32:188–95.
- [8] Söderström L, Kober A, Ahlstedt S, de Groot H, Lange CE, Paganelli R, Roovers MHW, Sastre J. A further evaluation of the clinical use of specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 2003;58:921–8.
- [9] Szeinbach SL, Barnes JH, Sullivan TJ, Williams PB. Precision and accuracy of commercial laboratories' ability to classify positive and/or negative allergen-specific IgE results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:373–81.
- [10] Williams PB, Barnes JH, Szeinbach SH, Sullivan TJ. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: Establishing a standard. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1221–30.
- [11] Yunginger JW, Ahlstedt A, Eggleston PA, Homburger HA, Nelson HS, et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1077–84.
- [12] Division of Clinical Laboratory Devices, Office of Device Evaluation. In: Review criteria for the assessment of allergen-specific immunoglobulin E (IgE) in vitro diagnosis devices using immunological methods. Washington: Public Health Service; 2000. p. 1–18.