

# Kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen: uitdagingen in het GZA ziekenhuis

Promotor: apr. biol. Sofie Schouwers

# Outline

- Inleiding
- Detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen
- Anti-nucleosoom antistoffen
- Vergelijkende studie in GZA
- Conclusie

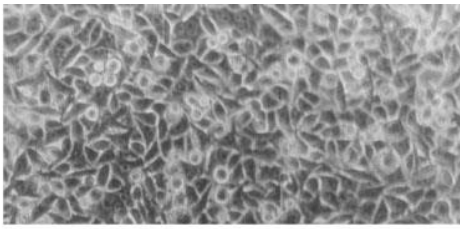
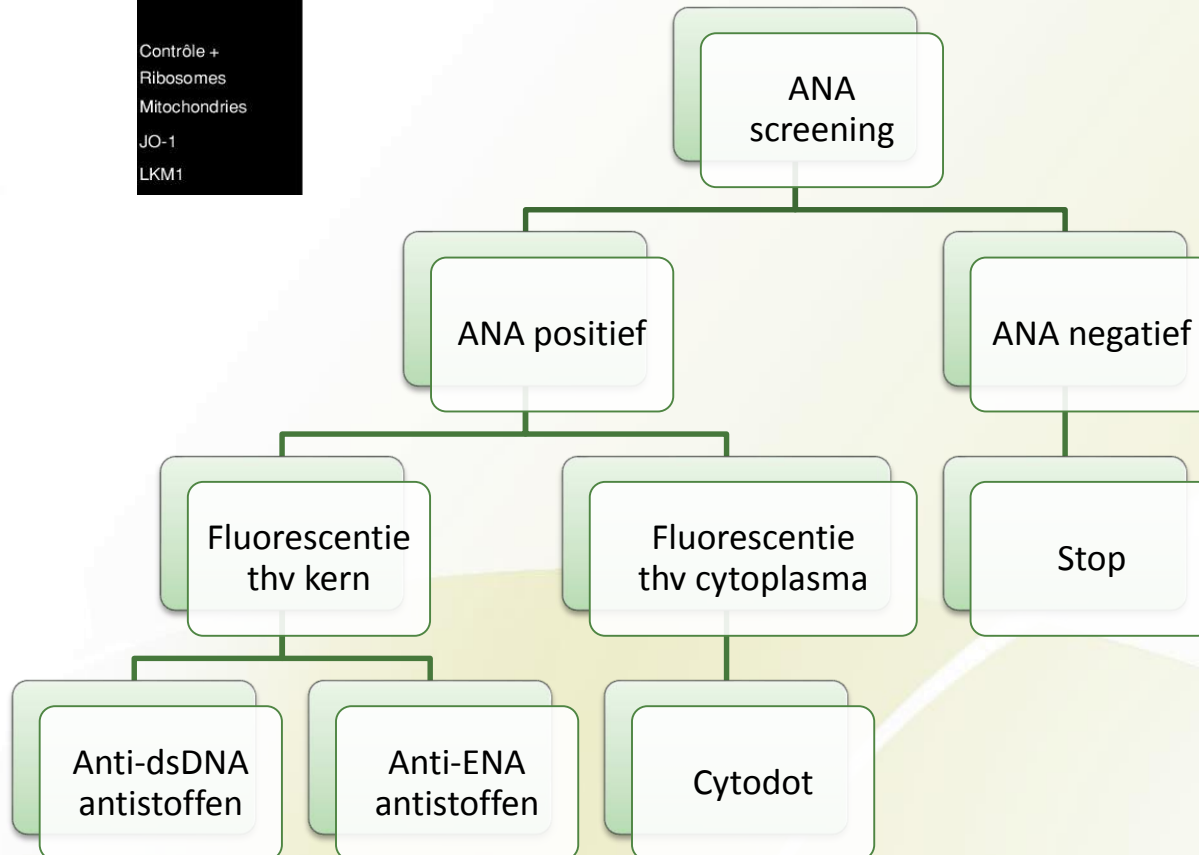
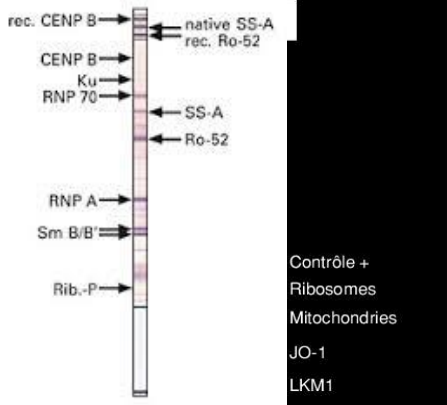


Figure 1 - Hep-2 line growth (16X) in monolayer with metaphase cells in suspension.

- **Antinucleaire antistoffen (ANA's)**
  - Merkers voor systemische reumatoïde aandoeningen
    - Systemische lupus erythematosus (SLE)
    - Syndroom van Sjögren
    - Systeem sclerose
    - Mixed Connective Tissue Disease
    - ...
  - IIF Hep2(000) cellen
    - Antistoffen tegen nucleaire antigenen
      - Anti-dsDNA antistoffen
      - Antinucleosoom antistoffen (ANuA's)
      - Anti-SSA/SSB antistoffen
      - ...
    - Antistoffen tegen cytoplasmatische antigenen

# Inleiding

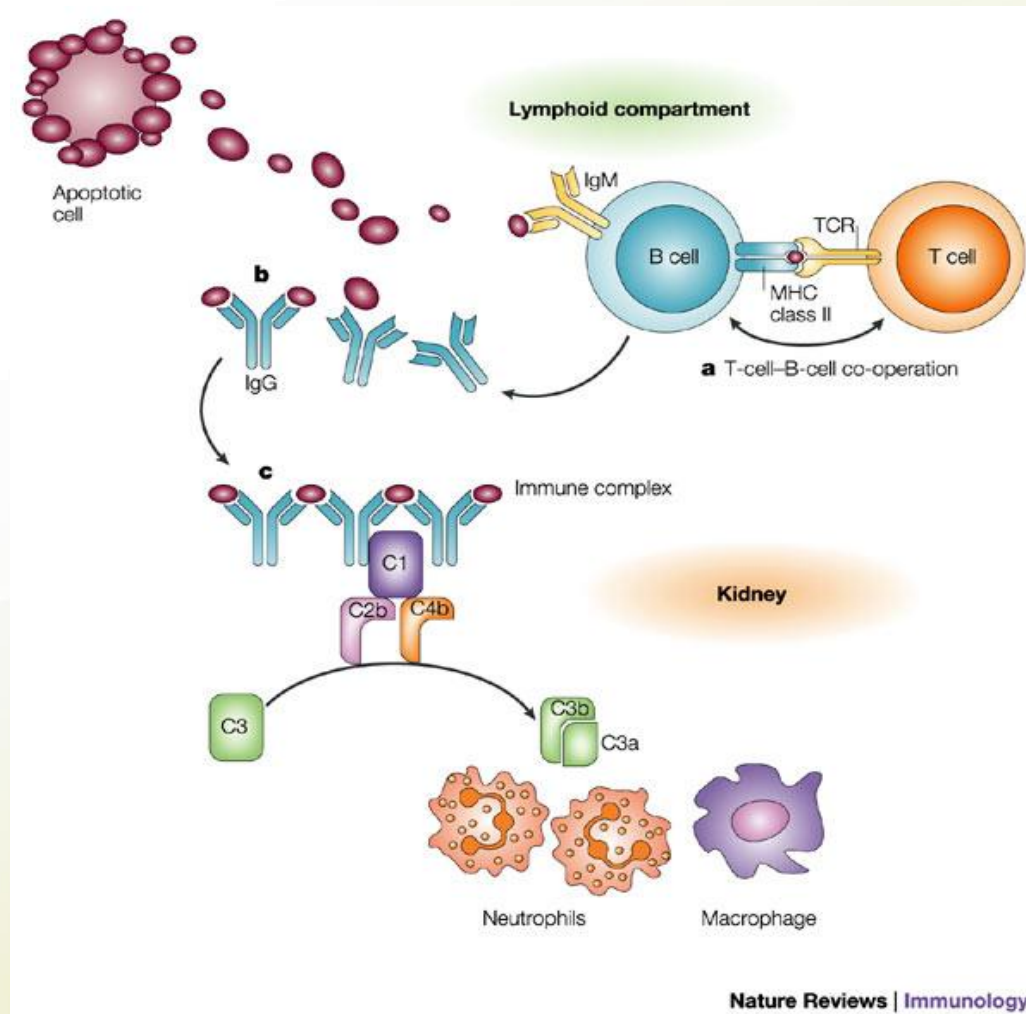


# Inleiding

- Systemische lupus erythematosus (SLE)
  - Prevalentie
    - 1/1000
    - Vrouwen > mannen
  - Pathogenese

# Inleiding

- Pathogenese SLE



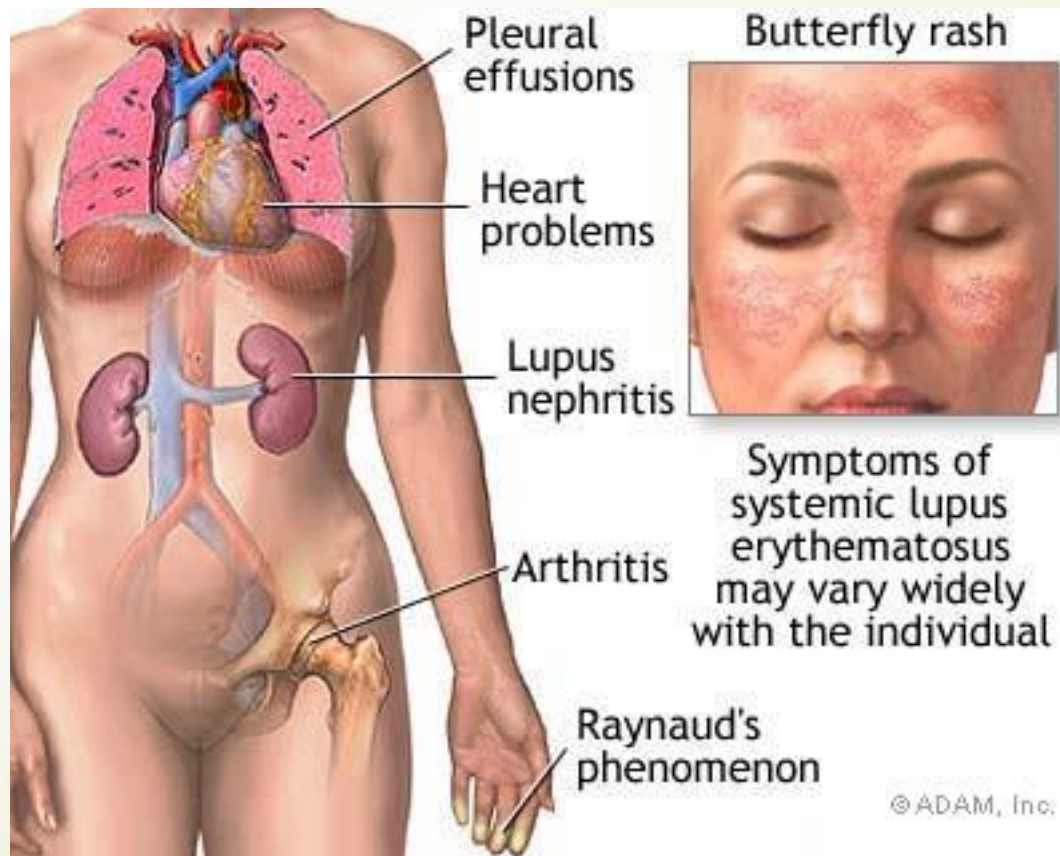
Carroll et al., Nature Reviews Immunology 4, 825-831 (October 2004)

# Inleiding

- SLE
  - Prevalentie
    - 1/1000
    - vrouwen > mannen
  - Pathogenese
  - Symptomen

# Inleiding

- SLE klinisch



<http://www.nytimes.com/health/guides/disease/systemic-lupus-erythematosus/overview.html>



# ACR criteria

1. Malar rash
2. Discoid rash
3. Photosensitivity
4. Oral ulcers
5. Nonerosive arthritis
6. Pleuritis or pericarditis
7. Renal disorder
8. Neurological disorder
9. Hematological disorder
10. Immunological disorders <ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Anti-DNA antibodies</b></li><li>- Anti-Sm antibodies</li><li>- Antiphospholipid antibodies</li></ul>
11. Positive antinuclear antibodies

# ACR criteria

1. Malar rash
2. Discoid rash
3. Photosensitivity
4. Oral ulcers
5. Nonerosive arthritis
6. Pleuritis or pericarditis
7. Renal disorder
8. Neurological disorder
9. Hematological disorder
10. Immunological disorders <ul style="list-style-type: none"><li>- Anti-DNA antibodies</li><li>- Anti-Sm antibodies</li><li>- Antiphospholipid antibodies</li></ul>
11. Positive antinuclear antibodies

- Niet-specifiek
  - Lage aviditeit
  - IgM >> IgA, IgG
  - ≠ antigenen zoals ssDNA

- SLE specifiek
  - Hoge aviditeit
  - IgG >> IgM, IgA
  - dsDNA

# Inleiding

- Diagnose
  - ANA's → screeningstest
    - Sensitiviteit voor SLE > 95 %
    - Specificiteit voor SLE 57 %
  - Anti-dsDNA antistoffen → confirmatietest
    - Sensitiviteit voor SLE 25 - 85 %
    - Specificiteit voor SLE > 95 %
- Opvolging
  - Correlatie met SLE ziekteactiviteit

# Belgian recommendations on ANA, anti-dsDNA and anti-ENA antibody testing

**M. Van Blerk<sup>1,2</sup>, X. Bossuyt<sup>2,3</sup>, R. Humbel<sup>2,4</sup>, A. Mewis<sup>2,5</sup>, G. Servais<sup>2,6</sup>,  
J. P. Tomasi<sup>2,7</sup>, C. Van Campenhout<sup>1,2</sup>, L. Van Hoovels<sup>2,8</sup>, M. Vercammen<sup>2,9</sup>,  
J. Damoiseaux<sup>10</sup>, W. Coucke<sup>1</sup>, P. Van de Walle<sup>1</sup>**

- ...
- 5. The method used for determining anti-dsDNA antibodies should be specified when reporting the result.
- 6. It is not recommended to use a dot technique for anti-dsDNA antibody detection.
- 7. The results of the anti-dsDNA antibody determination should be reported quantitatively.
- ...



GZA ziekenhuis: kwalitatieve bepaling anti-dsDNA antistoffen

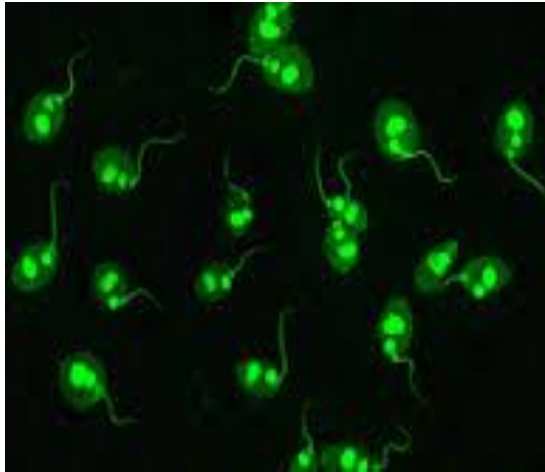
# Outline

- Inleiding
- Detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen
- Anti-nucleosoom antistoffen
- Vergelijkende studie in GZA
- Conclusie

*Vraag 1:*

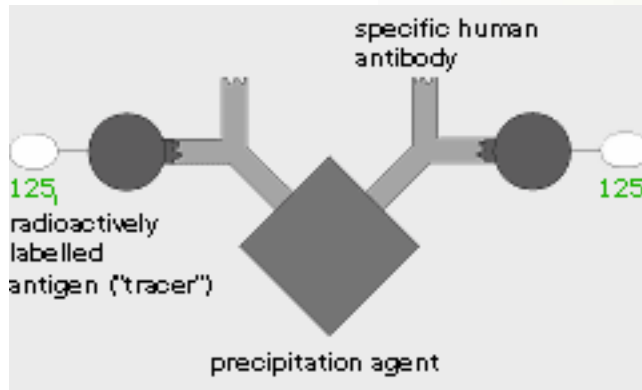
***Welke laboratoriumtesten zijn er beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen en wat is hun performantie?***

# IIF van *Crithidia luciliae* (CLIFT)



- IgG antistoffen met gemiddelde tot hoge aviditeit
- Manuele microscopie
  - Performantie afhankelijk van ervaring microscopist
  - Semi-kwantitatief resultaat
    - Titer
- Automatische microscopie (Novaview)
  - Meer gestandaardiseerd
  - Semi-kwantitatief resultaat
    - Fluorescentie-intensiteit → autotiter

# RIA: Farr analyse



- Antistoffen met hoge aviditeit
- IgG, IgA en IgM
- Voordeel
  - Gouden standaard wat specificiteit betreft
  - Kwantificatie
- Nadeel
  - Gebruik van radioactieve reagentia



# Enzyme immunoassays (EIA)

- Klassieke ELISA



- Fluorometrische EIA (FEIA)



- EIA op basis van chemoluminescentie (CLIA)



- Heterogene groep
- Voordeel
  - Gevoelig
  - Kwantificatie
  - Automatisatie

## *Vraag 1:*

*Welke laboratoriumtesten zijn er beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van anti-dDNA antistoffen en wat is hun performantie?*

# Launay et al., 2010

- Analyses
  - Farr
  - CLIFT
  - 3 EIA's
- Populatie
  - SLE (n = 99)
  - Controlepopulatie
    - Gezonde vrijwilligers (n = 101)
    - 'Zieke' controlepopulatie: andere systemische reumatoïde aandoeningen dan SLE (SRD; n = 53)

# Launay et al., 2010

	Tov gezonde controlepopulatie		Tov 'zieke' controlepopulatie		Tov 'zieke' controlepopulatie op 95 % specificiteit			
	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	LR+	LR-
Liaison® (CLIA)	78,6	96	78,6	84,9	67,3	95	13,5	0,34
Elia® (FEIA)	66,3	95	66,3	94,3	62,1	95	12,4	0,40
Diastat® (ELISA)	77,8	94,1	77,8	86,8	35,4	95	7,1	0,68
CLIFT	16,8	100	16,8	100	nvt	nvt	nvt	nvt
Farr	79,8	98	79,8	79,2	75,8	95	15,2	0,25

# Ghirardello et al., 2011

- Analyses
  - Farr
  - CLIFT
  - 2 EIA's
- Populatie
  - SLE (n = 223)
  - Controlepopulatie
    - Gezonde vrijwilligers (n = 55)
    - 'Zieke' controlepopulatie
      - Virale infecties (n = 64)
      - Andere SRD dan SLE (n = 64)
      - Cryoglobulinemie (n = 27)
      - Maligniteiten (n = 6)

# Ghirardello et al., 2011

	Tov hele controlepopulatie		Tov patiënten met andere SRD dan SLE	
	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)
Elia® (FEIA)	81	92	81	83
Farrzyme (ELISA)	52	95	52	92
CLIFT	83	91	83	81
Farr	95	89	95	75

# Conclusie vraag 1

- Literatuur:
  - CLIFT toont lage sensitiviteit
  - Farr toont goede performantie
  - EIA's tonen wisselende performantie
- GZA ziekenhuis:
  - CLIFT als enige test onvoldoende
  - Farr praktisch niet haalbaar
  - Geen duidelijke 'beste methode'
    - ➔ zelf vergelijkende studie opgezet

# Outline

- Inleiding
- Detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen
- Anti-nucleosoom antistoffen
- Vergelijkende studie in GZA
- Conclusie



*Vraag 2:*

*Wat is de waarde van anti-nucleosoom  
antistoffen voor de laboratoriumdiagnostiek  
van SLE?*

# Anti-nucleosoom antistoffen (ANuA's)



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

## Autoimmunity Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/autrev](http://www.elsevier.com/locate/autrev)



Review

Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis

Nicola Bizzaro <sup>a,\*</sup>, Danilo Villalta <sup>b</sup>, Davide Giavarina <sup>c</sup>, Renato Tozzoli <sup>d</sup>

Review

**Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?**

D. A. Isenberg, J. J. Manson, M. R. Ehrenstein and A. Rahman

# Bizzaro et al., 2012

- Performantie ANuA's voor diagnose van SLE

**Table 3**

Results of pooled estimate comparison of ANuA with anti-dsDNA antibody assay (33 studies).

	ANuA		anti-dsDNA	
	%	(95%CI)	%	(95%CI)
Sensitivity	59.9	(58.2–61.6)	52.4	(5.07–54.0)
Specificity	94.9	(94.3–95.4)	94.2	(93.5–94.9)
Positive likelihood ratio	14.3	(8.7–23.4)	12.7	(7.9–20.6)
Negative likelihood ratio	0.39	(0.33–0.46)	0.47	(0.40–0.55)
Summary Diagnostic Odds Ratio	41.0	(23.8–70.8)	27.8	(16.7–46.1)

# Bizzaro et al., 2012

- Performantie ANuA's en anti-dsDNA antistoffen voor monitoring SLE ziekte-activiteit

**Table 5**

Correlation results of ANuA and anti-dsDNA antibody assays with nephropathy and disease activity (25 studies).

Reference	No. of SLE patients	ANuA		anti-dsDNA	
		Correlation with disease activity	Correlation with active renal disease	Correlation with disease activity	Correlation with active renal disease
Amoura et al. [15]	58	$p > 0.05$	-	-	-
Amoura et al. [16]	120	$p < 0.0001$	$p = 0.004$	-	-
Braun et al. [17]	78	$p = 0.0001$	$p > 0.05$	-	-
Bruns et al. [27]	136	$p < 0.0001$	$p < 0.02$	-	-
Campos et al. [50]	74	$p < 0.001$	$p > 0.05$	$p = 0.001$	-
Cervera et al. [29]	100	$p = 0.01$	$p < 0.01$	-	$p < 0.001$
Cortés-Hernández et al. [30]	199	$p = 0.01$	$p = 0.04$	$p = 0.02$	$p = 0.0001$
Düzgün et al., [31]	131	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Ghirardello et al. [32]	101	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Julkunen et al. [34]	296	-	$p = 0.006$	-	-
Min et al. [19]	129	$p < 0.001$	$p > 0.05$	-	-
Pútová et al. [37]	74	-	$p < 0.001$	-	-
Quattrocchi et al. [38]	47	$p > 0.05$	$p > 0.05$	-	-
Ravirajan et al. [20]	33	$p = 0.022$	$p = 0.4$	-	-
Saisoong et al. [40]	65	$p = 0.007$	$p < 0.05$	$p = 0.002$	$p > 0.05$
Sallai et al. [21]	105	$p < 0.01$	$p > 0.05$	-	-
Schett et al. [39] (a)	73	$p < 0.001$	-	$p = 0.02$	-
Schett et al. [39] (b)	73	$p = 0.001$	-	-	-
Shabana et al. [23]	38	$p < 0.001$	$p < 0.01$	-	-
Simón et al. [44]	73	$p < 0.0001$	$p = 0.01$	$p = 0.03$	-
Su et al. [45]	233	$p < 0.001$	$p = 0.048$	-	-
Tikdy et al. [25]	86	$p = 0.024$	$p > 0.05$	-	-
Wu et al. [51] (a)	30	$p < 0.0001$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.001$
Wu et al. [51] (b)	29	$p = 0.047$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	-
Navarra et al. [36]	232	-	$p = 0.028$	-	-
Total	2613	19/22 ( $p < 0.0001$ )	13/22 ( $p = 0.365$ )	6/9 ( $p = 0.344$ )	4/6 ( $p = 0.562$ )

# Conclusie vraag 2

- ANuA's beloftevol voor diagnose SLE en monitoring SLE ziekteactiviteit
- Inclusie van ELISA voor ANuA's in vergelijkende studie van vraag 3

# Outline

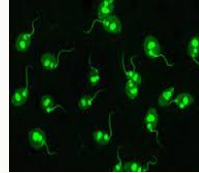
- Inleiding
- Detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen
- Anti-nucleosoom antistoffen
- Vergelijkende studie in GZA
- Conclusie

## *Vraag 3:*

*Hoe kan de bepaling van anti-dsDNA  
antistoffen in het klinische laboratorium van  
het GZA ziekenhuis geoptimaliseerd  
worden?*

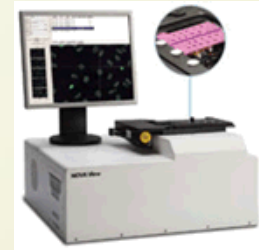
# Vergelijkende studie in GZA ziekenhuis

- CLIFT met DAPI-conjugaat (Inova)



Quantalyser (Inova)

+



Novaview (Inova)

- QUANTA Lite® HA dsDNA ELISA (FARRZYME; Inova)



Quantalyser (Inova)

- Anti-dsDNA-NcX IgG ELISA (ANuA; Euroimmun)



Quantalyser (Inova)

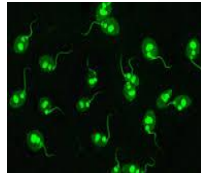
- QUANTA flash® dsDNA (Inova)



Bioflash (Inova)



# Vergelijkende studie in GZA ziekenhuis



	CLIFT + DAPI	FARRZYME	ANuA	QUANTAFLASH
<b>Principe</b>	IIF	ELISA	ELISA	CLIA
<b>dsDNA bron</b>	Crithidia luciliae kinetoplast	Kalf thymus	dsDNA + nucleosoom complex	Kalf thymus
<b>Isotype antistoffen</b>	IgG	IgG	IgG	IgG
<b>Eenheid</b>	LIU <sup>1</sup> of titer	IU/mL	IU/mL	IU/mL
<b>Afkapwaarde</b>	120 LIU	30 IU/mL	100 IU/mL	35-45 IU/mL
<b>Platform</b>	NOVA View®	NOVA View®	NOVA View®	BIO-FLASH®
<b>Traceerbaarheid kalibratie</b>	nvt	WHO referentieserum (Wo/80)	WHO referentieserum (Wo/80)	WHO referentieserum (Wo/80)
<b>Aantal testen per kit</b>	240	96	96	50
<b>Catalogusprijs per kit excl. BTW (EUR)</b>	893,00	522,00	304.76	453,00 <sup>2</sup>
<b>Catalogusprijs per test excl. BTW (EUR)</b>	3,72	5,44	3.17	9,06 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>LIU = light intensity units, <sup>2</sup>Prijs inclusief dsDNA control set (30 shifts) en dsDNA calibrator set (2 shifts)

# Vergelijkende studie in GZA ziekenhuis

- Technische validatie
  - Within-day reproducibility
  - Between-day reproducibility
  - Juistheid
- Klinische studie

# within-day reproducibility

- 3 patiëntstalen: onder, rond en boven cut-off
- Analyse in tienvoud in één run

	CLIFT+DAPI (LIU)	Farrzyme (IU/mL)			ANuA(IU/mL)	QUANTAFLASH(IU/mL)		
<b>Cut-off</b>	120	30			100	35-45		
<b>Runs</b>	Pending	10			Pending	10		
<b>Level</b>	Pending	L1	L2	L3	Pending	L1	L2	L3
<b>Mean</b>	Pending	11,9	32,7	2263,2	Pending	<9,8	46,6	323,6
<b>Range</b>	Pending	[11,8-11,98]	[30,5-34,78]	[1470,64-3423,3]	Pending	<9,8	[44,9-47,7]	[309,6-337,1]
<b>SD</b>	Pending	0,08	1,49	651,74	Pending	nvt	0,93	8,80
<b>CV (%)</b>	Pending	0,64	4,57	28,80	Pending	nvt	1,99	2,72

# between-day reproducibility (voorlopige resultaten)

- 3 patiëntstalen: onder, rond en boven cut-off
- Kitcontroles
- Analyse in 10 verschillende runs

# between-day reproducibility (voorlopige resultaten)

- 3 patiëntstalen: onder, rond en boven cut-off

	CLIFT+DAPI (LIU)	Farrzyme (IU/mL)			ANuA(IU/mL)	QUANTAFLASH(IU/mL)		
<b>Cut-off</b>	120	30			100	35-45		
<b>Runs</b>	Pending	5			Pending	4		
<b>Level</b>	Pending	L1	L2	L3	Pending	L1	L2	L3
<b>Mean</b>	Pending	11,70	39,73	2668,27	Pending	<9,8	45,4	298,6
<b>Range</b>	Pending	[11,25-11,90]	[31,15-54,98]	[1198,98-5933,76]	Pending	nvt	[40,3-49,9]	[259,0-326,4]
<b>SD</b>	Pending	0,27	9,45	1944,88	Pending	nvt	4,2	30,3
<b>CV (%)</b>	Pending	2,27	23,79	72,89	Pending	nvt	9,35	10,16

# between-day reproducibility (voorlopige resultaten)

- Kitcontroles
  - Positieve controle
  - Negatieve controle

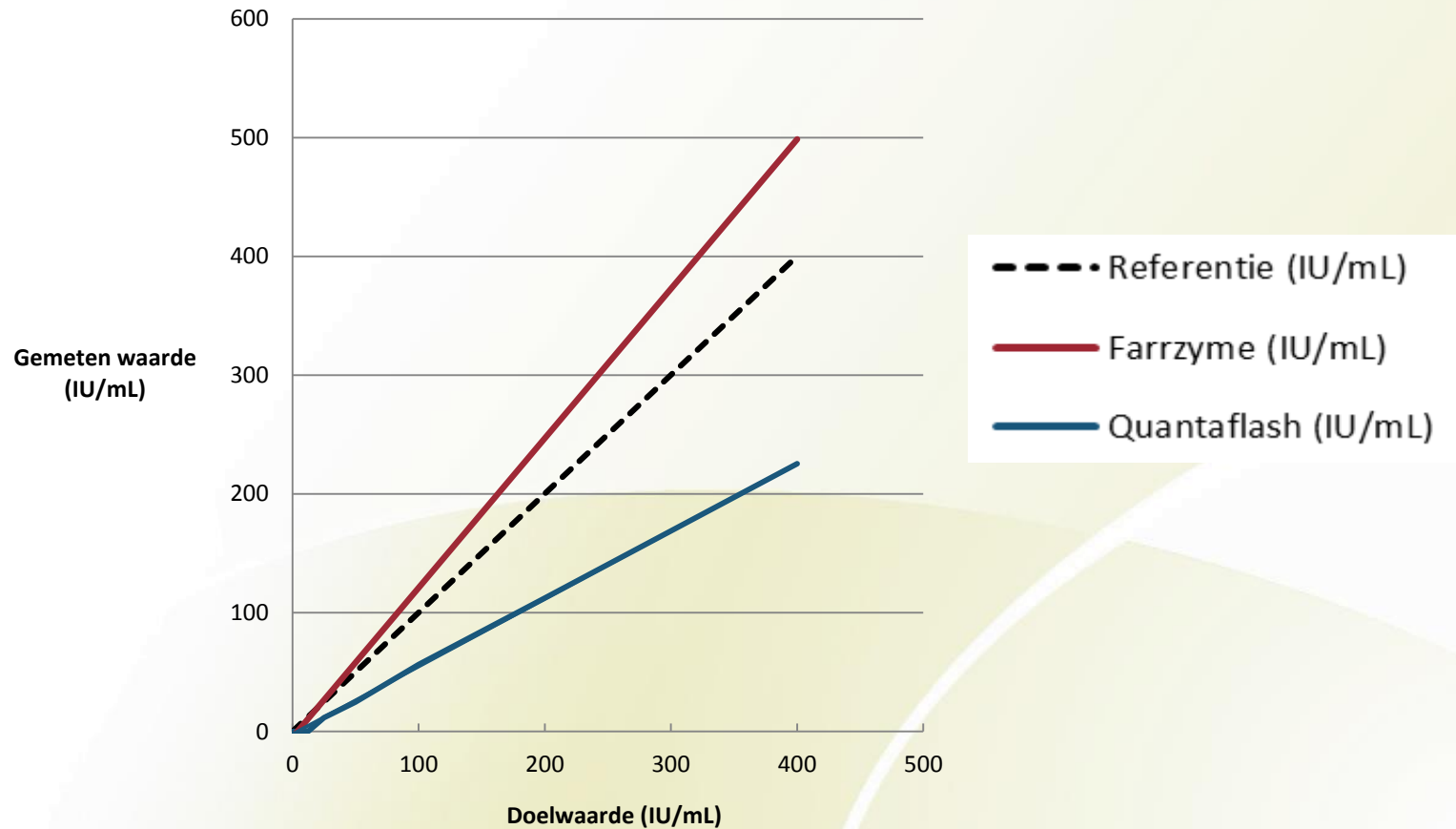
	CLIFT+DAPI (LIU)	Farrzyme (IU/mL)		ANuA(IU/mL)	QUANTAFLASH(IU/mL)	
<b>Cut-off</b>	120	30		100	35-45	
<b>Runs</b>	Pending	5		Pending	8	
<b>Level</b>	Pending	Negatief	Positief	Pending	Negatief	Positief
<b>Mean</b>	Pending	11,7	250,4	Pending	18,7	95,0
<b>Range</b>	Pending	[11,09-11,95]	[241,66-257,75]	Pending	[17,2-20,8]	[86,6-110,6]
<b>SD</b>	Pending	0,35	7,90	Pending	1,5	7,6
<b>CV (%)</b>	Pending	2,96	3,16	Pending	8,15	7,96

# Juistheid (voorlopige resultaten)

- SKML: verdunningsreeks van 400 IU/mL tem 12,5 IU/mL
- Negatieve EKE's van het WIV

Doelwaarde (IU/mL)	CLIFT+DAPI (LIU)	Farrzyme (IU/mL)	ANuA (IU/mL)	QUANTAFLASH (IU/mL)
<b>Cut-off</b>	120	30	100	35-45
<b>Runs</b>	Pending	4	Pending	1
<b>400</b>	Pending	515,18	Pending	225,5
<b>200</b>	Pending	221,30	Pending	112,2
<b>100</b>	Pending	111,74	Pending	56,2
<b>50</b>	Pending	51,23	Pending	24,6
<b>25</b>	Pending	17,52	Pending	11,5
<b>12,5</b>	Pending	11,96	Pending	<9,8
<b>Neg</b>	Pending	11,78	Pending	<9,8 (neg)
<b>Neg</b>	Pending	11,68	Pending	<9,8 (neg)

# Juistheid (voorlopige resultaten)






# Juistheid (voorlopige resultaten)

- Lineaire regressie
  - Farrzyme ( $r = 0,994$ )

$y = -4,8696 + 1,2589 x$


Parameter	Coefficient	Std. Error	95% CI	t	P
Intercept	-4,8696	7,4495	-23,0979 to 13,3586	-0,6537	0,5375
Slope	1,2589	0,04562	1,1472 to 1,3705	27,5918	<0,0001



- Quantaflash ( $r = 1$ )

$y = -2,5458 + 0,5713 x$

Parameter	Coefficient	Std. Error	95% CI	t	P
Intercept	-2,5458	0,8863	-5,3664 to 0,2747	-2,8725	0,0639
Slope	0,5713	0,004293	0,5576 to 0,5849	133,0735	<0,0001



# Juistheid (voorlopige resultaten)

- SKML: verdunningsreeks van 400 IU/mL tem 12,5 IU/mL
- Negatieve EKE's van het WIV

Doelwaarde (IU/mL)	CLIFT+DAPI (LIU)	Farrzyme (IU/mL)	ANuA (IU/mL)	QUANTAFLASH (IU/mL)
<b>Cut-off</b>	120	30	100	35-45
<b>Runs</b>	Pending	4	Pending	1
<b>400</b>	Pending	515,18	Pending	225,5
<b>200</b>	Pending	221,30	Pending	112,2
<b>100</b>	Pending	111,74	Pending	56,2
<b>50</b>	Pending	51,23	Pending	24,6
<b>25</b>	Pending	17,52	Pending	11,5
<b>12,5</b>	Pending	11,96	Pending	<9,8
<b>Neg</b>	Pending	11,78	Pending	<9,8 (neg)
<b>Neg</b>	Pending	11,68	Pending	<9,8 (neg)

# Klinische studie

- Populatie:

- Gezonde vrijwilligers (n = 30)
- SLE (n = 59)
- Andere SRD's dan SLE (n = 62)
  - Rheumatoid Arthritis (n = 20)
  - Polymyalgia Rheumatica (n = 17)
  - Scleroderma/Systemic Sclerosis (n = 7)
  - Polymyositis/Dermatomyositis (n = 4)
  - Sjögren's syndrome (n = 11)
  - Mixed Connective Tissue Disease (n = 1)
  - Cutaneous Lupus Erythematosus (n = 2)
- Disease controls met klinische exclusie van een systeemziekte (n = 50)



Stalen afgenomen voor diagnose én follow-up → effect van therapie?

# Outline

- Inleiding
- Detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen
- Anti-nucleosoom antistoffen
- Vergelijkende studie in GZA
- Conclusie

# Conclusie

- Anti-dsDNA antistoffen kwantificeren
- Geen consensus in de literatuur
- Anti-nucleosoom antistoffen beloftevol alternatief

# TODO

- Technische performantie van CLIFT + DAPI en ANuA's
- Klinische stalen analyseren met 4 technieken
- Statistische verwerking
  - Correlatie kwantitatieve resultaten ahv Spearman analyse
  - Se, Sp en LR bij cut-off van de fabrikant
  - Sensitiviteit bij 95% specificiteit
  - ROC curve en AUC
- Evaluatie autotiter CLIFT + DAPI
- Beste methode kiezen en implementeren

# Vragen?

