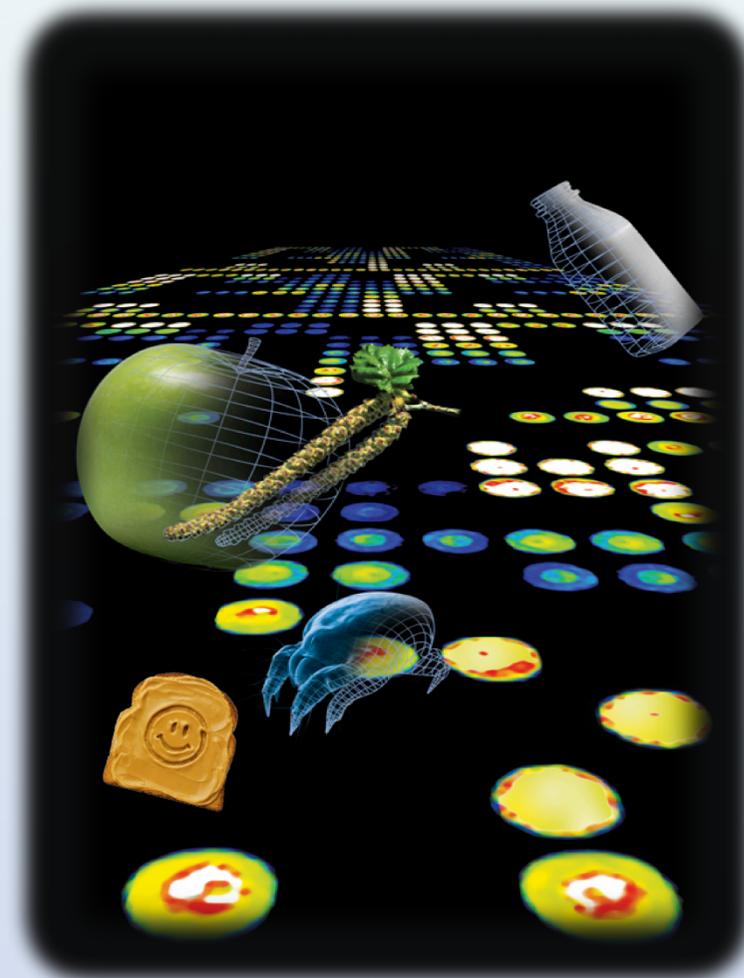


**Les techniques
MULTIPLEXES
en allergie**

Romy GADISSEUR
CIAB 2014

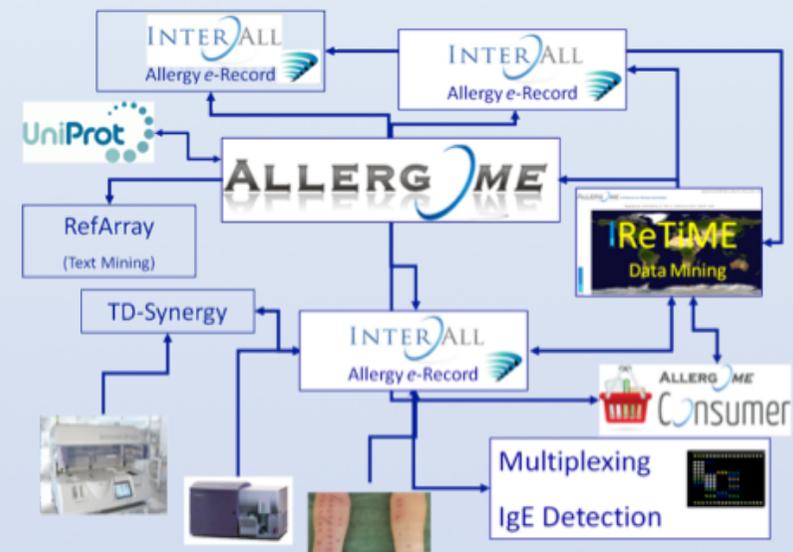


- Incidence allergies IgE-médiées \uparrow durant les dernières décennies en occident.
 - **Maladies les plus répandues dans le monde occidental.**
- **Diagnostic basé sur l'utilisation d'extraits allergéniques pour les tests cutanés (TC) et des dosages d'IgEs.**
 - Etudes démontrant la mauvaise qualité de certains extraits (teneur en composant inconnue, variable et parfois contaminants indésirables).
 - **Extraits naturels dopés par des recombinants (+ sensible).**
 - Seules certaines protéines se lient aux IgE = à l'origine des manifestations d'hypersensibilité de type 1.
 - **Toutes les protéines ne sont pas des allergènes !**
 - **Aucune information sur l'allergène responsable de la sensibilisation.**
 - **Impossible de distinguer les réactions croisées liées à des panallergènes d'une véritable sensibilisation pertinente.**
 - **Pourrait nuire à une évaluation précise.**

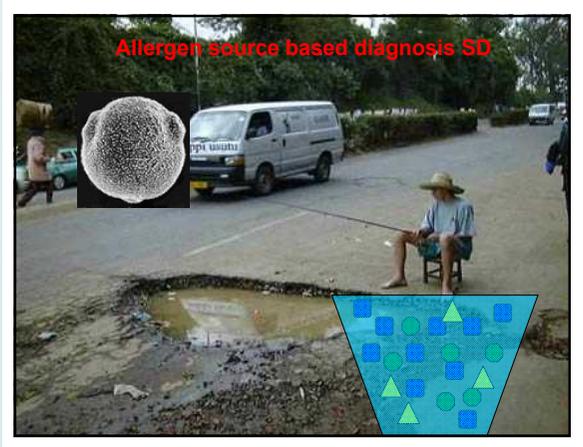
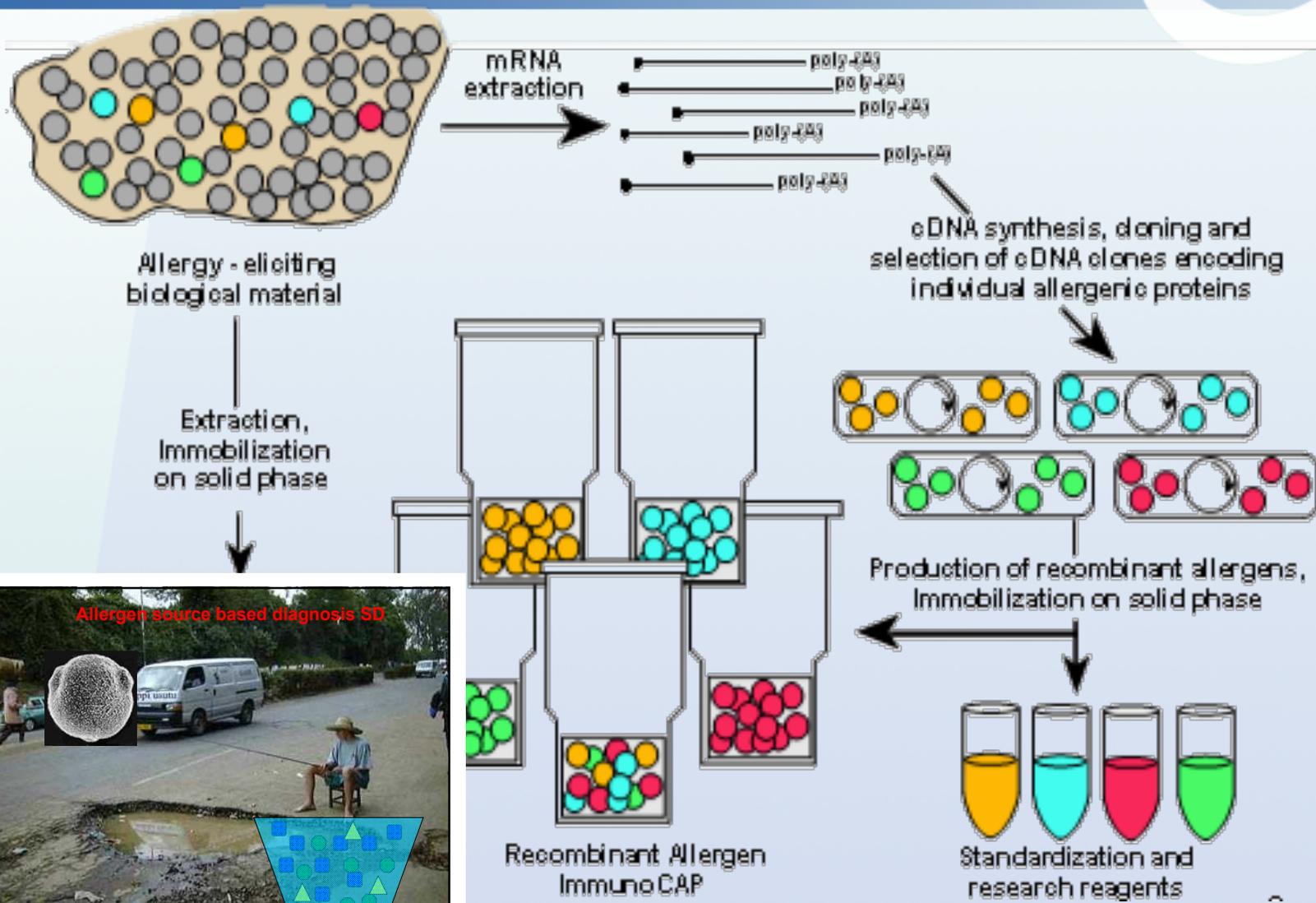
- Progrès en biologie moléculaire :
 - **Synthèse des protéines recombinantes** analogues aux protéines qui induisent une réaction allergique et qui leur ressemblent au niveau immunologique.
 - Production avec **une qualité constante et en quantité suffisante**.

- La détermination des IgE spécifiques dirigées contre ces protéines permet de déterminer un **profil réactionnel individualisé** pour chaque patient.
 - ✓ **Identification exacte des molécules qui induisent la maladie.**

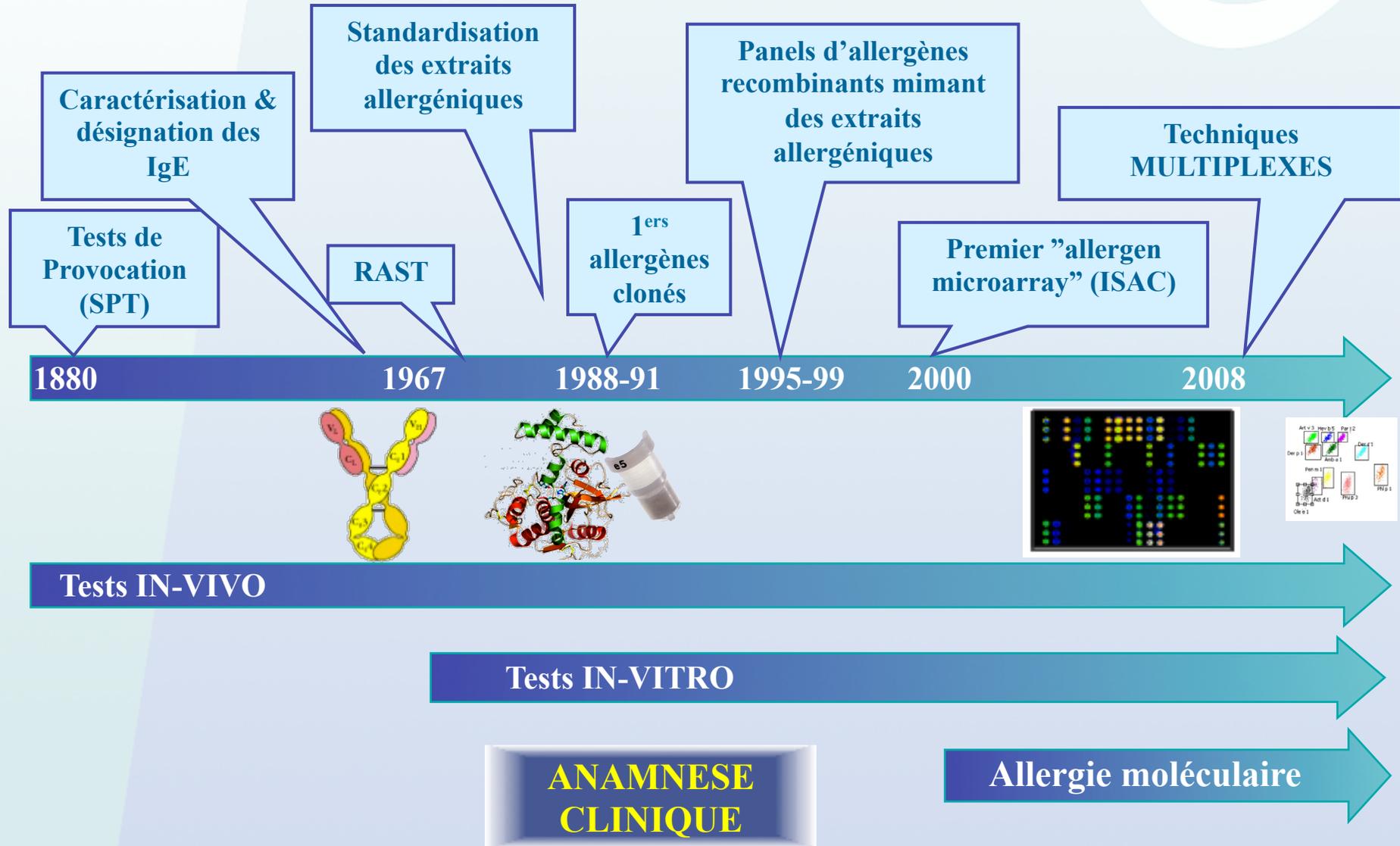
- Actuellement,
 - ✓ 5000 allergènes décrits.
 - ✓ >130 molécules allergéniques commercialisées pour le dosage in-vitro des IgEs.



Allergie moléculaire ...le chemin parcouru...



Allergie moléculaire ...le chemin parcouru...



Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA

Nikolaos G Papadopoulos^{1*}, Ioana Agache², Sevim Bavbek³, Beatrice M Bilo⁴, Fulvio Braido⁵, Victoria Cardona⁶

- L'allergie : menace majeure pour les budgets de la santé publique.
- Priorité dans les efforts de recherche :
 - Diagnostic rapide
 - Etudes approfondies sur les composants
 - diagnostic in-vitro
 - innovations biotechnologiques
 - immunothérapie
 - Prévention efficace
 - Traitement curatif et adapté
 - Dévoiler les voies et mécanismes physiopathologiques de base conduisant à la compréhension et à la résolution des allergies
 - conception de nouveaux protocoles de diagnostic et de traitement



CONSENSUS DOCUMENT

Open Access

A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

Giorgio Walter Canonica^{1*}, Ignacio J Ansotegui², Ruby Pawankar³, Peter Schmid-Grendelmeier⁴, Marianne van Hage⁵, Carlos E Baena-Cagnani⁶, Giovanni Melioli⁷, Carlos Nunes⁸, Giovanni Passalacqua⁹, Lanny Rosenwasser¹⁰, Hugh Sampson¹¹, Joaquin Sastre¹², Jean Bousquet¹³, Torsten Zuberbier¹⁴ and WAO-ARIA-GA²LEN Task Force: Katrina Allen, Riccardo Asero, Barbara Bohle, Linda Cox, Frederic de Blay, Motohiro Ebisawa, Rene Maximiliano-Gomez, Sandra Gonzalez-Diaz, Tari Haahtela, Stephen Holgate, Thilo Jakob, Mark Larche, Paolo Maria Matricardi, John Oppenheimer, Lars K Poulsen, Harald E Renz, Nelson Rosario, Marc Rothenberg, Mario Sanchez-Borges, Enrico Scala, Rudolf Valenta

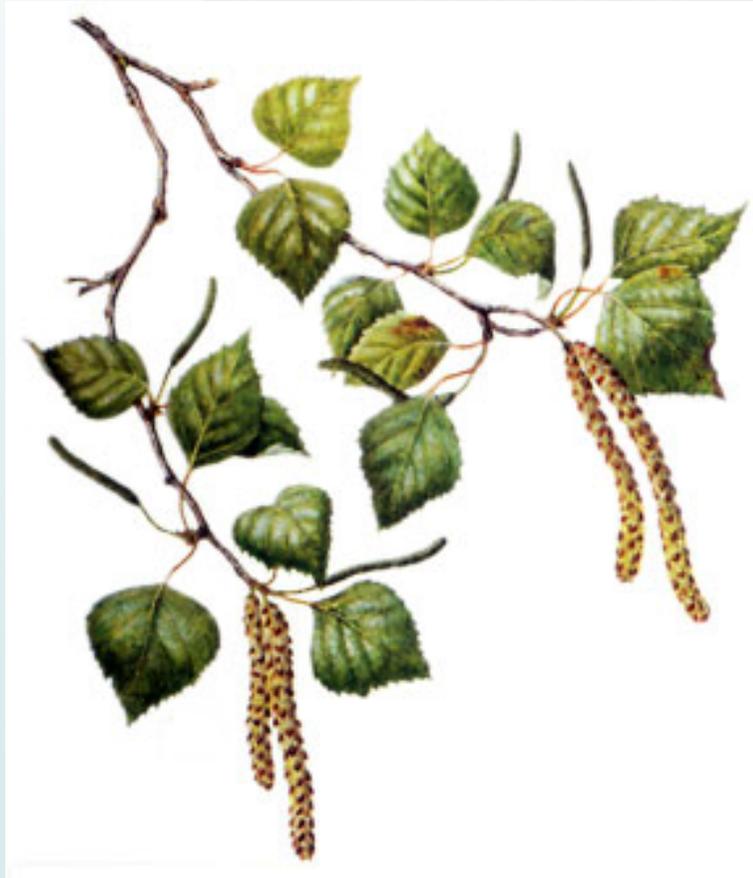
- Guide de MA (indication, interprétation, diagnostic) pour les allergologues. **Evolution rapide** : les cliniciens sont tenus de suivre le rythme.

- Allergie moléculaire
 - Diagnostic de l'allergie + précis.
 - Pronostic.
 - 3 intérêts majeurs :
 1. Meilleure compréhension des **réactions croisées** chez les patients polysensibilisés.
 2. **Evalue le risque** : réactions systémiques versus locales dans l'allergie alimentaire, anxiété ↓ du patient et ↓ **la nécessité TPO alimentaire**.
 3. Identifie des **candidats pour l'immunothérapie spécifique**.

Concept Singleplex versus Multiplex

Dosage des IgE spécifiques

Standard ImmunoCAP®, UniCAP



ImmunoCAP ISAC®

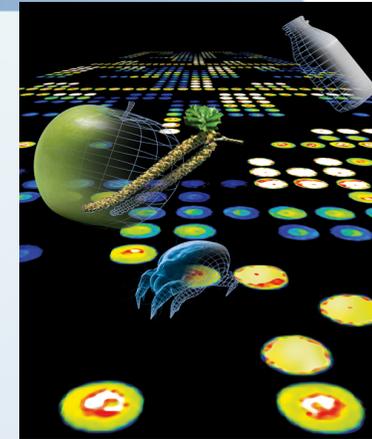


Concept Singleplex versus Multiplex



ImmunoCAP, UniCAP
SINGLEPLEX

- Singleplex
(ImmunoCAP, Immulite, HyTech)
Sélection des composants nécessaires
définie par l'histoire clinique du patient.



ImmunoCAP, ISAC
MULTIPLEX

- Multiplex
(ImmunoCAP ISAC, le + complet,
disponible)
Large panel d'allergènes présélectionnés
indépendamment de l'histoire de clinique.

Concept

Singleplex versus Multiplex

ImmunoCAP, UniCAP

- Echelle macroscopique
(μg allergène/CAP)
- **CV < 15%**
- **Résultat fourni par méthode quantitative**
- Méthode automatisée
- 40 μL de sérum / test
+ 150 μL volume mort !
- Haute capacité totale de fixation
- Peu de fixation non-spécifique
- **Haute sensibilité => de très faibles quantités d'IgE peuvent être identifiées.**

ImmunoCAP ISAC

- Echelle microscopique
(100 μg allergène/spot, >100 allergène/cm²)
- **CV < 25% au-delà de 1 ISU**
- **Résultat Semi-quantitatif**
- Méthode manuelle
- **30 μL de sérum = >112 résultats**
- Haute capacité totale de fixation
- Pas ou peu de fixation non-spécifique
- Bonne sensibilité
- Haute spécificité
- **Fournit le profil de sensibilisation du patient**



Mais

...



Limitation de notre sécurité sociale lors de la prescription :

En Belgique : maximum 6 allergènes remboursés / prise de sang / 24h.
Chaque allergène supplémentaire est facturé à 8€04 au patient.
Mixture, extrait, composant => Même prix, même limitation !

En Belgique : prix d'un ImmunoCAP ISAC = 175€, à charge du patient.

Une même source allergénique = parfois 5 composants à tester...
=> multiplication des tests pour faire l'allergie moléculaire.

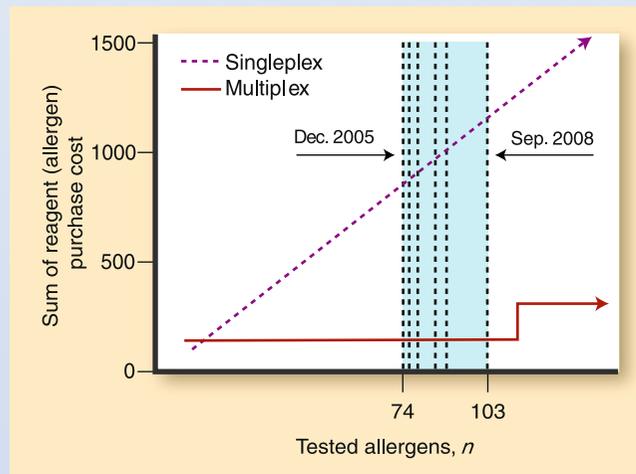


Fig. 1 Comparative schematic cost of singleplex and multiplex reagents to be used to yield the same number of diagnostic data

Curr Allergy Asthma Rep (2010) 10:357–364
 DOI 10.1007/s11882-010-0132-0

Microarrayed Allergen Molecules for the Diagnosis of Allergic Diseases

Adriano Mari · Claudia Alessandri ·
 Maria Livia Bernardi · Rosetta Ferrara · Enrico Scala ·
 Danila Zennaro

A bioinformatics approach to identify patients with symptomatic peanut allergy using peptide microarray immunoassay

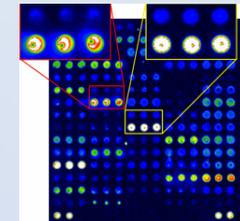
Jing Lin, PhD,^{a*} Francesca M. Bruni, MD,^{b*} Zhiyan Fu, PhD,^a Jennifer Maloney, MD,^a Ludmilla Bardina, MSc,^a Attilio L. Boner, MD,^b Gustavo Gimenez, BSc,^a and Hugh A. Sampson, MD^a *New York, NY, and Verona, Italy*

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 129, NUMBER 5

- Microarray
- Données cliniques (tolérance, allergie)
- Combinaison avec l'informatique

→ Remplacement de la provocation ?

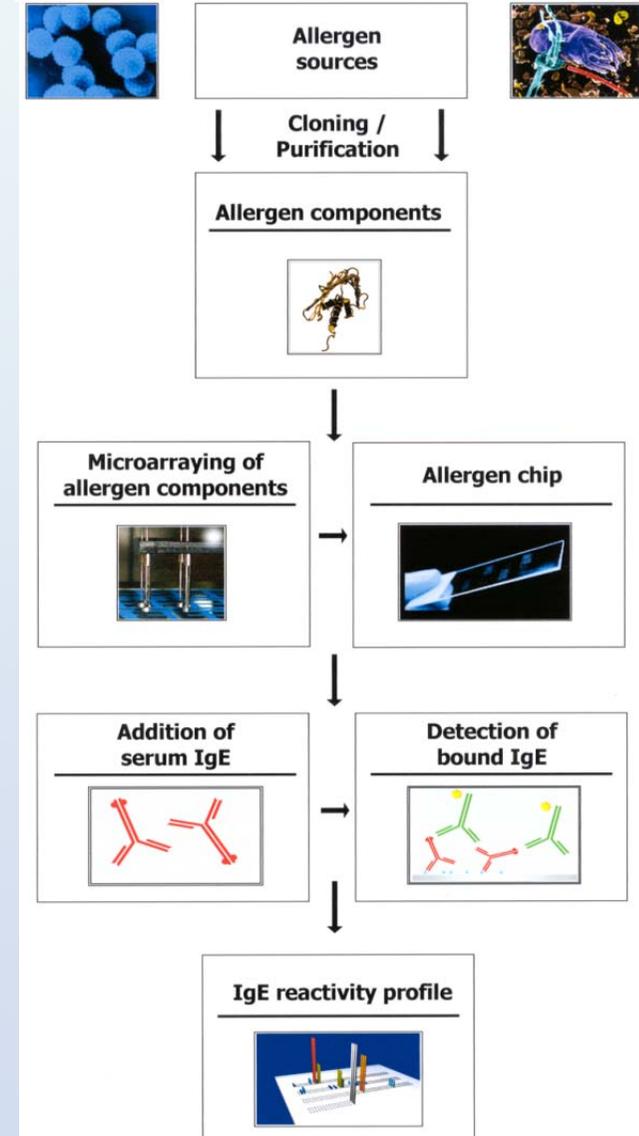
- Multiplex, **Immuno-essais en phase solide** => dosage des IgE sériques.
- Anticorps secondaire marqué à la **fluorescence**
- **Panel de protéines/molécules recombinantes ou naturelles purifiées**, immobilisées sur une lame de verre chimiquement modifiée.
- **Triplicate** => sensibilité du test.
- IgE humains purifiés, dilués en série, dans des puits => **étalonnage & contrôle qualité**.
- **Miniaturisé**, la lame de verre (75x25mm).
- 4 zones identiques/lame pour tester 4 patients dans puits de réaction individuels entourés par une mince couche de Téflon (évite le débordement de l'échantillon durant l'essai).
- Résultats **semi-quantitatifs en ISU** (ISAC Standardized Units).
 - Enregistrement de l'intensité de fluorescence (IF) pour chaque spot.
 - QC bioinformatiques par le dosage d'un sérum étalon contenant des quantités d'IgE prédéfinis pour un certain nombre d'allergènes choisis.
 - **Valeurs de l'IF dans les échantillons de patients extrapolés par régression linéaire.**
 - Finalement, pour chaque composant individuel, les concentrations d'IgEs sont déterminés.



- VBC Genomics (Vienne, Autriche) : développement des lames :
 - Optimisation d'un revêtement coaté par des amines réactives permettant la fixation covalente de protéines et la performance du test.
 - Solutions de composants à des concentrations de spotting de 0,3 mg/ml (tampon phosphate de sodium, pH 8,5).
 - Distribution robotisée des solutions d'allergènes.
 - Guide (Ac anti-IgE), concentration 1 pg/ml .
- Difficultés du dosage:
 - IgEs sériques, faible concentration => défi majeur.
 - Optimisation de la production d'un Ac monoclonal anti-IgE humain fluorescent.

Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment

Reinhard Hiller,^{1,*} Sylvia Laffer,^{2,*} Christian Harwanegg,¹ Martin Huber,¹ Wolfgang M. Schmidt,¹ Anna Twardosz,³ Bianca Barletta,⁴ Wolf M. Becker,⁵ Kurt Blaser,⁶ Heimo Breiteneder,² Martin Chapman,⁷ Reto Crameri,⁶ Michael Duchêne,² Fatima Ferreira,⁸ Helmut Fiebig,⁹ Karin Hoffmann-Sommergruber,² Te Piao King,¹⁰ Tamara Kleber-Janke,⁵ Viswanath P. Kurup,¹¹ Samuel B. Lehrer,¹² Jonas Lidholm,¹³ Ulrich Müller,¹⁴ Carlo Pini,⁴ Gerald Reese,¹² Otto Scheiner,² Annika Scheynius,¹⁵ Hornig-Der Shen,¹⁶ Susanne Spitzauer,¹⁷ Roland Suck,⁹ Ines Swoboda,¹⁷ Wayne Thomas,¹⁸ Raffaella Tinghino,⁴ Marianne Van Hage-Hamsten,¹⁹ Tuomas Virtanen,²⁰ Dietrich Kraft,² Manfred W. Müller,¹ and Rudolf Valenta²



Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment

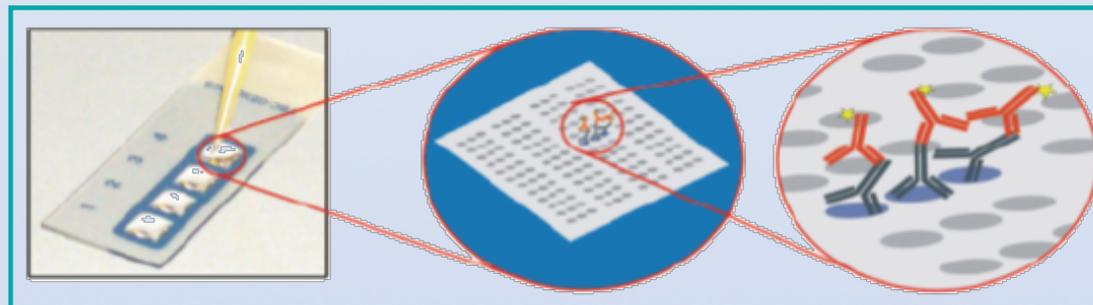
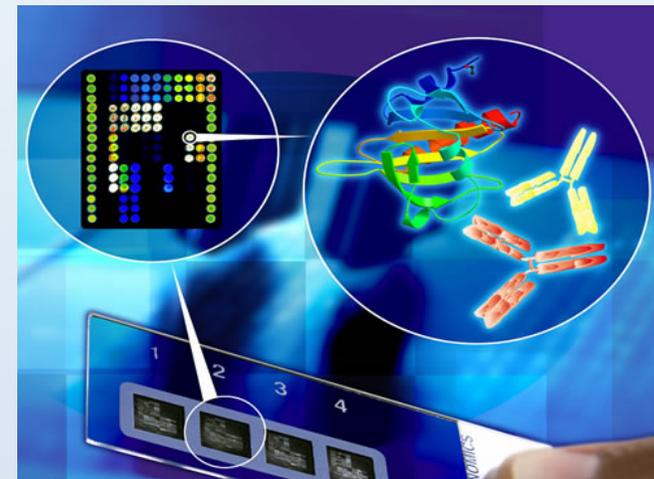
Reinhard Hiller,^{1,*} Sylvia Laffer,^{2,*} Christian Harwanegg,¹ Martin Huber,¹ Wolfgang M. Schmidt,¹ Anna Twardosz,³ Bianca Barletta,⁴ Wolf M. Becker,⁵ Kurt Blaser,⁶ Heimo Breiteneder,² Martin Chapman,⁷ Reto Cramer,⁶ Michael Duchêne,² Fatima Ferreira,⁸ Helmut Fjebig,⁹ Karin Hoffmann-Sommergruber,² Te Piao King,¹⁰ Tamara Kleber-Janke,³ Viswanath P. Kurup,¹¹ Samuel B. Lehrer,¹² Jonas Lidholm,¹³ Ulrich Müller,¹⁴ Carlo Pini,⁴ Gerald Reese,¹² Otto Scheiner,² Annika Scheynius,¹⁵ Horng-Der Shen,¹⁶ Susanne Spitzauer,¹⁷ Roland Suck,⁹ Ines Swoboda,¹⁷ Wayne Thomas,¹⁸ Raffaella Tinghino,⁴ Marianne Van Hage-Hamsten,¹⁹ Tuomas Virtanen,²⁰ Dietrich Kraft,² Manfred W. Müller,¹ and Rudolf Valenta²

- Composants allergéniques :
 - Identification des allergènes responsables.
- Accès à un profil de sensibilisation en une **simple et rapide détermination**.
- De **petites quantités de sérum** sont nécessaires => intérêt chez l'enfant.
- Molécules ou épitopes supplémentaires à ajouter au panel pour couvrir le **spectre complet** de toutes les sources d'allergènes importantes.
 - Pas un problème majeur à concevoir :
 - Disponibilité des allergènes recombinants augmente rapidement.
 - **Lames peuvent accueillir plusieurs milliers de composants individuels** ainsi que des épitopes.



Fig. 2. ISAC system. A, chip with 4 reaction chambers. B, purified allergens spotted on the microarray. C, IgE-allergen interaction is revealed by a fluorescent dye conjugated with an anti-IgE antibody; the allergenic proteins immobilized on the chip are in blue, the human IgE are in red and the anti-IgE are in yellow. D, the fluorescence intensity is measured using a "microarray scanner".

- **Technique innovante, outil supplémentaire pour le diagnostic in-vitro, basé exclusivement sur les composants allergéniques.**
 - Plateforme miniaturisée d'immunoessais
 - Mesure des IgEs dirigés contre +/-50 sources allergéniques communes, en un seul dosage.
 - 112 allergènes natifs et recombinants.
 - Allergènes choisis en fonction de leur pertinence dans l'établissement d'un profil de sensibilisation.
 - Tests sur 30 µL de sérum ou sang total.
 - Permet de déterminer des profils de sensibilisation rapidement et à moindre coût.



A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

- Bonne **reproductibilité** selon plusieurs études.
 - SAUF si faibles taux d' IgE (**0,3-1 ISU**) : **plus grande variabilité**.
- Comparaison ISAC avec méthodes singleplex.
 - **Concordance variable** selon les allergènes testés avec ImmunoCAP ISAC (version 103).
 - Pas de donnée comparative avec **ImmuLite ou HyTech**.
 - ISAC (version **112**) : résolution de certaines divergences.
 - ISAC 0,3-100 ISU (semi-quantitatif) versus CAP en kU/L (quantitatif), **pas interchangeables**.
 - **CAP : liaison des IgE dans des conditions d'excès d'allergène** versus **ISAC utilise de faibles quantités d'allergènes** (concurrence avec isotypes spécifiques comme IgG).
- **Variabilité inter-essai élevée** pour ISAC :
 - Pas recommandé pour le suivi des taux d'IgEs au cours du temps.
- **Pas d'interférence** des IgE_{tot} élevées mais possibles avec IgG.
- Etudes en faveur de l'ISAC :
 - Améliore le diagnostic de l'allergie.
 - Permet la gestion optimisée des SIT.
 - Évalue la marche allergique et la sensibilisation dans les stades précliniques.

- Allergies des enfants peuvent ou non persister à l'âge adulte.
- Le panel de sensibilisation et l'évolution de l'allergie n'a pas encore été étudié.
 - 67 enfants (6 mois-18 ans).
 - Comparaison à l'histoire, les TC, et symptômes (dermatite atopique, asthme, rhinoconjonctivite).
 - ImmunoCAP ISAC 103.
 - A 3,6,9,18 mois, à 6 ans et à 18 ans.
- Profils IgE uniques pour chaque enfant, en accord avec les TC et les diagnostics médicaux.

- L'examen attentif des profils IgE **facilite souvent l'interprétation des réactivités croisées, améliore la prise en charge.**
- Apporte des **informations jusque-là inconnues, pertinentes** :
 - **Réactivités croisées, co-sensibilisation.**
 - Chez 8/10 enfants avec allergies alimentaires multiples et sensibilisation aux aéroallergènes,
 - Chez 9/20 enfants multisensibilisés aux aéroallergènes.

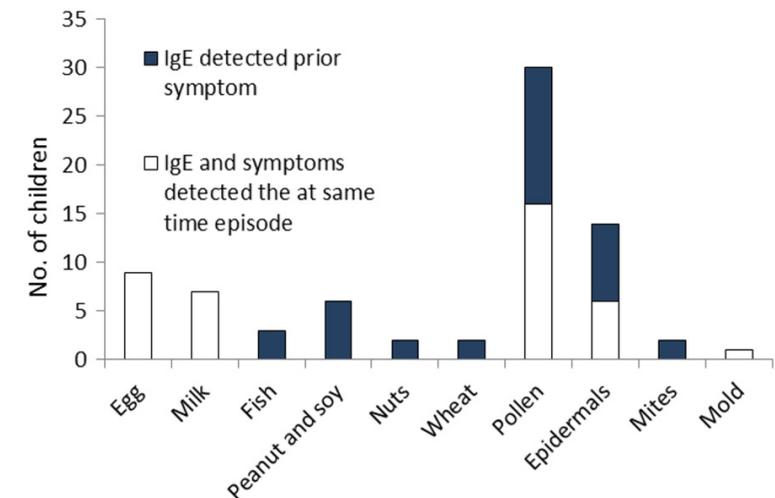


Figure 1 Number of children sensitized to different allergens. White bars represent children with IgE abs observed at the same time as symptoms were reported. Black bars represent children with IgE abs observed at least one time episode (see Methods) prior to any symptoms to the given allergen was reported.

Une évaluation médicale complète par allergologue peut distinguer allergie et sensibilisation.

- Nombre de sensibilisations pour les composants croissants dans le temps, souvent parallèle aux taux d'IgE chez 19/22 enfants.
- Les IgEs généralement détectées avant les réactions cliniques.
- Point fort : longue période de suivi.
- Point faible : intervalles entre prélèvements trop longues.
- ISAC : outil prometteur pour le diagnostic de l'allergie chez les enfants multi-sensibilisés avec l'asthme sévère et eczéma.
- Chaque enfant allergique développe sa propre « empreinte digitale de sensibilisation » au fil du temps.
- Avec ISAC, la gestion des patients aurait été différente pour certains des enfants de cette cohorte.

A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

Table 2 Studies comparing different techniques for specific IgE determinations

Techniques compared	Allergens	Main findings	References
ImmunoCAP & ISAC 50	HDM, cat dander, birch, grass, and mugwort pollen	ROC curves demonstrated that CAP and ISAC performed equally well in cat, birch, and grass pollen. ISAC was slightly less sensitive in HDM and displayed a reduced sensitivity in mugwort pollen.	Wöhrl et al. [99]
ImmunoCAP & ISAC prototype	Betula and grass allergens	Comparable sensitivity between CAP and ISAC.	Jahn-Schmid et al. [100]
ImmunoCAP & ISAC 103	grass and cypress pollen	Showed similar diagnostic performance.	Cabrera-Freitag et al. [101]
ImmunoCAP & ISAC 103	Multiples allergens	Concordance was 78.65% for positive results. Concordance was 93.57% for negative results.	Gadisseur et al. JACI [98]
rAni.g.1, rBet.v.2, nRos.d.4, nGal.d.1		Excellent intra-slide, intra-assay	Cabrera-Freitag et al. [101]
			Ebo et al. [76]
			Lizaso et al. [31]
			Melioli et al. [97]
			Twaroch et al. [103]

A new tool in the field of in-vitro diagnosis of allergy: preliminary results in the comparison of ImmunoCAP[®] 250 with the ImmunoCAP[®] ISAC

Gadisseur R, Chapelle JP, Cavalier E.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Volume 49, Issue 2, Pages 277–280

- Comparaison ISAC et CAP chez 86 patients
- Concordance entre les résultats positifs (78.65%) et meilleure concordance si on considère le seuil positivité CAP 0,35KUI/L (92,19%).
- Sensibilité moindre en ISAC qu'en CAP pour certains allergènes.
- Excellente spécificité avec des sera ayant des IgE_{tot} jusque 10 000KU/L.
- Des améliorations de la sensibilité doivent encore être réalisées.

A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

Table 2 Studies comparing different techniques for specific IgE determinations

Techniques compared	Allergens	Main findings	References
ImmunoCAP & ISAC 50	HDM, cat dander, birch, grass, and mugwort pollen	ROC curves demonstrated that CAP and ISAC performed equally well in cat, birch, and grass pollen. ISAC was slightly less sensitive in HDM and displayed a reduced sensitivity in mugwort pollen.	Wöhrl et al. [99]
ImmunoCAP & ISAC prototype	Betula and grass allergens	Comparable sensitivity between CAP and ISAC.	Jahn-Schmid et al. [100]
ImmunoCAP & ISAC 103	grass and cypress pollen	Showed similar diagnostic performance.	Cabrera-Freitag et al. [101]
ImmunoCAP & ISAC 103	Multiples allergens	Concordance was 78.65% for positive results. Concordance was 93.57% for negative results.	Gadisseur et al. JACI [98]
Reproducibility of ISAC 103	rApi g 1, rBet v 2, nBos d 4, nGal d 1, nGal d 2, nGal d 3, rHev b 8, rPhl p 5, rPhl p 6, and rPhl p 7	Excellent intra-slide, intra-assay, and inter-assay variability. rApi g 1, nGal d 3, and rPhl p 6 showed high variability in the individual analyses.	Cabrera-Freitag et al. [101]
ImmunoCAP & ISAC 103	Latex allergens	Similar performance	Ebo et al. [76]
			Lizaso et al. [31]
			Melioli et al. [97]
			Twaroch et al. [103]

The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms

Clin Biochem. 2011 Aug;44(12):1005-11

Giovanni Melioli ^{a,*}, Floriano Bonifazi ^b, Sergio Bonini ^c, Enrico Maggi ^d, Michele Mussap ^e, Gianni Passalacqua ^f, Enzo Renato Rossi ^g, Angelo Vacca ^h, Giorgio Walter Canonica ^f and on behalf of the Italian Board for ISAC (IBI) ¹

- Précision intra et inter-série bonne > 1 ISU
- ISAC : CV(%) 3 fois + élevé que les ImmunoCAP entre 1 et 15 ISU,
- ISAC : CV(%) identique au-dessus de 15 ISU.
- En tenant compte de la LOD ISAC (0,3 ISU) et LOD CAP (0,1KUI/L) moins bonne corrélation que lorsque l'on choisi un seuil de positivité ISAC à 1 ISU.
- Limitation ISAC : pas tous les allergènes et pas tous les recombinants sont représentés => attention aux faux négatifs de l'ISAC
- Intérêt de l'ImmunoCAP ISAC chez les patients polysensibilisés.

efficiency
ect
cantly

ulin E.

A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

- Comment choisir quelle technique ?
 - Considérer le nombre d'allergènes à tester, évaluer le prix (selon prix local et système de remboursement),
 - Si > 10 à 12 allergènes, multiplexe peut-être préférable.

Table 3 Advantages and disadvantages of ISAC, immunoCAP, and skin prick tests

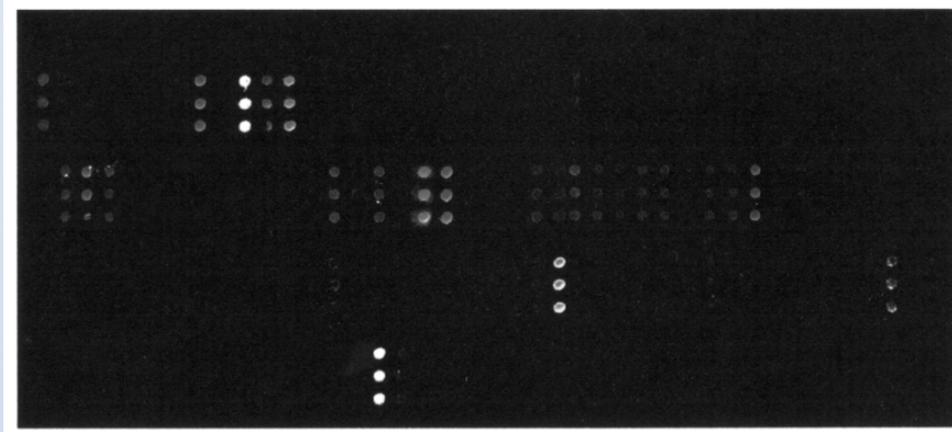
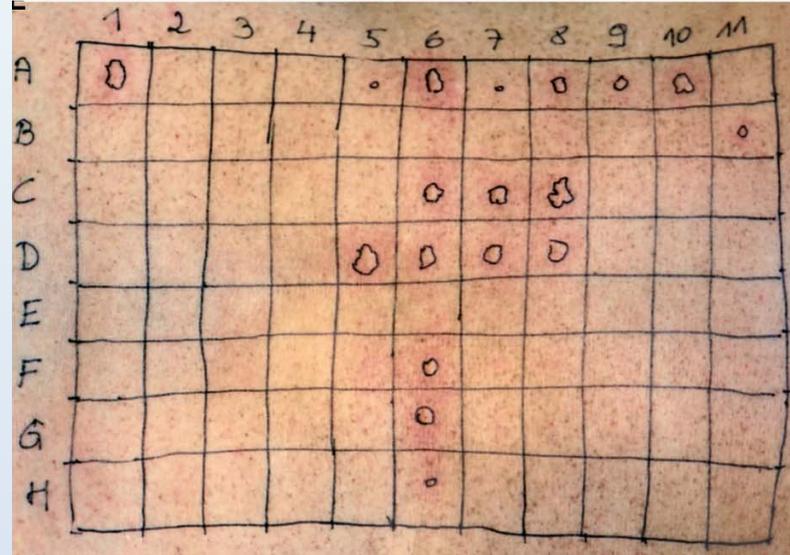
	Advantages	Disadvantages
ISAC	<ul style="list-style-type: none"> • <u>30 µl of serum or plasma</u> (capillary or venous blood) • <u>112 allergens</u> can be assayed in parallel • Natural and recombinants proteins • Less allergen needed (approximately 100,000-fold, pg vs. µg) per assay • No interference from very high total IgE 	<ul style="list-style-type: none"> • Manual method • Semi-quantitative assay • <u>Less sensitive</u> • More variability in the inter-assay analysis for certain allergens • Greater coefficient of variation • Some allergen sources are not included • Less appropriate for monitoring sensitization • <u>Potential interference</u> between IgE and other isotypes, principally IgG
ImmunoCAP	<ul style="list-style-type: none"> • Automatic method • <u>Quantitative assay</u> • <u>High sensitivity</u> • Lower coefficient of variation • Natural or recombinants proteins or crude extracts • <u>Appropriate for monitoring sensitization</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>40 µl of serum</u> per allergen • One allergen per assay • Detect low-affinity antibody that may have little to no clinical relevance
Skin prick test	<ul style="list-style-type: none"> • High sensitivity (extract-dependent) • Immediate reading 	<ul style="list-style-type: none"> • Manual • One allergen per prick • Only crude extracts • Not appropriate for monitoring sensitization

Multiplex versus Singleplex

Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment

Reinhard Hiller,^{1*} Sylvia Laffer,^{2*} Christian Harwanegg,¹ Martin Huber,¹ Wolfgang M. Schmidt,¹ Anna Twardosz,³ Bianca Barletta,⁴ Wolf M. Becker,⁵ Kurt Blaser,⁶ Heimo Breiteneder,⁷ Martin Chapman,⁷ Reto Cramer,⁸ Michael Duchêne,² Fatima Ferreira,⁸ Helmut Fiebig,⁹ Karin Hoffmann-Sommergruber,² Te Piao King,¹⁰ Tamara Kleber-Janke,⁵ Viswanath P. Kurup,¹¹ Samuel B. Lehrer,¹² Jonas Lidholm,¹³ Ulrich Müller,¹⁴ Carlo Pini,⁴ Gerald Reese,¹² Otto Scheiner,² Annika Scheynius,¹⁵ Horng-Der Shen,¹⁶ Susanne Spitzauer,¹⁷ Roland Suck,⁹ Ines Swoboda,¹⁷ Wayne Thomas,¹⁸ Raffaella Tinghino,⁴ Marianne Van Hage-Hamsten,¹⁹ Tuomas Virtanen,²⁰ Dietrich Kraft,² Manfred W. Müller,¹ and Rudolf Valenta²

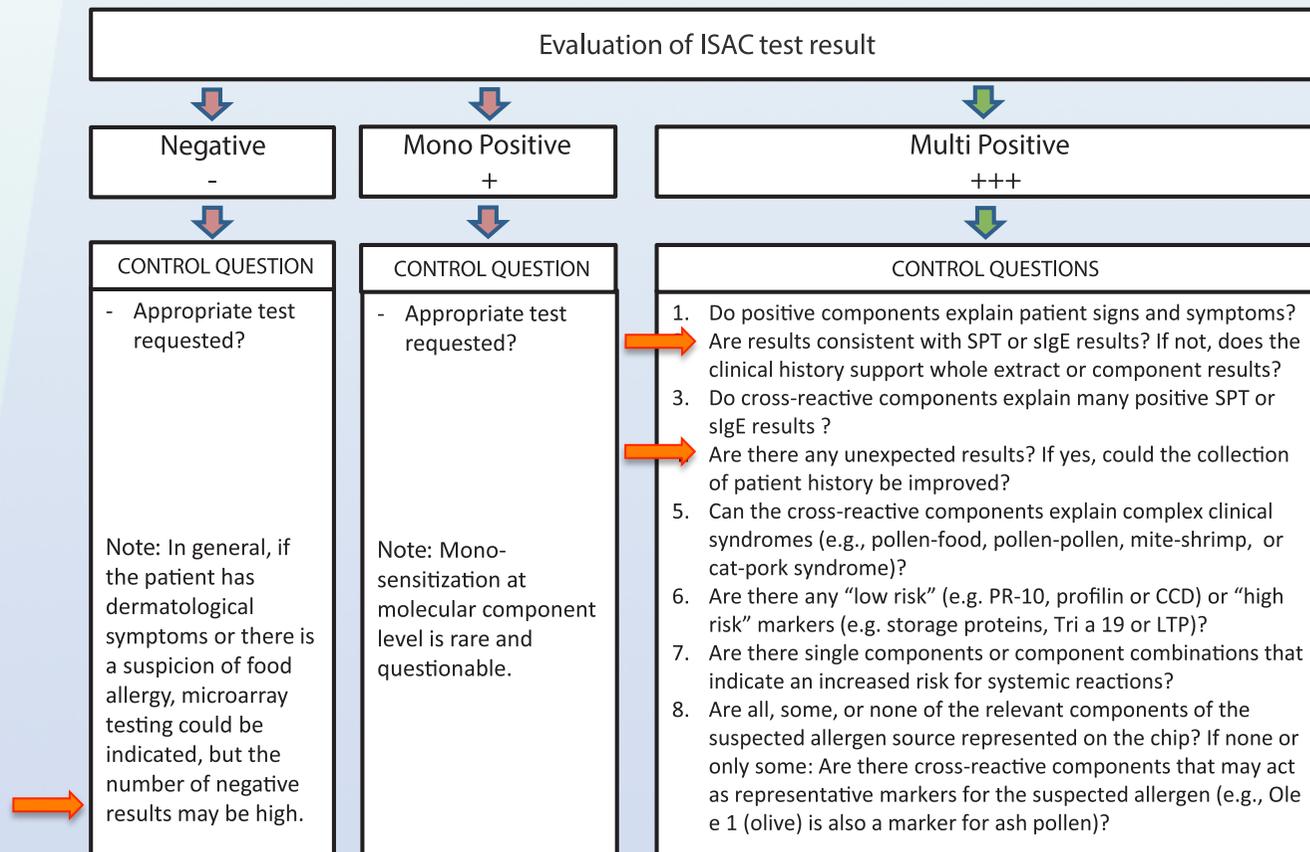
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Bet v 1	Bet v 2	Bet v 4	Jun o 2	Cas s 1	Phi p 2	Phi p 4	Phi p 5a	Phi p 1	Phi p 6	Phi p 7
B	Phi p 11	Phi p 12	Par j 2.0101	Art v 1	Art v 3	Apl g 1	Apl g 1.0201	Dau c 1	Ara h 2	Ara h 5	Mal d 1
C	Mal d 2	Pen a 1	Cyp c 1	Hom s 2	Der p 1	Der p 2.0101	Der p 2	Der p 2	Der p 5	Der p 5	Der p 7
D	Der p 8	Der p 10	Tyr p 2	Lep d 2.01	Lep d 13	Eur m 2.0101	Fel d 1	Fel d 1	Bos d 2	Pen c 3	Pen c 19a
E	Pen c 19b	Pen n 13	Asp f 1	Asp f 3	Asp f 4	Asp f 6	Asp f 1	Asp f 3	Asp f 4	Asp f 6	Asp f 7
F	Asp f 8	Alt a 1	Alt a 5	Mal f 7	Mal f 1	Mal f 5	Mal f 6	Mal f 8	Mal f 9	Hev b 1	Hev b 1
G	Hev b 3	Hev b 8	Hev b 9	Hev b 10	Hev b 11	Plo i 1	Bla g 2	Bla g 4	Bla g 5	Ves v 5	Api m 1
H	Api m 2	Ves v 5	Ves g 5	Pol a 5							



SinglePlex
versus
Multiplex

A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

- **L'interprétation peut être difficile**, même pour l'utilisateur expérimenté.
- **Pertinence clinique** des différents allergènes.
- Corréler à des tests de diagnostic traditionnels et à **l'histoire clinique** du patient.
- Les résultats de l'ISAC pour certaines sources d'allergènes (noix de cajou, sésame, armoise...) peut être **négatifs**, même si l'extrait est positif si **l'allergène déclencheur n'est pas présent sur la puce**.



A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics

- Economiquement, + intéressant d'utiliser des TC et faire MA que de ne faire aucun test et de se baser juste sur l'anamnèse clinique.
- MA permet de restreindre les évictions alimentaires.
- Peu de sérum (pédiatrique).
- Fournit des sensibilités imprévues.
- Des programmes d'éducation sur l'utilisation et l'interprétation de MA sont nécessaires.
- L'utilité clinique de la plupart des molécules allergènes doit être approfondie.

1. Les allergènes peuvent être obtenus à partir de toutes les sources allergéniques
2. Spotting en triple augmente la robustesse de la biopuce
- 3. Aucune limite sur le nombre de molécules qui peuvent être placées sur la biopuce**
- 4. Panel exhaustif et représentatif**
5. Allergènes purifiés et recombinants naturels
6. Allergènes combinés de la même source allergénique miment la réalité
7. La sensibilité et la spécificité définies grâce aux singleplex
- 8. Cartographie et la surveillance de la sensibilisation aux allergènes en utilisant le même outil standard dans le monde entier**
- 9. Dépistage d'allergie en évitant tout risque de sensibilisation**
10. Faible quantité de sérum nécessaire
11. Même panel indépendamment de l'âge du patient
12. Utile pour la détection d'autres immunoglobulines spécifiques (par exemple , IgG, IgA , IgG4)

- Aucune étude : **le coût du diagnostic des allergies avec emploi de la puce ?**
- Le coût du test est déterminé par la très faible quantité d'allergènes.
- Aucune augmentation du coût de fabrication de l'ISAC entre 2006-2010, malgré 30% de molécules en +.
- Raisonnable de supposer que le **coût resterait stable ou pourrait diminuer.**
- **Biopuces concurrence aux TC ?**
 - Réduit le nombre d'étapes avant d'atteindre le diagnostic final.
 - Les coûts indirects de diagnostic de l'allergie pourraient être réduits.
- Plusieurs **critiques** :
 - le coût du système,
 - le manque d'automatisation,
 - le risque de détecter un très grand nombre de sensibilisations sans symptômes réels,
 - mélange d'allergènes indésirables,
 - tous les allergènes sources / molécules ne sont représentées.



ALLERGENS IN ALLERGY DIAGNOSIS:
A GLIMPSE AT EMERGING NEW CONCEPTS AND METHODOLOGIES

Ivana Giangrieco^{1,2}, Chiara Rafaiani², Marina Liso², Paola Palazzo², Debora Pomponi², Lisa Tuppo^{1,2},
Roberta Crescenzo^{1,2}, Maurizio Tamburrini¹, Adriano Mari², Maria Antonietta Ciardiello¹.

- Diagnostic de l'allergie basé sur la détection d'une interaction protéine/protéine impliquant l'allergène et l'IgE reconnaissant spécifiquement l'allergène.
- Systèmes disponibles **appliquent systématiquement les mêmes conditions expérimentales** (tampon phosphate salin, pH neutre) pour évaluer la sensibilité des allergènes, **indépendamment des caractéristiques de la source allergénique ou de l'environnement dans lequel un allergène entre en contact avec les muqueuses** (respi, tractus gastro-intestinal,...).
- L'inclusion dans les systèmes de diagnostic d'un **panel** de composants homologues provenant de différentes sources contribue à **l'amélioration de la précision du diagnostic** de l'allergie.
- La littérature montre que des protéines homologues, d'une même famille biochimique, peuvent avoir des propriétés immunologiques différentes...
- D'autres améliorations in-vivo et in-vitro devraient **exploiter les caractéristiques physico-chimiques** des conditions expérimentales utilisées pour le test qui peuvent **affecter les propriétés allergéniques et l'interaction allergène-IgE** et le diagnostic.

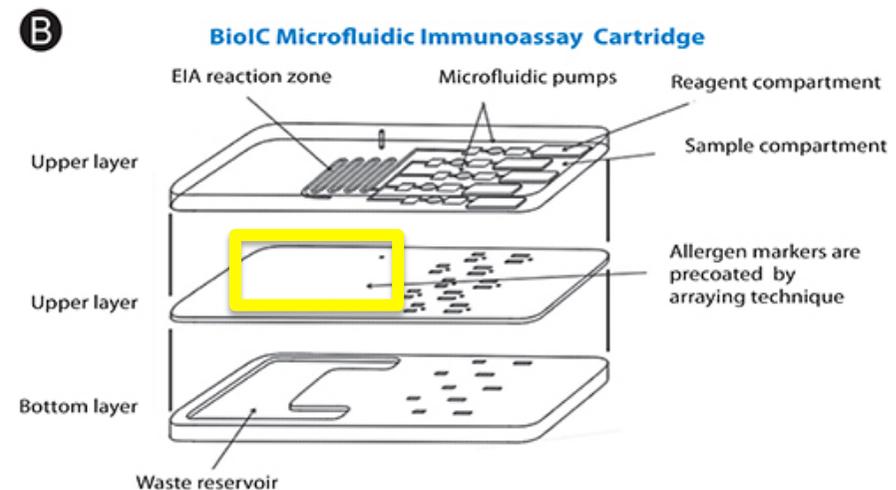
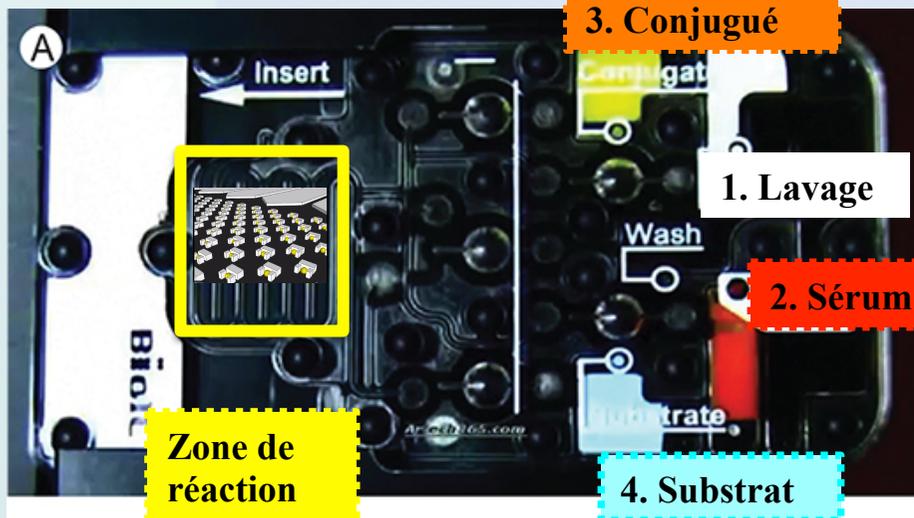
Shyur S-D, Jan R-L, Webster JR, Chang P, Lu Y-J, Wang J-Y.

Determination of multiple allergen-specific IgE by microfluidic immunoassay cartridge in clinical settings

- Système de cartouche microfluidique.
- Avantages :
 - Entièrement automatisé.
 - Diminution de la durée du test.
 - Faible volume d'échantillon.
 - Allergènes testés simultanément.
 - Corrélé à la technologie de CAP.

Shyur S-D, Jan R-L, Webster JR, Chang P, Lu Y-J, Wang J-Y.
Determination of multiple allergen-specific
IgE by microfluidic immunoassay cartridge in
clinical settings

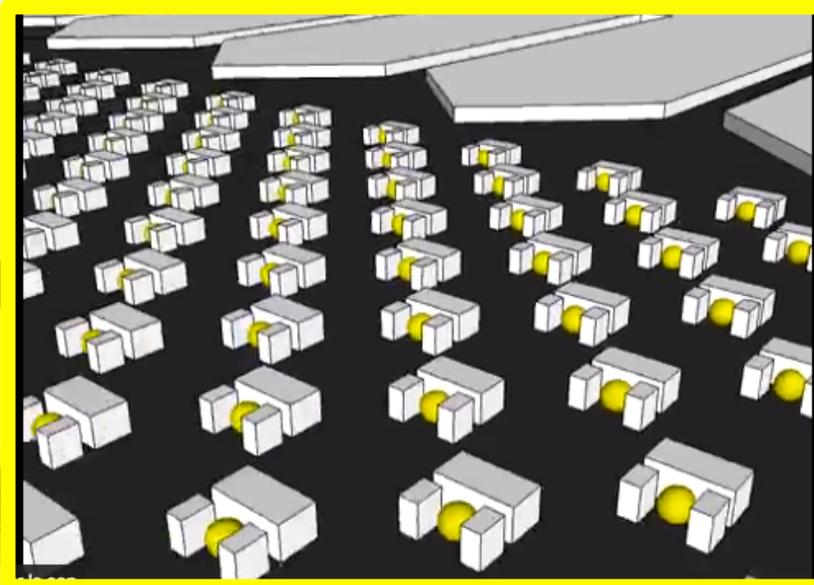
- Cartouche microfluidique pour l'analyse automatisée des IgEs contre plusieurs extraits d'allergènes.
- Dosage immunologique par chimio-luminescence, ELISA, 2 étapes, 32°C.
- Canaux de distribution de réactif, pompage réactifs (lavage, sérum, conjugué, substrat) provenant de réservoirs de stockage individuels vers une zone de réaction commune où les extraits d'allergènes sont immobilisés.
- 90 µL de plasma ou de sérum non dilué.
 - + 450 µL de tampon de lavage, 120 µL de substrat pré-mélangé et 120 µL d'une dilution 1:1000 de HRP
- La cartouche est insérée dans l'instrument BioIC (automatisé).



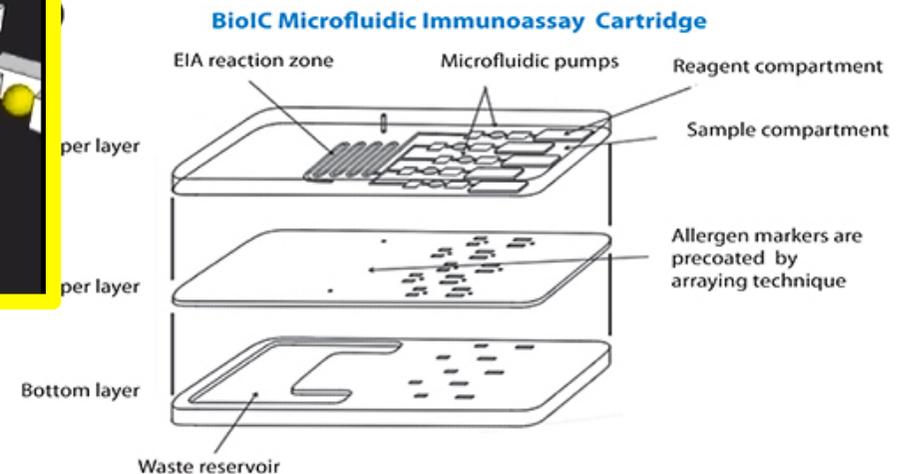
Shyur S-D, Jan R-L, Webster JR, Chang P, Lu Y-J, Wang J-Y.
Determination of multiple allergen-specific
IgE by microfluidic immunoassay cartridge in
clinical settings

- Cartouche microfluidique pour l'analyse automatisée des IgEs contre plusieurs extraits d'allergènes.
- Dosage immunologique par chimio-luminescence, ELISA, 2 étapes, 32°C.
- Canaux de distribution de réactif, pompage réactifs (lavage, sérum, conjugué, substrat) provenant de réservoirs de stockage individuels vers une zone de réaction commune où les extraits d'allergènes sont immobilisés

- 90
-
- La



é-mélangé et 120 μ L d'une dilution 1:1000 de HRP
IC (automatisé).

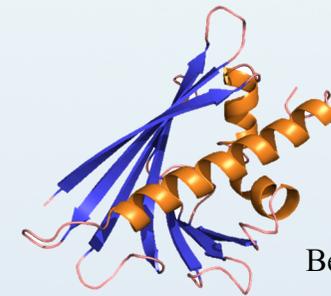


Shyur S-D, Jan R-L, Webster JR, Chang P, Lu Y-J, Wang J-Y.

Determination of multiple allergen-specific IgE by microfluidic immunoassay cartridge in clinical settings

- +/- 30 min (10 cartouches en 60-75 min).
- Signaux de chimio-luminescence scannés via caméra CCD.
- Courbe de dilution en série, contrôles négatifs immobilisés dans une zone de réaction.
- Test en QUADRUPLE.
 - Intensités cibles calculées en éliminant la valeurs la plus éloignée R/° à la moyenne,
 - Moyenne des trois valeurs restantes dont on soustrait l'intensité de contrôle négatif.
- Résultats semi-quantitatifs en unités arbitraires (UA).
- Réaction dans conditions dynamiques plutôt que statiques.

- ✓ **Titre des IgE faible.**
- ✓ **Présence d'IgE et d'IgG.**
 - **Compétition** possible pour les allergènes !!
- La plupart des épitopes IgE sont de type conformationnel.
 - **Maintien de la structure native des allergènes.**
- Incubation dans des conditions « statiques » et temps d'incubation ??
 - Signaux +élevés si temps d'incubation de 2h.
 - Le panel des IgEs positifs affecté par le temps d'incubation : signaux + élevés pour de + longues incubations.
 - Dans des conditions « statiques », des temps relativement longs sont nécessaires pour obtenir le maximum de sensibilité dans la détection d'IgEs.
- ✓ **Accélération de la diffusion des cibles sur leur site de liaison à l'intérieur d'une micro-cellule (test dit microfluidique).**

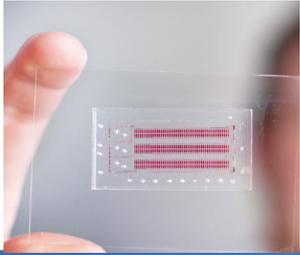


Bet v 1

Shyur S-D, Jan R-L, Webster JR, Chang P, Lu Y-J, Wang J-Y.

Determination of multiple allergen-specific IgE by microfluidic immunoassay cartridge in clinical settings

- 212 sérums d'enfants allergiques, 3-18 ans, 40 patients contrôles :
 - Evaluer la pertinence clinique.
 - Comparaison avec CAP, l'anamnèse clinique et les TC (normes EAACI).
- Sensibilité et spécificité identiques aux CAP.
- Corrélation des BioIC, TC et ImmunoCAP bonne par rapport à la clinique.
 - BONNE corrélation pour les allergènes respiratoires et alimentaires entre BioIC et ImmunoCAP (77,8 %, IC 95%).
 - MAUVAISE corrélation pour les allergènes respiratoires avec TC (BioIC 64,9%, IC 95%).
- En utilisant le système de classe semi-quantitative :
 - Corrélation entre BioIC et CAP entre 55,2% et 99,5 % , moyenne générale 80,9 %.
- Dans l'ensemble, efficacité de la technologie.
- Panel d'allergènes figé.



Microfluidic array

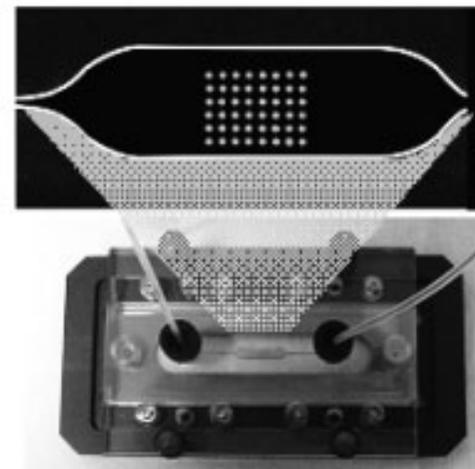
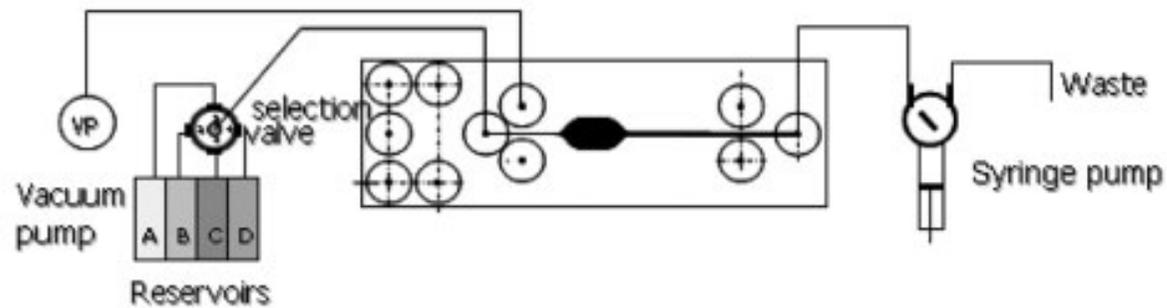
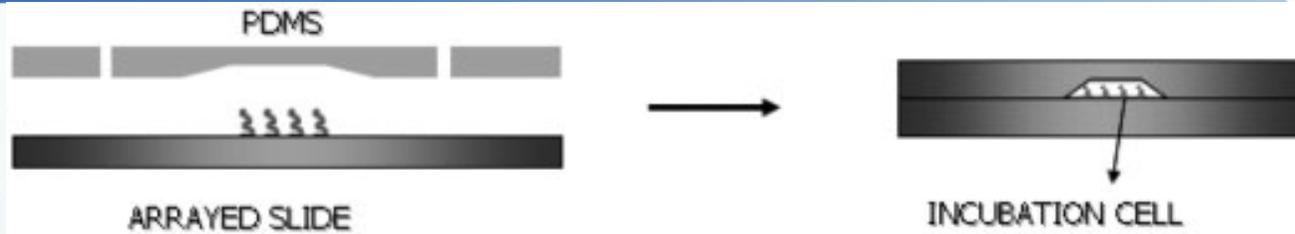
Prouesses techniques

Detection of allergen specific immunoglobulins by microarrays coupled to microfluidics

Marina Cretich¹, Gabriele Di Carlo^{1,2}, Cinzia Giudici¹, Sven Pokoj³, Iris Lauer³, Stephan Scheurer³ and Marcella Chiari¹

Proteomics 2009, 9, 2098–2107

- Un substrat gravé en PDMS (taille d'une lame de microscopie), moulé sur de la silice avec une chambre d'incubation centrale (largeur=500 μ m, profondeur=100 μ m) relié à une entrée et une sortie.
- **Micro-cellule gravée** placée sur la surface d'une petite lame en polymère **enduite préalablement avec un panel d'allergènes**.
 - Panel d'allergènes figé.
- Une chambre de micro-incubation est formée par le serrage du PDMS et la lame de verre dans un support en polycarbonate, relié à une vanne et à une pompe.
- Logiciel de contrôle fluide (débit) : les réactifs nécessaires introduits de manière séquentielle dans la micro-cellule (échantillons, lavage...)
- Incubation avec l'échantillon de sérum avec un écoulement d'avant en arrière (vitesse 1 μ l/sec) pendant 10 min.
 - flux alternés : réduire la consommation de l'échantillon (25 mL dilué à 50 ml avec le tampon d'incubation)



- Comparaison des résultats des dosages d'IgEs contre les protéines purifiées avec autres techniques (Immunoblot, ImmunoCAP).
 - 4 sérums de patients allergiques au bouleau, noisette, pomme ou cerise, symptômes (OAS, rhinite, conjonctivite, asthme et angioedème).
 - 4 témoins négatifs.

Table 1. Serum reactivity determined by IgE-immunoblotting

Serum	Bet v 1	Cor a 1	Pru av 3	Pru av 4	Mal d 3	Mal d 4
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	–	–	–	–
3	+	+	–	+	–	+
4	+	+	–	–	–	–
NC 1	–	–	–	–	–	–
NC 2	–	–	–	–	–	–
NC 3	–	–	–	–	–	–
NC 4	–	–	–	–	–	–

Table 2. CAP values (U/mL) of the analysed serum samples. CAP values >0.70 U/mL (CAP classes >2) are reported in bold. 1 KU = 2.4 µg of IgE

Serum	rBet v 1	rCor a 1	rPru av 3	rPru av 4	rMal d 3	rMal d 4
1	29.4	10.1	18.1	10.2	18.5	10.1
2	45.4	30.7	0.16	0.04	0.14	0.07
3	20.1	13.2	0.16	4.14	0.26	3.98
4	43.8	25.0	0.20	0.06	0.50	0.18
NC 1	0	0	0	0	0	0
NC 2	0	0	0	0	0	0
NC 3	0	0	0	0	0	0
NC 4	0	0	0	0	0	0

- Intérêts combinés du micro-fluidique et des micro-matrices.
- Revêtement permet d'immobiliser les allergènes dans leur conformation native.
- Permet un mélange efficace des échantillons de sérum :
 - On étudie une cinétique (diffusion limitée).
 - La liaison des IgEs est améliorée et la liaison de faible affinité des IgG est diminuée.
- Automatisé :
 - PAS d'intervention manuelle, en seulement 25 min.

- Résultats comparables entre techniques.
 - Résultats plus élevés en microfluidique.
- Pas de liaison non spécifique chez témoins négatifs

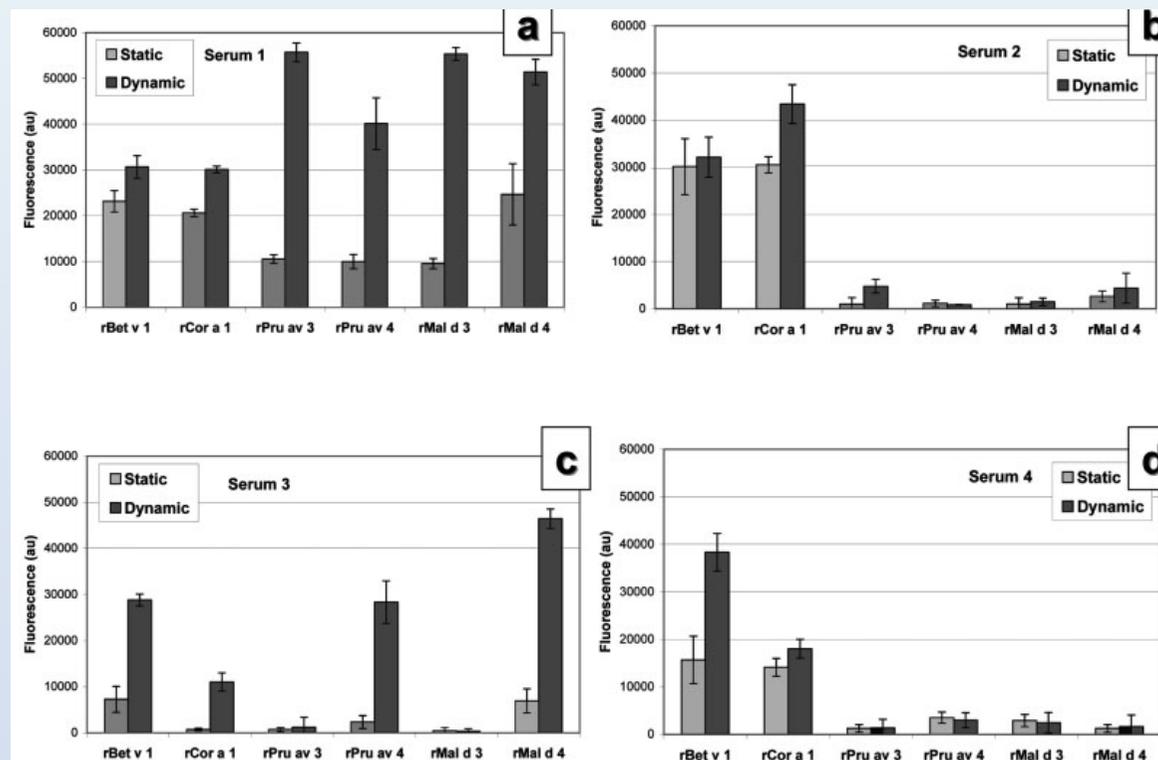


Figure 2. Comparison between the allergen specific IgE fluorescence signals detected by the conventional protocol (2 h static incubation) and by the microfluidic assay (10 min dynamic incubation) for the serum samples 1–4 (a–d). 25 μ L of serum, diluted 1:2 with the incubation buffer was used for every assay. The error bars represent the SD of the fluorescence of four replicate spots. Fluorescence was detected using 90% laser power and 90% PMT. The fluorescence values are calculated by subtracting the background level round about the spots from the fluorescence intensity of each spot.

Allergen microarrays on high-sensitivity silicon slides

Marina Cretich · Daniela Breda · Francesco Damin ·
Marta Borghi · Laura Sola · Selim M. Unlu ·
Samuele E. Burastero · Marcella Chiari

- **Lame de silicium (au lieu du verre ordinaire) :**
 - **Augmente la sensibilité.**
 - Capacité d'amplification de la fluorescence, meilleure performance.
 - Améliore l'efficacité clinique d'un diagnostic basé sur les composants.
- **Faible taux d'IgEs (selon dosage ImmunoCAP) pour des allergènes mineurs de pollens de graminées, arbres (Phl p 7 et Bet v 2) non identifiés par puce avec lame en verre (n=5/8), mais tous identifiés sur lames en silicium.**
 - Pertinents cliniquement (panallergènes) : permet d'identifier les allergies croisées !
- **Attention, Phl p 7 se comporte différemment probablement en raison de son faible PM(8,8kDa), présente une faible réactivité avec la surface polymère.**
 - Multiplexe : étalonnage soigneux du rendement d'immobilisation de chaque protéine nécessaire afin d'améliorer la fiabilité.
- **Progrès technologique => approche diagnostique et alternative intéressante aux outils traditionnels de diagnostic pour doser les IgEs.**

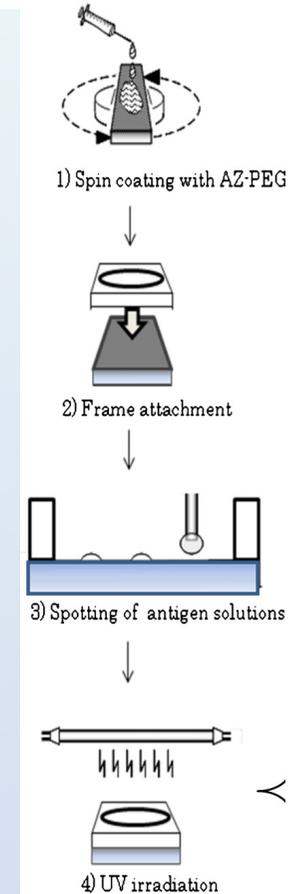


- Défaut des techniques précédentes :
 - Techniques d'immobilisation des antigènes par adsorption physique ou par liaison covalente via groupes amino ou carboxyle.
 - Parfois certains antigènes pas ou mal immobilisés, ou épitopes recouverts.
- Idéalement, il faut une technique qui permet :
 - Exposer aux Ac polyclonaux toutes les régions antigéniques.
 - Orientation de l'immobilisation aléatoire.
 - Permet un test rapide avec une technique d'immobilisation stable via des liaisons covalentes.
- Microarray préparé via immobilisation par photo-irradiation.

An automated multiplex specific IgE assay system using a photoimmobilized microarray

Yoshihiro Ito^{a,b,c,*}, Nozomi Moritsugu^a, Takahisa Matsue^{a,b}, Kiyomi Mitsukoshi^a, Hirohito Ayame^c, Norihiko Okochi^c, Hideshi Hattori^c, Hideo Tashiro^{a,b}, Sakura Sato^d, Motohiro Ebisawa^d

- Du PEG est appliqué sous vide sur une lame de verre nettoyée préalablement par des ultraviolets (revêtement par centrifugation).
 - Evite l'adsorption non spécifique des IgE de patient ou des réactifs de détection.
- La solution d'antigène déposée en spot sur la surface.
- La lame est photo-irradiée pour l'immobilisation des antigènes.
- La plaque revêtue est analysée par méthode d'ellipsométrie.
- IgE adsorbé sur les allergènes détecté par la luminescence chimique produite par anticorps secondaires marqués à la HRP.



Chip image

An automated multiplex specific IgE assay system using a photoimmobilized microarray

Yoshihiro Ito^{a,b,c,*}, Nozomi Moritsugu^a, Takahisa Matsue^{a,b}, Kiyomi Mitsukoshi^a, Hirohito Ayame^c, Norihiko Okochi^c, Hideshi Hattori^c, Hideo Tashiro^{a,b}, Sakura Sato^d, Motohiro Ebisawa^d

- Comparaison entre les résultats obtenus en ImmunoCAP et via puce.
- Attention ! Sources d'allergènes utilisées différents des CAP.
- Corrélations relativement élevées (>0,80) entre les systèmes CAP et puce pour tous les IgE utilisés sauf pour le sarrasin.
 - Mais valeurs rarement < 1KU/L en CAP

Correlation coefficient between the chemiluminescence intensity of images captured by the automated CCD camera and the value determined by the ImmunoCAP system.

Allergen	Correlation coefficient	Cv (%)	Sample number
Egg white	0.91	12	36
Cow's milk	0.98	8	36
Wheat	0.82	18	25
Buckwheat	0.73	9	30
Peanut	0.93	8	35
Soybean	0.84	11	25

- LOD 0,34 KUI/L



An automated multiplex specific IgE assay system using a photoimmobilized microarray

Yoshihiro Ito^{a,b,c,*}, Nozomi Moritsugu^a, Takahisa Matsue^{a,b}, Kiyomi Mitsukoshi^a, Hirohito Ayame^c, Norihiko Okochi^c, Hideshi Hattori^c, Hideo Tashiro^{a,b}, Sakura Sato^d, Motohiro Ebisawa^d

- Grand potentiel
 - => immobilisation de toute matière organique, indépendante de groupes fonctionnels ou des protéines.
- Orientation aléatoire des molécules immobilisées.
- Réduction des interactions non spécifiques des protéines sériques à l'aide du composant de PEG.
- Panel d'IgEs, environ 30 min et 10 µl de sérum.
- A confirmer avec des études complémentaires...

Allergen Micro-Bead array (ABA)

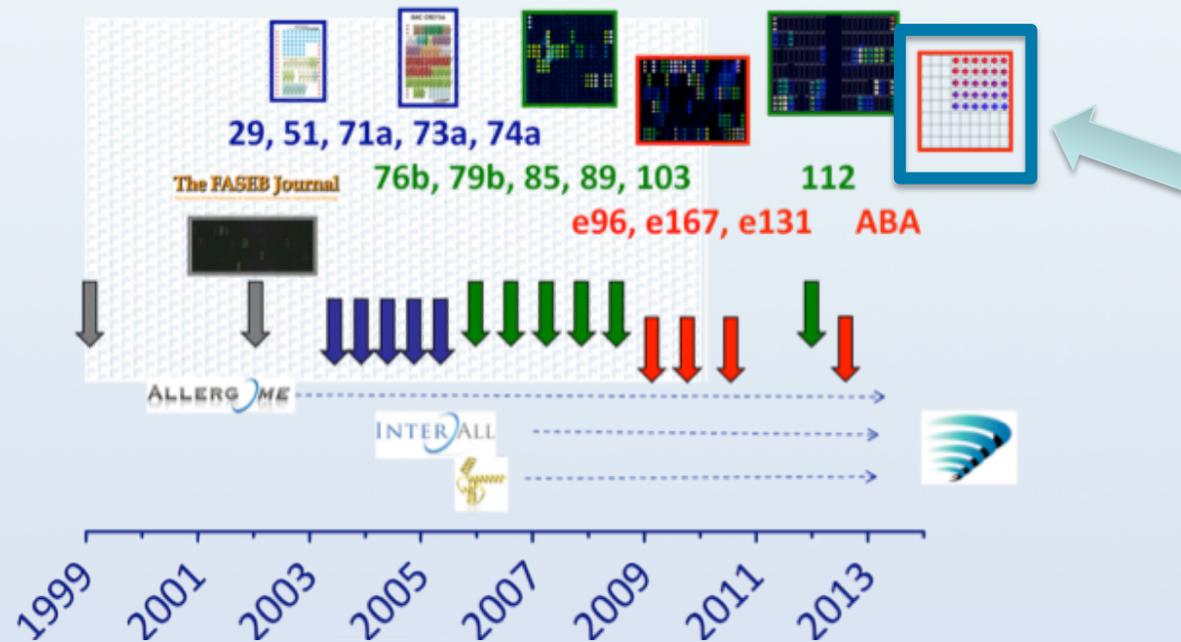
Intérêt et description de la technique

Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | PLoS ONE | www.plosone.org



- Multiplexes jugés **trop rigides** : sélection de l'allergène impossible.
- Nécessité d'une plateforme multiplexe d'immunoessais **plus flexible**, permettant le choix des allergènes et des molécules de contrôle (ex: QC internes) et permettant d'introduire des allergènes personnalisés (nouveaux allergènes).

Allergen Micro-Bead array (ABA)

Cytométrie en flux, avantages

Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4  PLoS ONE | www.plosone.org

- **Cytométrie en flux**, utilisée dans +/- tous les laboratoires de recherche ou de routine.
- Des **microbilles fluorescentes initialement « nues »**.
- **Couplage de molécules allergéniques avec des micro-billes** => approche personnalisée.
- Détection des IgEs des composants allergéniques couplés à ces microbilles fluorescentes puis analysées en FACS.
 - Difficultés lors des mises au point :IgE en faible concentration (vs IgG, IgM...)
- **Multiplexe souple et sur mesure (ABA)** .
- **30 microbilles différentes** mesurées en même temps, sans coût supplémentaire.

D'autres systèmes multiplexés pour la mesure des IgEs sont basés sur ce système de microbilles, lecteur scanner laser « MagPix » (Luminex Corp TX , USA) .



Allergen Micro-Bead array (ABA)

Etude comparative ABA/ISAC

Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4  PLoS ONE | www.plosone.org

- Méthode :
 - Anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques d'allergènes,
 - Sérums de 167 patients allergiques : caractérisé par puce ISAC,
 - ✓ ISAC a été pris pour référence :
 - ✓ car cinétique de réaction en microdimension similaire.
 - ✓ ISAC est la seule technique actuelle utilisant des composant au lieu d'extrait comprenant tous les composants testés dans cette étude.
 - Démonstration de la faisabilité de l'ABA.
- 336 matrices testées pour un ou plusieurs des 16 allergènes choisis,

Allergen Micro-Bead array (ABA)

Etude comparative ABA/ISAC

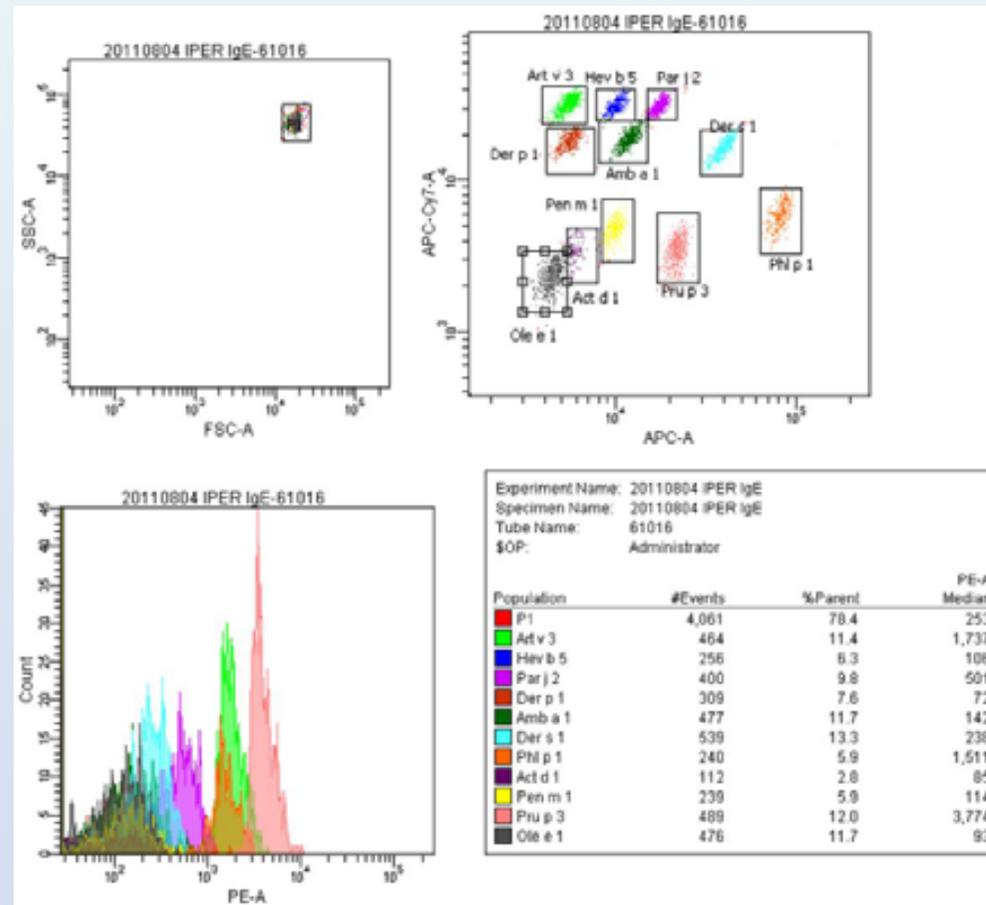
Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | PLoS ONE | www.plosone.org

- Résultats après un couplage réussi et contrôlé.



results matched the ISAC results. Numbers in the upper left corner indicate the Table S1 row numbers and patients' ID. In each panel: the upper left graph shows clustered micro-beads by their dimension; the upper right: scatter plots of each fluorescent bead; the lower left: fluorescence intensity and event counts; the lower right: summary table with median fluorescence values. Samples reported in each of the six panels had the following total

Allergen Micro-Bead array (ABA)

Etude comparative ABA/ISAC

Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | PLoS ONE | www.plosone.org

- Résultats après un couplage réussi et contrôlé.
 - Bonne corrélation entre l'ABA et l'ISAC ($r = 0,87$. $p = 0,0001$) pour détecter les IgEs de :
 - nAct d 1, nAct d 11, rAln g 1, nAmb a 1, nArt v 3, rBet v 1, rCor a 1, nCup a 1, nDer p 1, nDer s 1, rHev b 5, nOle e 1, rPar j 2, nPen m 1, rPhl p 1 et nPru p 3.
 - Pas de liaison non spécifique si sérum avec taux d'IgE_{tot} élevées.

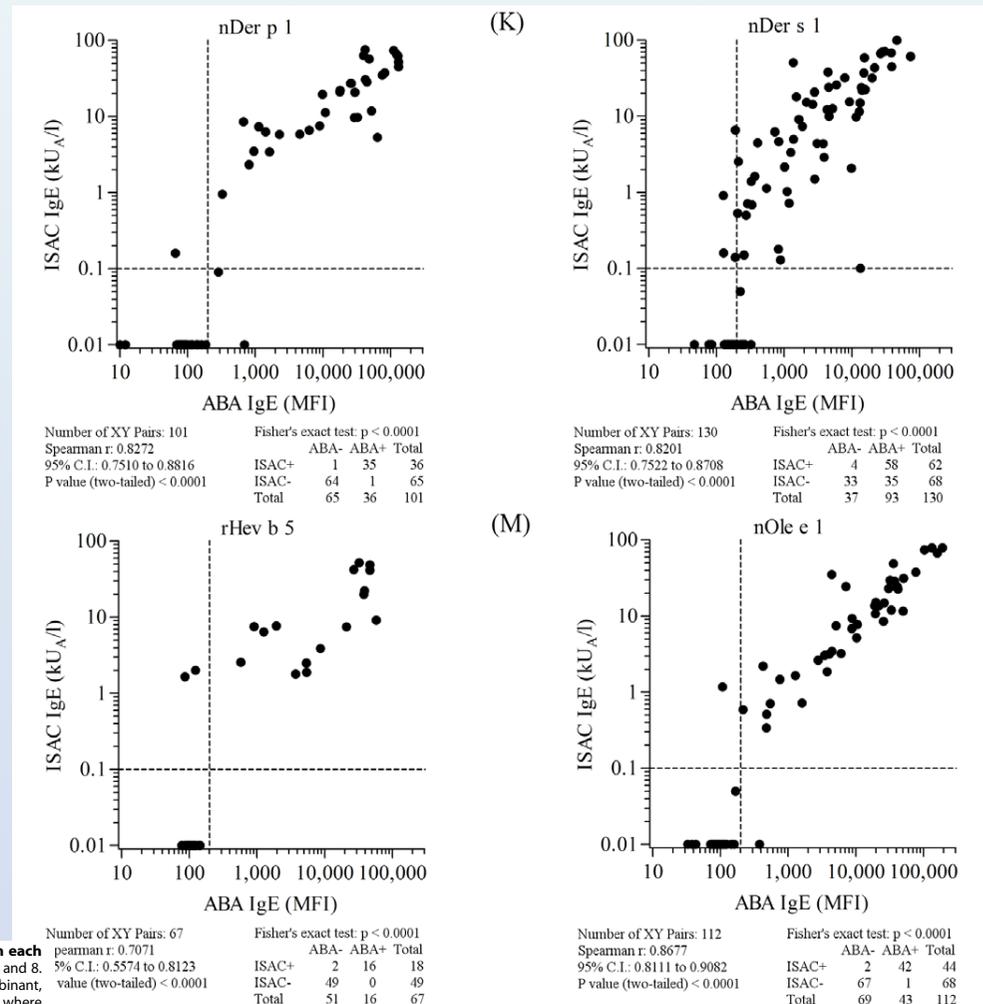


Figure 7. ABA versus ISAC correlation results on serum samples selected on the basis of the allergen specificities reported in each panel and listed in Table S1. Letter flags, namely H, I, J, K, L, M, in figure 7 indicate them as parts of the results shown also in figures 5, 6, and 8. Consecutive letters are used on purpose to recall result type continuity across the four figures. Allergen nature, being either natural or recombinant, matched for both tests. Vertical dashed lines represent the arbitrary ABA negative cut off value. Horizontal dashed lines mark the value range where ISAC IgE determinations are not always reproducible (unpublished data). For graphical visualization needs on log scales, zero value for ABA was set at 10 MFI on the X axis, and at 0.01 kU/l for ISAC value on the Y axis. The Spearman r correlation coefficient was calculated and the Fisher's exact test was used for statistical purposes. Statistical results are reported below each graph.
doi:10.1371/journal.pone.0035697.g007

Allergen Micro-Bead array (ABA)

Points forts/faibles

Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4  PLoS ONE | www.plosone.org

- Mêmes résultats que la méthode actuellement disponible ISAC microarray IgE.
- Limitations de l'ABA :
 - Liées aux nombre de combinaisons qui doivent être possibles pour obtenir une large plage de fluorescence sur chaque micro-bille.
 - Problèmes de discrimination des micro-billes qui ont des fluorescences trop proches les unes des autres.
 - Chevauchement des émissions de fluorescence des micro-billes.

Allergen Micro-Bead array (ABA)

Points forts/faibles

Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay

Debora Pomponi¹, Maria Livia Bernardi¹, Marina Liso¹, Paola Palazzo¹, Lisa Tuppo^{1,2}, Chiara Rafaiani¹, Mario Santoro¹, Alexis Labrada³, Maria Antonietta Ciardiello², Adriano Mari^{1*}, Enrico Scala¹

¹Center for Molecular Allergology, IDI-IRCCS, Rome, Italy, ²Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy, ³Allergens Department, Centro Nacional de Biopreparados, Havana, Cuba

April 2012 | Volume 7 | Issue 4  PLoS ONE | www.plosone.org

- ✓ La cytométrie de flux est une technologie simple.
 - Ne nécessite pas une grande expérience ni d'expertise dans l'interprétation.
 - Réduction de variabilité intra/inter-laboratoires et meilleure reproductibilité.
 - Pas affecté par les bruits de fond.
- ✓ Multiplexe à base de micro-billes coatées à des allergènes adaptée pour la détection simultanée d'IgEs de l'allergène dans des laboratoires hautement spécialisés ayant l'installation d'un FACS.
- ✓ Adaptée pour détecter d'autres Ig humaines (et non-humaines).
- ✓ Méthode multiplexe utile et flexible.
- ✓ Approche sur mesure.

- 👉 **Limitations techniques pourraient gêner l'expansion du système permettant un dosage des IgE large pour le diagnostic de l'allergie routine.**
 - 👉 Or des articles publiés réclament plus de composants...

- Outil intéressant pour la dermatite atopique
 - larges recherches IgE , auto-Ac, environnement... => diagnostic.
 - Pas de cible spécifique.
- Le + complet et le + simple outil.
- Quantités infimes de sérum, chez patients de tout âge.
- Au même niveau que les TC et que les CAP ?
- Profil de sensibilisation de chaque patient, bilan diagnostique de routine?
- L'interprétation des résultats de microarray nécessite des compétences.
 - Entre les mains des allergologues spécialisés.
- **Un microarray + complet doit être encouragé.**



Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MeDALL allergen-chip

Christian Lupinek^a, Eva Wollmann^a, Alexandra Baar^a, Srinita Banerjee^a, Heimo Breiteneder^b, Merima Bublin^b, Mirela Curin^a, Sabine Flicker^a, Tetjana Garmatiuk^a, Heidrun Hochwallner^a, Irene Mittermann^a, Sandra Pahr^a, Yvonne Resch^a, Kenneth H. Roux^c, Bharani Srinivasan^a, Susanne Vrtala^a, LeAnna N. Willison^c, Magnus Wickman^{d,e}, Karin Lodrup-Carlsen^f, Josep Maria Antó^g, Jean Bousquet^h, Claus Bachertⁱ, Daniel Ebner^j, Thomas Schleder^j, Christian Harwanegg^j, Rudolf Valenta^{a,*}

- ImmunoCAP ISAC, ce qui a déjà été fait :
 - Utilisé dans un grand nombre d'études cliniques.
 - Etudes épidémiologiques.
 - Suivi longitudinal des enfants.
 - Nouvelles sensibilisations.
- ImmunoCAP ISAC, de nombreux **points forts** et résultats proches mais pas identiques aux immunoessais classiques (WAO Position Paper, Décembre 2013).
- ImmunoCAP ISAC, **points faibles** :
 - Pour certains allergènes et pour les niveaux d'IgE faibles, pas suffisamment sensible.
 - Certains **allergènes importants ne sont pas inclus**.
- Puce MEDALL augmente le nombre d'allergènes avec une meilleure sensibilité.

Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MedALL allergen-chip

in press

Christian Lupinek^a, Eva Wollmann^a, Alexandra Baar^a, Srinita Banerjee^a, Heimo Breiteneder^b, Merima Bublin^b, Mirela Curin^a, Sabine Flicker^a, Tetjana Garmatiuk^a, Heidrun Hochwallner^a, Irene Mittermann^a, Sandra Pahr^a, Yvonne Resch^a, Kenneth H. Roux^c, Bharani Srinivasan^a, Susanne Vrtala^a, LeAnna N. Willison^c, Magnus Wickman^{d,e}, Karin Lodrup-Carlson^f, Josep Maria Antó^g, Jean Bousquet^h, Claus Bachertⁱ, Daniel Ebner^j, Thomas Schleder^j, Christian Harwanegg^j, Rudolf Valenta^{a,*}

- ISAC version « améliorée ».
- Puce d'allergène MEDALL, spécifique et sensible, pour le suivi des profils IgEs et IgG envers **>170 molécules d'allergènes**.
- Dosage de sérums issus des **cohortes européennes**.
- Programme de recherche européen dans lequel la technologie des multiplexes est utilisée pour :
 - Le suivi de l'évolution de l'allergie dans l'enfance.
 - Définir une carte géographique des sensibilisations cliniquement pertinentes dans différentes populations.
 - Etablir les profils de sensibilisation permettant de prédire les manifestations de la maladie.
 - Estimer les effets des thérapies.
 - Améliorer la prescription de l'immunothérapie spécifique.



Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MedALL allergen-chip

Christian Lupinek^a, Eva Wollmann^a, Alexandra Baar^a, Srinita Banerjee^a, Heimo Breiteneder^b, Merima Bublin^b, Mirela Curin^a, Sabine Flicker^a, Tetjana Garmatiuk^a, Heidrun Hochwallner^a, Irene Mittermann^a, Sandra Pahr^a, Yvonne Resch^a, Kenneth H. Roux^c, Bharani Srinivasan^a, Susanne Vrtala^a, LeAnna N. Willison^c, Magnus Wickman^{d,e}, Karin Lodrup-Carlson^f, Josep Maria Antó^g, Jean Bousquet^h, Claus Bachertⁱ, Daniel Ebner^j, Thomas Schleder^j, Christian Harwanegg^j, Rudolf Valenta^{a,*}

- Les dosages simulant des conditions où la quantité d'allergène est faible permettent l'estimation de l'effet du blocage de la liaison des IgEs par les IgGs des mêmes allergènes.
 - ⇒ Ressemble aux réactions biologiques dans les conditions d'exposition naturelle.
 - Dosages d'IgEs sur microarray fournissent des informations + pertinentes cliniquement.
- **Triplicate** d'une dilution en série d'un anticorps monoclonal d'IgE humaine spécifique à Bet v 1 mesurés sur le MEDALL (2,42 ng/ml = 1UA/ml en CAP).
- Jusqu'à 32 ng/ml de l'anticorps monoclonal (23.3ISU), une corrélation linéaire.
- Au-delà de 30 ng/ml, la courbe arrive à saturation.
- Bonne **reproductibilité** si IgE élevés (641 ng/ml=132ISU,SD=2.26ISU,CV=1,7%).
- Le signal détecté à la plus faible concentration d'IgE (0,05ng/ml) était 0.14 ISU avec un rapport signal/bruit de 14.

- Faible taux d'IgE : MEDALL aurait une **meilleure sensibilité**.
- Lorsque concentration d'IgE **>30 ng/ml, plus de relation linéaire**.
- En CAP, relation linéaire jusque 300 ng/ml d' IgE.
 - Dû au fait que sur **la puce, seulement 5 à 20 fg/spot de protéines** sont immobilisées versus CAP, 1-2µg de protéine.
 - Qualité des protéines et évaluation de la capacité de liaison de l'anticorps aux spots d'allergènes = critique.
- En CAP, excès d'allergène.
 - Grande quantité d'allergène couplé à une grande surface, tous les isotypes d'Ac peuvent se lier simultanément.
 - Impact important sur les résultats, à considérer lors de l'interprétation.
- Lorsque les taux d'anticorps sont relativement faibles, les deux systèmes donnent des résultats comparables.
- Lorsque les taux augmentent, le nombre relativement limité d'épitopes présents par spot empêche la liaison des anticorps spécifiques à l' allergène respectif.

- La puce mime la situation in-vivo où seules de petites quantités d'allergènes entrent dans le corps, plusieurs facteurs vont déterminer quelle Ig se liera mieux à l'allergène :
 - La concentration.
 - L'affinité des anticorps.
- Réduction de la liaison des IgE lorsque d'autres Ig sont présentes :
 - Anticorps bloquants reconnaissant le même épitope.
 - Affectent la liaison des IgE par d'autres mécanismes tels que l'encombrement stérique.
- Quantifier les IgG liés à un allergène ne fournit aucune information quant à savoir si cela inhibe la liaison des IgE au même allergène.

- Mesure du blocage des IgG, ou autres anticorps. Evaluations :
 - de l'efficacité immunologique de l'immunothérapie spécifique.
 - de l'effet protecteur des IgG maternelles transférées à l'enfant via le placenta ou lait maternel.
 - du développement spontané des réponses IgG spécifiques de l'allergène.
- Compétition IgG/IgE intéressante dans les échantillons de sérum ou d'autres liquides biologiques (les larmes, le lait maternel).
- Immunothérapie spécifique réussie :
 - des titres plus élevés d'IgGs de l'allergène, plutôt que les IgE sont produites.
=> IgG occupent plusieurs épitopes sur la molécule.
 - Peuvent bloquer la liaison des IgEs à l'allergène
=> la réduction de la liaison des IgE sera détectable.



Que
retenir
???

- Les extraits allergéniques disponibles pour le diagnostic in-vitro des allergies sont préparés à partir de matériel biologique.
 - Ils contiennent des protéines allergéniques et non-allergéniques.
 - Leur contenu en allergène majeur/mineur n'est pas toujours bien standardisé...
- Des milliers d'allergènes décrits, >130 allergènes naturels purifiés ou produits sous forme de recombinants sont commercialisés pour le diagnostic des allergies.
 - Dosages d'IgE spécifiques unitaires.
 - Multiplexe.
- Les composants allergéniques, nombreuses utilités :
 - ITS, prédire la sévérité des allergies.
 - Etablir un profil de sensibilisation expliquant les réactions croisées.
 - Aide objective à la prise de décision quant à la conduite à tenir (éviction totale, essai de réintroduction...).

➤ **Révolution dans le diagnostic**



Take-home messages

- Trouver la cause d'une allergie est parfois extrêmement complexe...
 - ✓ Malgré une bonne anamnèse clinique.
 - ✓ Un diagnostic, dans des cas complexes, prend parfois beaucoup de temps, nécessite parfois des tests dangereux (TPO) en plus des TC.
 - ✓ Allergie moléculaire : multiples tests, prises de sang.
 - ✓ La sécurité sociale ↓ et les coûts ↑
- Les Multiplexes permettent d'évaluer la réactivité des IgE contre un grand nombre de composants allergéniques en un test simple et rapide.
 - Allergie moléculaire
 - Dédié à des médecins spécialistes
- Le profil moléculaire en tant que résultat d'exploration de routine doit être regardé avec attention (quel allergène pertinent, si inattendu, titres).

- Des techniques innovantes permettent de définir des profils de sensibilisation :
 - Le + connu : **l'ImmunoCAP ISAC**.
 - 112 composants allergéniques
 - 30 µL de sérum
 - Bonne corrélation avec CAP mais sensibilité moindre (si IgEs <1 ISU)
 - 4h de test, non automatisé.
 - Panel rigide
 - Allergènes à revoir, incomplet probablement
 - Puce **Medall** (=ImmunoCAP ISAC amélioré)
 - 170 allergènes
 - PhotoImmobilisation des allergènes
 - Peu de publication... à suivre...
 - Microfluidic array : Lab-on-a-chip, BioIC
 - 30 minutes, Automatisé
 - Panel à la carte
 - Déjà utilisé pour certains immunoessais
 - **Micro-beads array** :
 - 30 minutes, Automatisé
 - Panel à la carte
 - Cytométrien en flux
 - Maximum 30 allergènes à la fois



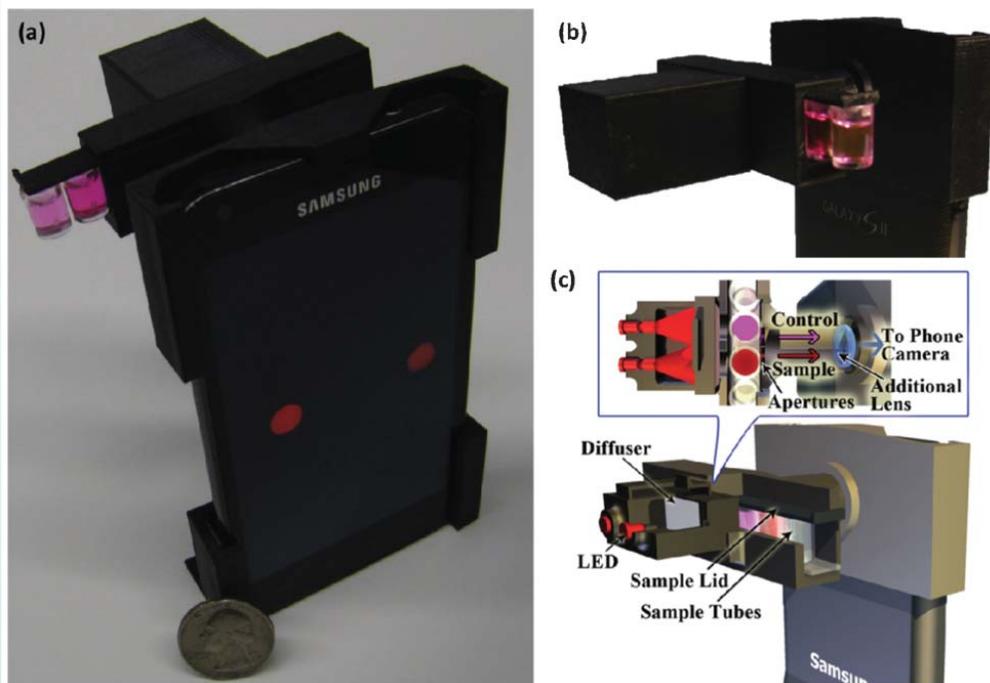
- Quid du futur et des développements ?
 - Elargir la gamme des composants allergéniques en routine ?
 - Y a-t-il des composants allergéniques non nécessaires ou moins pertinents ?
 - Un test multiplexe à la carte ?
 - Microbilles en cours de préparation versus tests « figés » ISAC et micro-fluidiques.
 - Il y a de la concurrence qui se prépare !!
- Doit-on suivre les sensibilisations précliniques ?
 - Finalement, des allergènes « en trop », inattendus, ne sont-ils pas intéressants pour le clinicien et le futur allergique du patient ?
 - ISAC et « tests figés » ont leur place...

**L'allergie moléculaire est plus qu'une réflexion, c'est un art.
ImmunoCAP ISAC est le premier tableau qui le met en valeur.
Le futur s'annonce riche en couleur !**

A personalized food allergen testing platform on a cellphone

Cite this: *Lab Chip*, 2013, 13, 636

Ahmet F. Coskun,^a Justin Wong,^a Delaram Khodadadi,^a Richie Nagi,^a Andrew Tey^a and Aydogan Ozcan^{*abc}



Service de Chimie Clinique du CHU de Liège - *Endocrinologie, Allergologie, Exploration lithiase* -



romy.gadisseur@chu.ulg.ac.be

0032(0)4.366.88.17



Technologies de laboratoire

Anne-Catherine BEKAERT

Claudette BORREMANS

Agnès CARLISI

Grégory COLLARD

Nunzio FERRANTE

Séverine GEBOES

Pierre LUKAS

Olivier ROUSSELLE

Georges SPRONCK

