

# **Les interférences dans les immunodosages**

**Etienne Cavalier**

# Les immuno-assays dans les labos...

CHARLES BAROIS PRÉSENTE

Lavie est  
un long fleuve  
tranquille.

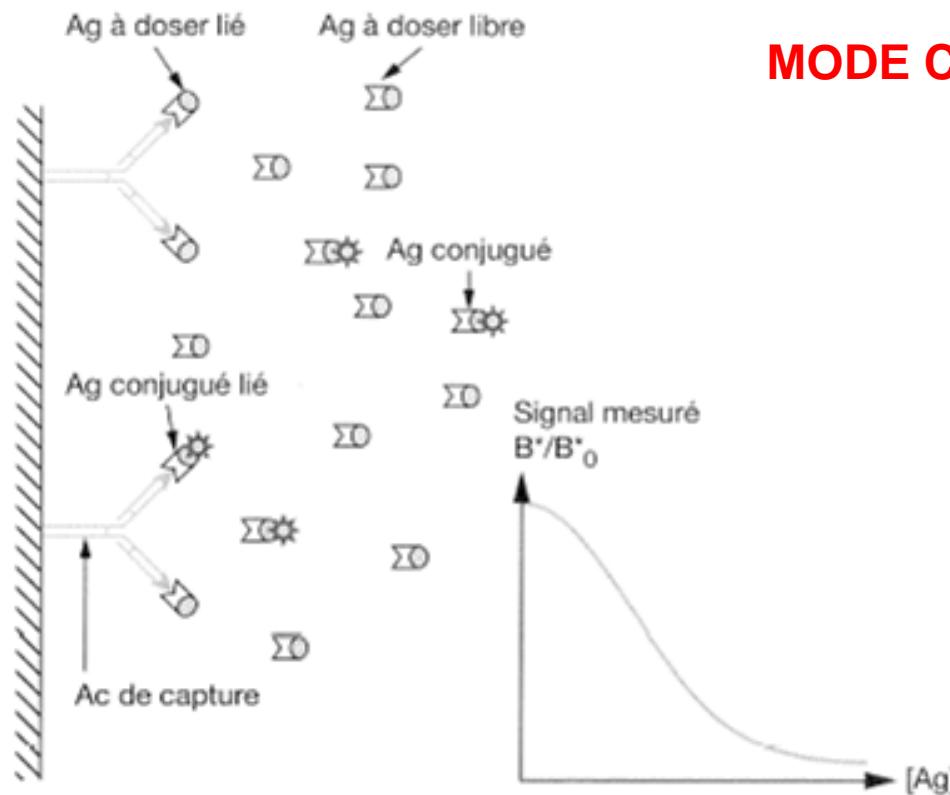
UN FILM DE  
ETIENNE CRATILHEZ



# Schéma de l'exposé

- Rappel sur les dosages
- Quelques cas cliniques vécus
- Quelques autres situations embarrassantes

## MODE COMPETITIF



**Figure 3 ■ Principe du dosage compétitif en phase hétérogène.**  
*L'Ac de capture est en principe en défaut par rapport à l'Ag traceur (Ag conjugué) et à l'Ag à doser.*  
 $F^*$  (free : fraction libre) : signal émis par la concentration en traceur libre.  
 $B^*$  (bound : fraction liée) : signal émis par le traceur lié à l'Ac de capture.  
 $B_0^*$  : signal émis par le traceur lié à l'Ac de capture en absence d'Ag à doser.  
*Dans cet exemple 12 molécules d'Ag à doser sont en compétition avec 4 molécules d'Ag\* traceur. Le rapport  $B^*/F^*$  du traceur est donc de 1:3.*  
*Insert : courbe de calibration type avec en ordonnée le signal mesuré par le rapport  $B^*/B_0^*$  et en abscisse la concentration en Ag à doser.*

## MODE NON-COMPETITIF Ou « sandwich »

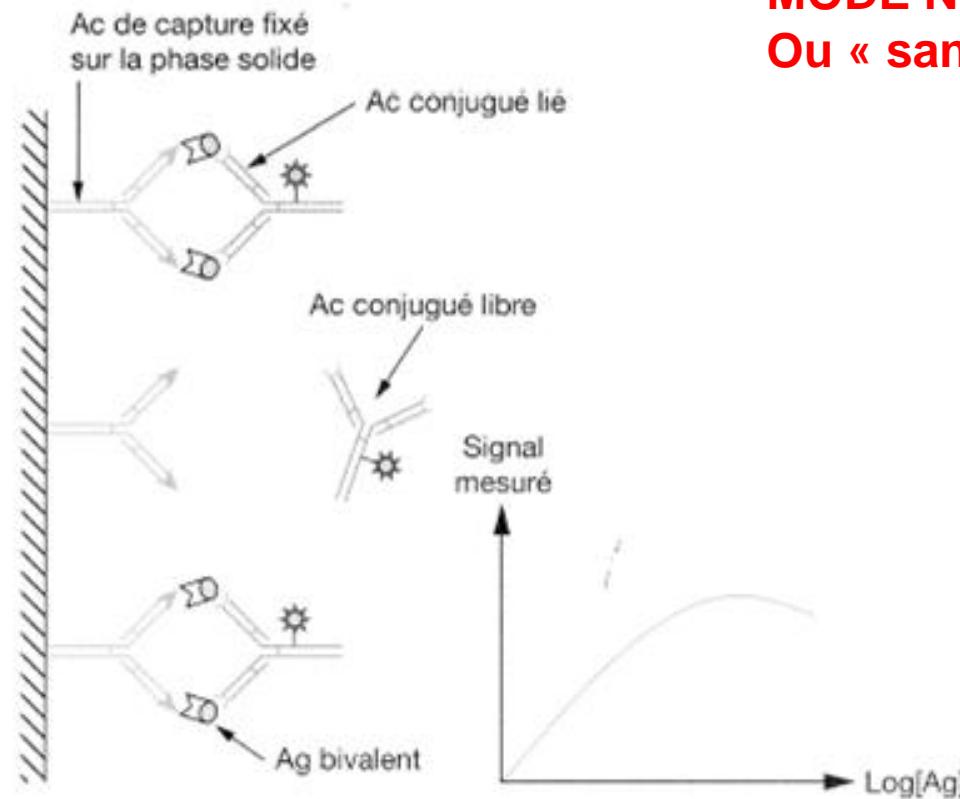


Figure 4 ■ Principe du dosage non compétitif en phase hétérogène.  
Les Ac de capture et Ac traceur (Ac conjugué) sont en principe en excès par rapport à l'Ag à doser.  
Insert : courbe de calibration type avec en ordonnée le signal mesuré et en abscisse la concentration en Ag à doser.

# Cas n°1

- Jeune femme de 29 ans travaillant comme infirmière.
- Prise de sang de routine pour suivi d'hypothyroïdie.
- PTH >2000 pg/mL avec la « vieille » trousse Liaison (VN:12-58), sans IR et bilan phosphocalcique normal...

# Cas n°2

## *Cavalier E, Transplantation 2009*

- Homme 61 ans, dialysé depuis 2003.
- Greffé en 2004; PTH avant greffe: 287 pg/ml
- OK jusqu'en 2007 puis rejet aigu du greffon (retour au Maroc sans prendre sa thérapie...). A ce moment, il reçoit de l'OKT3.
- Retour en HD en Février 2007
- De mars à décembre 2007: PTH mesurée tous les 3 mois sur Elecsys

	<b>Reference range</b>	<b>March 2007</b>	<b>July 2007</b>	<b>September 2007</b>	<b>December 2007</b>
<b>Elecsys PTH (pg/ml)</b>	<b>15 - 65</b>	<b>218</b>	<b>187</b>	<b>886</b>	<b>&gt;5000</b>
<b>Calcium mmol/l</b>	<b>2.15-2.65</b>	<b>2.08</b>	<b>2.30</b>	<b>2.40</b>	<b>2.45</b>
<b>Phosphorus mmol/l</b>	<b>0.87-1.45</b>	<b>1.16</b>	<b>1.35</b>	<b>1.09</b>	<b>0.97</b>

# Cas n°3

## Madame G, 60 ans

- En 2002, TCT à 63 pg/mL, non stimulable par le test à la pentagastrine (RIA DiaSource).
- Thyroidectomie; pas de mise en évidence d'un MCT en anapath.
- Post-op: TCT reste élevée (avec fluctuations).  
⇒ Suspicion d'une tumeur neuro-endocrinienne
- Explorations: CT thorax, CT abdomen, Pet scan FDG, Pet scan DOPA, Scintigraphies à l'ochtreoscan (2 fois), IRM du médiastin, catécholamines urinaires (plusieurs fois), etc...
- En 2006: TCT=138 pg/mL (kit DiaSource)

# Cas n°4

## Dépistage cancer de la prostate.

Méthode	PSA totale (ng/mL)	PSA libre (ng/mL)	Rapport (%)
Liaison (DiaSorin)	<0.09	7.64	NA
Modular (Roche)	0.036	5.31	NA
Architect (Abbott)	0.69	0.04	5.8
Immulite (Siemens)	13.2	1.34	10.2

# Cas n°5

## Madame L, 58 ans

- 25-OH vitamine D sur Liaison  
« indosable » (<0 ng/mL)

# Cas n°6

## Monsieur T, 49 ans

Présente un taux de 25(OH)-vitamine D à 112 ng/mL avec le Liaison.

Problème: il ne prend pas de vitamine D...

# Cas n°7

## Madame Z. 46 ans

- Travaille à la poste.
- Consulte son généraliste pour douleurs musculaires diffuses et fatigue inexpliquée
- Bio « générale » normale sauf insuline à 147 µUI/mL (VN: 6-27) sur Immulite alors que glucose et C-peptide normaux
- Résultat confirmé élevé sur 2 prélèvements antérieurs datant de 2 et 4 semaines
- La patiente est hospitalisée au CHU pour exploration complémentaire

# Cas n°7 bis

# HGPO chez une femme enceinte

- Profil « normal » des glycémies, mais les insulines à tous les temps sont toutes aux environ de 140 µUI/mL

# Cas n°8

## Madame X, 51 ans

- Consulte pour fatigue et douleurs articulaires
- Bio sans particularité sauf un taux de vitamine B12 >2000 ng/L...alors qu'elle jure ne pas en prendre
- Son endocrinologue va investiguer des recherches pour une néoplasie myéloproliférative

# Diagnostic?

## Cas n°1

Interférence due à des IgG  
humaines anti-chèvre

## Cas n°2, 7 et 7 bis

Interférence due à des IgG  
humaines anti-souris

## Cas n°3

Interférence due au Facteur  
rhumatoïde!

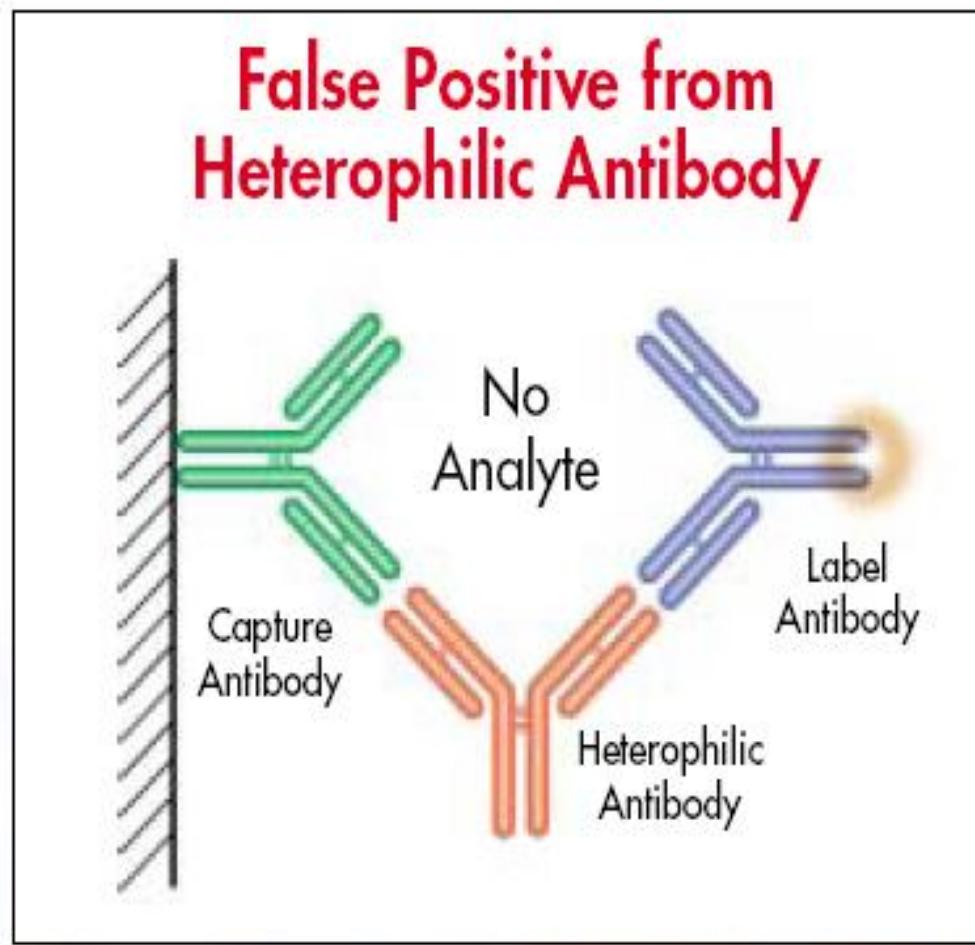
## Cas n°4

On ne sait pas!  
Auto-Ac anti-PSA (probablement)

## Cas n°5 et 6

Anticorps humain  
anti-chèvre et anti-lapin!

# Mécanismes potentiels des interférences par Ac hétérophiles:



# D'où viennent ces anticorps?

## Rheumatoid Arthritis

Vaccinations

Influenza

Animal Contact (Pets)

Allergies

Special Diets  
(e.g., Cheese,)

Blood Transfusions

Alternate Animal  
Contact Therapy  
(e.g., Thymic Cells,  
Sheep Cells,  
Embryonic Cells)

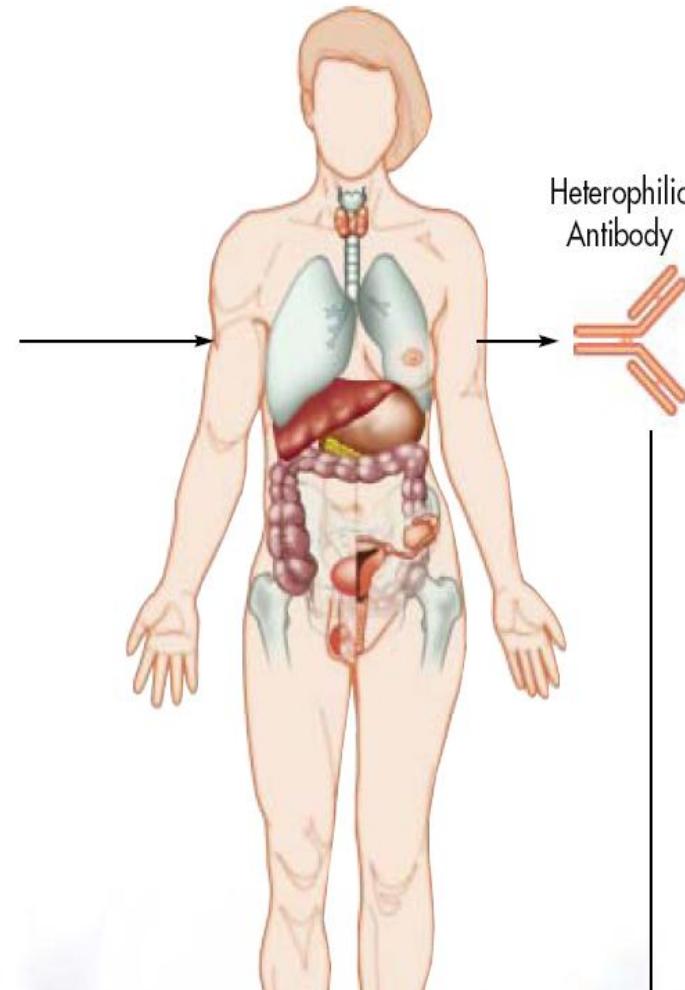
Autoimmune Diseases

Dialysis

Patent Medicines  
(OKT3)

Maternal Transfer

Cardiac Myopathy



# Causes iatrogéniques.

Drug	Source	Ref.#
Antibody-targeted imaging reagents	Mouse	23
	Rat	24
Antibody-targeted drugs	Mouse	23
	Rat	24
Anti-thymocyte globulin	Horse	25
	Rabbit	26
Anti-snake venom	Horse	27
Calcitonin	Salmon	28
Digibind (anti-digoxin Fab)	Sheep	29
Factor VIII	Pig	30
Insulin	Pig	31
Vaccines	Rabbit	32
	Chicken	33
Patent Medicines	Rabbit	34

# Transfusion sanguine

Etude sur 2829 patients montre que 14.4% des transfusés présentent des Ac anti-animaux vs. 10,4% chez des non-transfusés.

Hawkins BR. Population study of heterophile antibodies. Vox sang 1980;39:339-42

# Vaccination

Culture sur embryons de poulet ou œuf.

Sérum de lapin (rubella).

Cellules de rein de singe (polyo)....

Toute protéine animale résiduelle dans le vaccin peut être la cause d'une réponse immunitaire!

## Autres sources...

- Transfert maternel à travers le placenta

*Larsson A. Placental transfer of maternal anti-rabbit IgG causing falsely elevated TSH levels in neonates. Acta Paediatr Scand 1981;70:699-703*

- Contact avec des animaux domestiques

*Berglund L. Heterophilic antibodies against rabbit serum causing falsely elevated gonadotropin levels. Acta Obstet Gynecol Scand 1989;68:377-8*

- Maladie coeliaque

*Jewell DP. Circulating antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis. Gut 1972;13:796-801*

# Quelle est leur prévalence?

La vraie proportion est inconnue et les estimations varient de <1 à 80%.

Problème: choix de la méthode pour les mettre en évidence!

Il n'y a pas de méthode universelle pour les rechercher puisque l'Ag causant l'interférence est inconnu...

Table 3. Studies to assess prevalence of anti-animal antibodies.

Prevalence	Population	Ref.
Human anti-mouse IgG		
76%	67 blood donors	87
80%	10 infants	87
0.72%	10 000 blood donors	88
9.12%	1008 blood donors	89
Human anti-rabbit IgG		
5%		90
0.13%	10 261 neonates	38
0.09%	75 734 neonates	89
0.3%	9241 infants	37
Human anti-chicken IgG		
0%	150 patients and blood donors	91
Human anti-bovine albumin		
43%	28 healthy subjects	92
Human anti-bovine IgG		
7%	Blood donors	93
Human anti-sheep IgG		
7%	Blood donors	93
Human anti-guinea pig IgG		
0.51%	Blood donors	4
Multivalent antibody-binding substances*		
40%	668 blood donors, laboratory personnel, and patients	5

\* Antibody-binding substances are substances that react with a capture and a labeled detection antibody to form a sandwich.

# Conséquences de ces interférences

- Coût des investigations supplémentaires.
- Interventions médicales ou chirurgicales pouvant avoir des conséquences terribles pour les patients...

# Rotmensch, Lancet 2000

**Table 1. Summary of clinical findings and laboratory data.**

	Patient					
	i*	ii*	iii*	iv	v	vi
Age, years	24	26	36	36	22	28
hCG test	Abbott	Abbott	Abbott	Abbott	Abbott	Bayer
	AxSym	AxSym	AxSym	AxSym	IMX	Immuno-1
	hCG $\beta$	total hCG				
Initial hCG, IU/L	117	52	191	385	205	69
Range of hCG, IU/L <sup>b</sup>	45–135	22–89	145–351	78–451	5–205	48–74
Laparoscopy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dilation and curettage	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Oophorectomy			✓			
Hysterectomy			✓		✓	
Methotrexate chemotherapy	✓	✓	✓	✓		
EMAOO chemotherapy					✓	
Type 1 diabetes and coma					✓	

\* Patients i, ii, and iii are described in more detail in Cole (3).

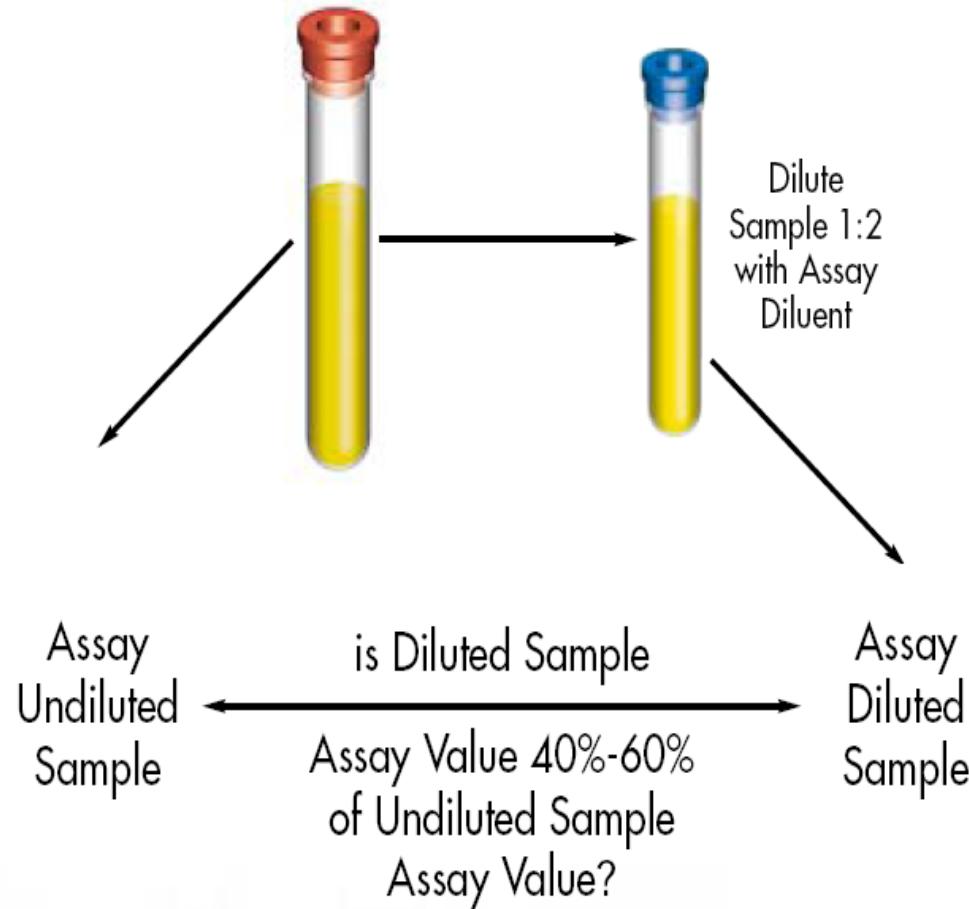
<sup>b</sup> Range of hCG concentrations in the 3–11 months (depending on case) after initial detection.

## Que peut faire le labo?

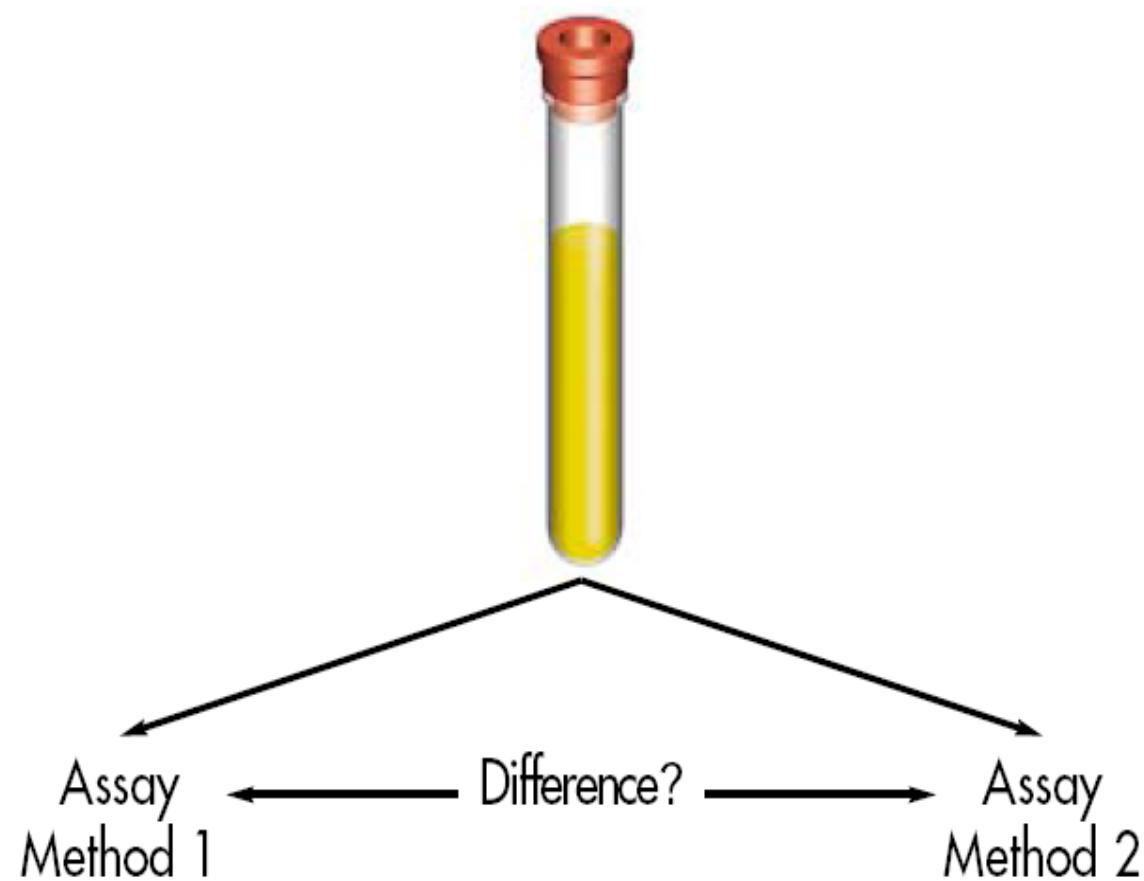
Il existe principalement 4 méthodes pour se débarrasser des anticorps hétérophiles.

Chacune de ces méthodes permet d'identifier les Ac hétérophiles, **mais elles peuvent toutes passer à côté d'un faux positif...**

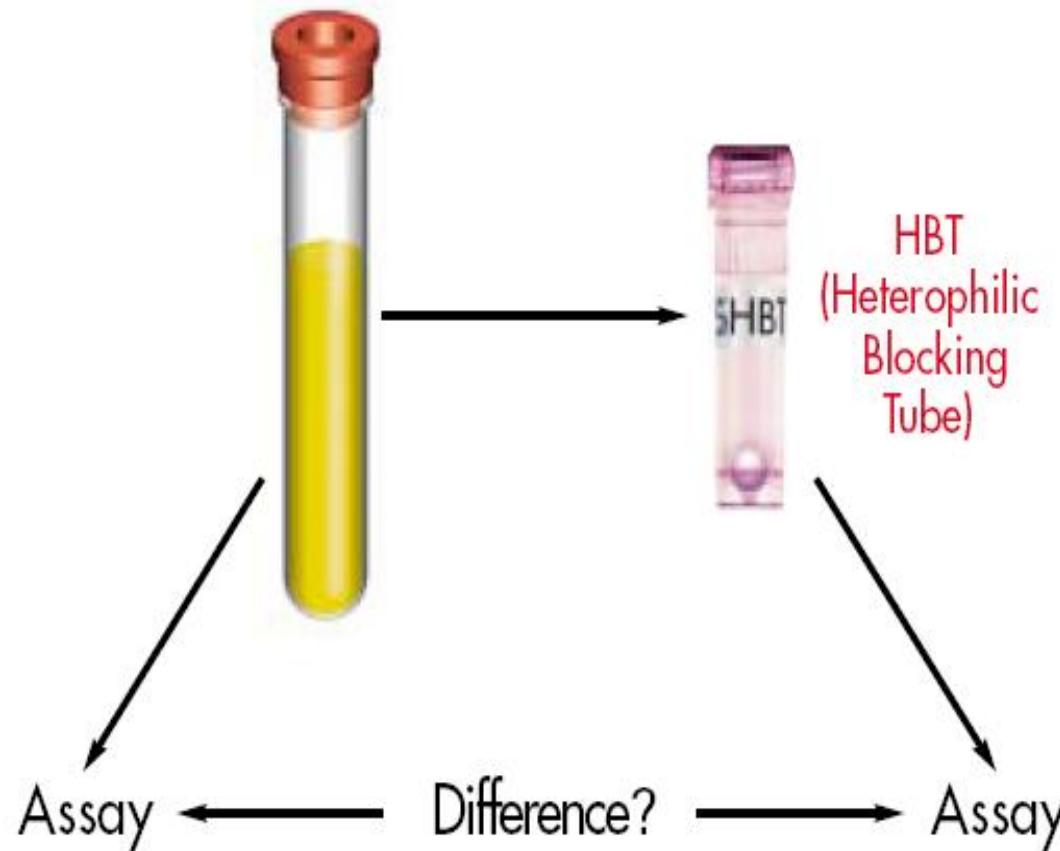
# 1: la dilution non linéaire.



## 2: Autre méthode.



## 3: HBT



## D'autres méthodes sont également utilisables:

- Précipitation par du PEG
- Inactivation à la chaleur

# Evaluation de la prévalence des anticorps hétérophiles sur le dosage de PTH intacte avec *l'ancien* kit du Liaison

2084 PTH determinations

*PTH < 60 pg/ml excluded*

743 elevated  
PTH (36%)

*Easy « clinically explainable » elevated PTH*

63 suspicious  
PTH (9%)

*HBT treatment*

↓20% in PTH:  
n=25 (40%)  
38 suspicious left

*RF determination*

21 RF-positive

*RF-Absorbent treatment*

↓20% in PTH:  
n=9 (43%)

Taux d'interférence:  
 $(9+25)/743 * 100 = 4.6\% \dots$

# Autres types d'interférence

# 1- A Case of Renal Osteodystrophy with Unexpected Serum Intact Parathyroid Hormone Concentrations

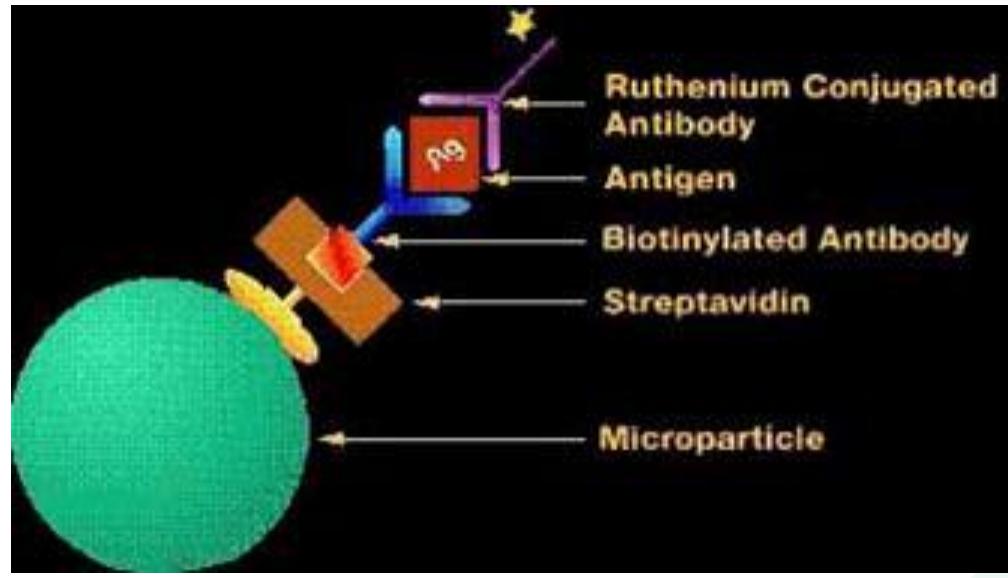
*Meany D, Clin Chem 2009*

- Femme 64 ans suspectée de souffrir d'os adynamique car PTH (Elecsys) comprise entre **2.5 et 54** pg/mL. Cependant, taux de BAP >>> (entre 150 et 200 U/L) contredisent cette PTH effondrée.
- Sérum envoyé vers un autre laboratoire qui utilise une autre méthode.

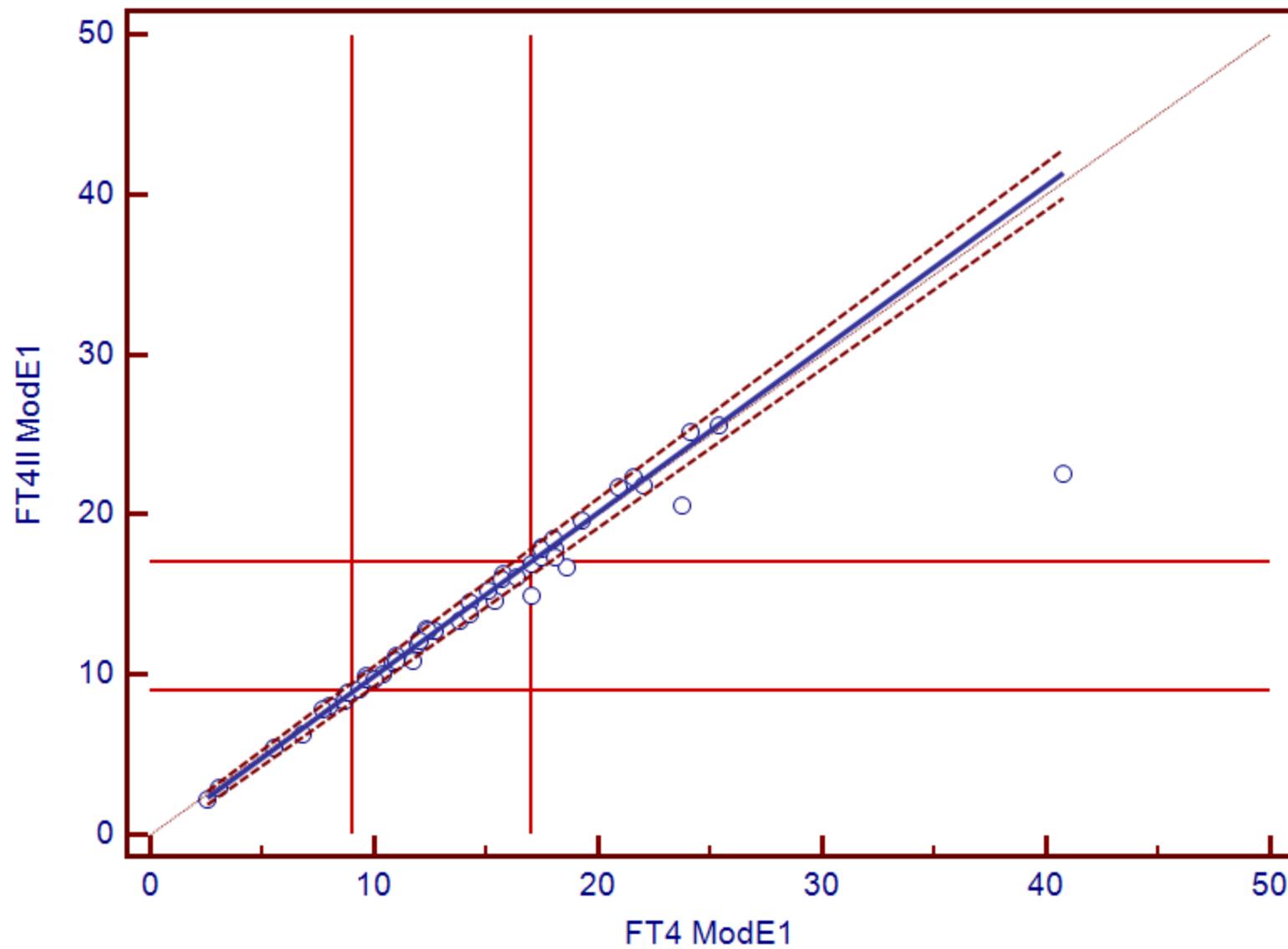
Résultat: **786** pg/mL!!!

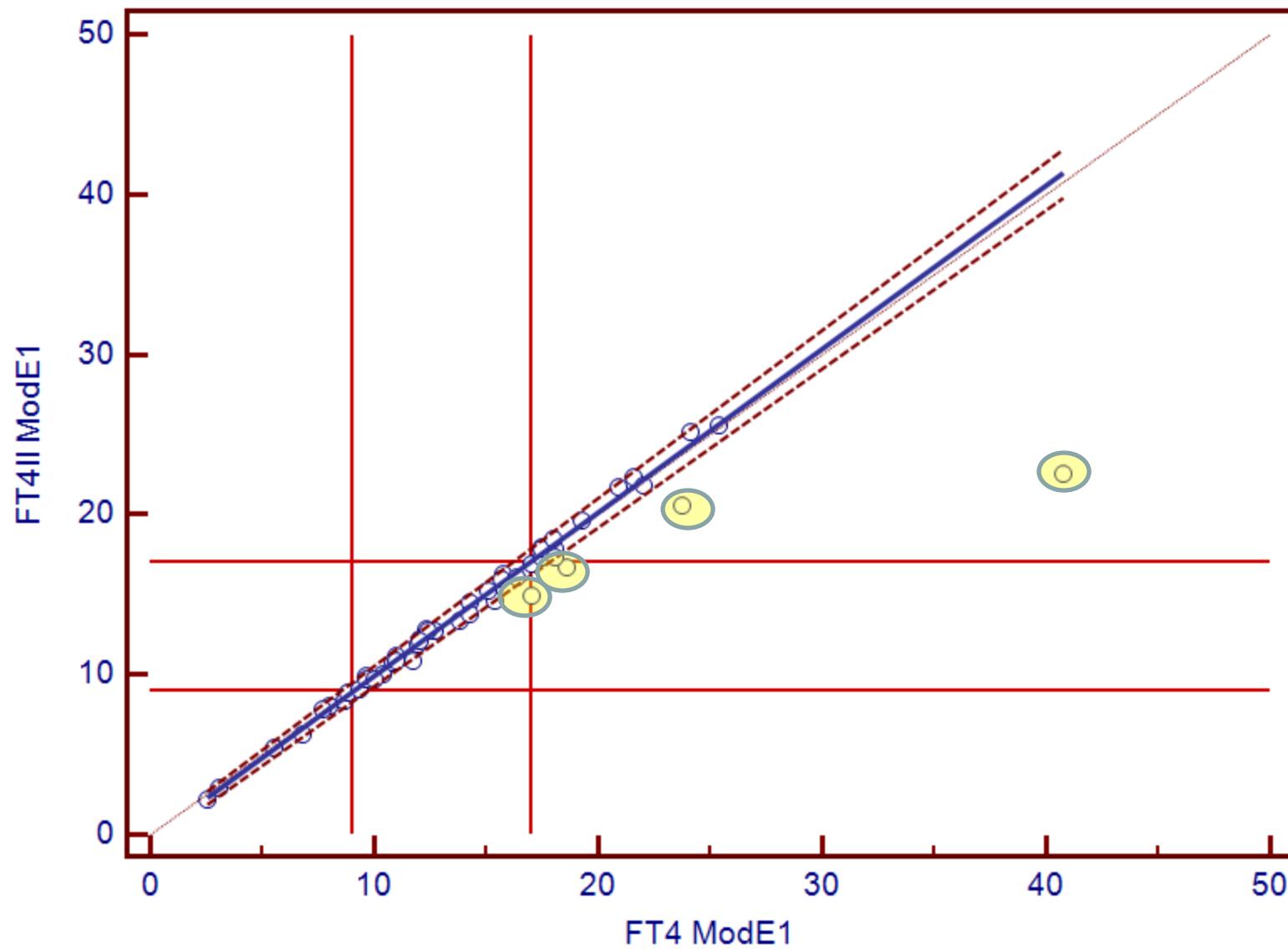
# Diagnostic?

***Biotine 10 mg/jour pour  
syndrome de jambe sans repos!***



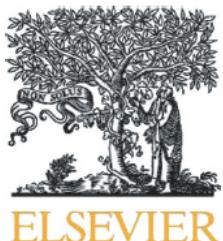
# 2- anticorps anti-ruthenium





**Et pour finir...**





Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Clinica Chimica Acta

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



## Evaluation of automated immunoassays for 25(OH)-vitamin D determination in different critical populations before and after standardization of the assays



Etienne Cavalier <sup>a,\*</sup>, Pierre Lukas <sup>a</sup>, Yannick Crine <sup>a</sup>, Stéphanie Peeters <sup>a</sup>, Agnès Carlisi <sup>a</sup>, Caroline Le Goff <sup>a</sup>, Romy Gadisseur <sup>a</sup>, Pierre Delanaye <sup>b</sup>, Jean-Claude Souberbielle <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Chemistry, University of Liege, CHU Sart-Tilman, Liege, Belgium

<sup>b</sup> Nephrology Dialysis and Hypertension, University of Liege, CHU Sart-Tilman, Liege, Belgium

<sup>c</sup> Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

# Factors affecting 25(OH)D measurement

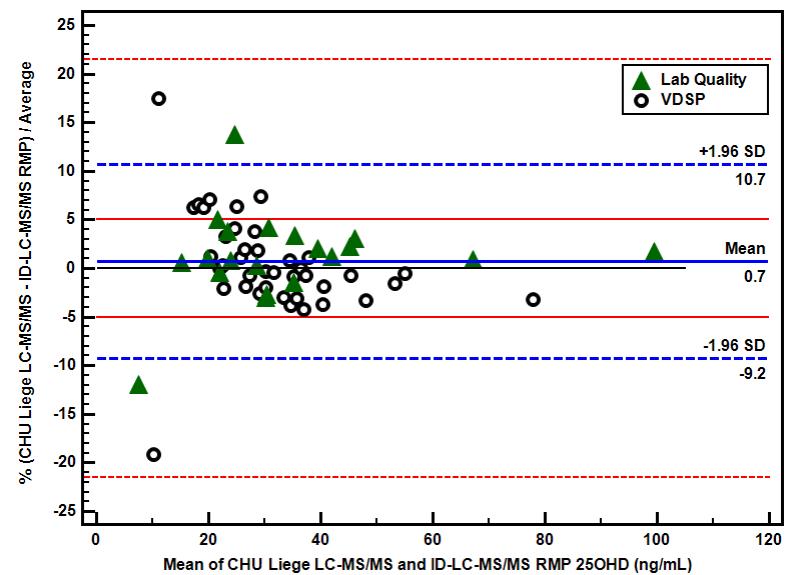
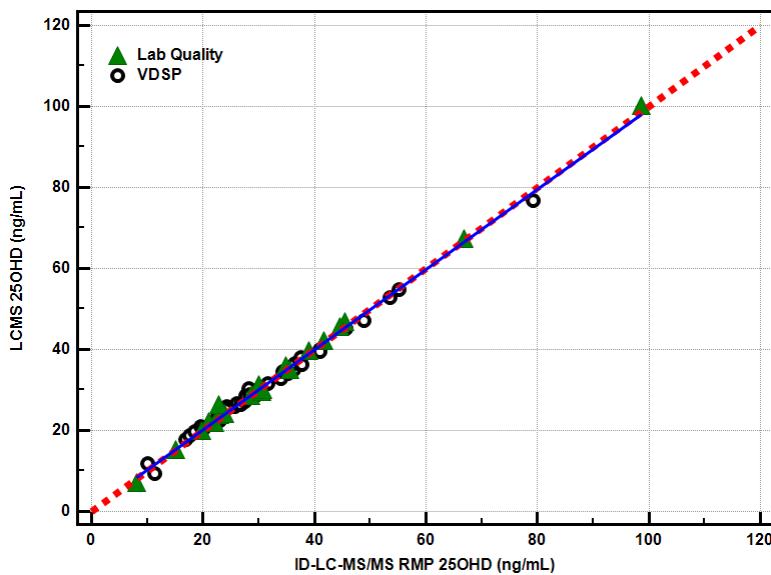
- Very lipophilic nature of the molecule.
- Necessity to displace the analyte from the VDBP (assumption that it is 100%, but no evidence!)
- Preparation of standards: stock solution in EtOH, impurities, denaturation of the « human » serum for the standard preparation,...
- Can circulate as 25(OH)D<sub>2</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> and need to recognize both forms.
- Erroneous results when 25(OH)D is added *in vitro* vs. endogenous 25(OH)D (no equilibrium with VDBP)
- Interference of epi-25(OH)D and of 24,25(OH)<sub>2</sub>D
- Matrix effects (uremic samples, pregnant women,...)
- ***Need for standardization***

# Vitamin D Standardization Program (VDSP)

- Coordinated by the CDC, the NIST and the University of Ghent.
- 40 serum samples obtained in apparently healthy single donors and containing 25(OH)D amounts determined with a LC-MS/MS method accepted now as the only reference method for 25(OH)D.
- Distribution to participating laboratories to calibrate the commercially available or the “home-brewed” methods, as well as all the immunoassays.
- Verification of the calibration on 4 sets of 10 samples sent in 2013
- Acceptable bias and imprecision are  $\pm 5\%$  and  $\pm 10\%$ , respectively

# **IMPACT OF THE VDSP RESTANDARDISATION PROGRAM ON 25(OH)D RESULTS**

# VDSP (and Labquality) panels on the LCMS/MS at CHU de Liège



# Methods

## Assays involved:

IDS-iSYS [iSYS]

Abbott ARCHITECT [Architect] ,

Roche Elecsys [Elecsys]

Siemens ADVIA Centaur Vitamin D Total

DiaSorin Liaison XL Total Vitamin D

LC-MS/MS traceable to the Reference Method Procedure (RMP) ID-LC-MS/MS

## Calibration samples:

184 serum samples from routine with 25OHD from 8.4 to 87 ng/mL

## Patient samples:

Pregnant Women, 3<sup>rd</sup> trimester, n=34

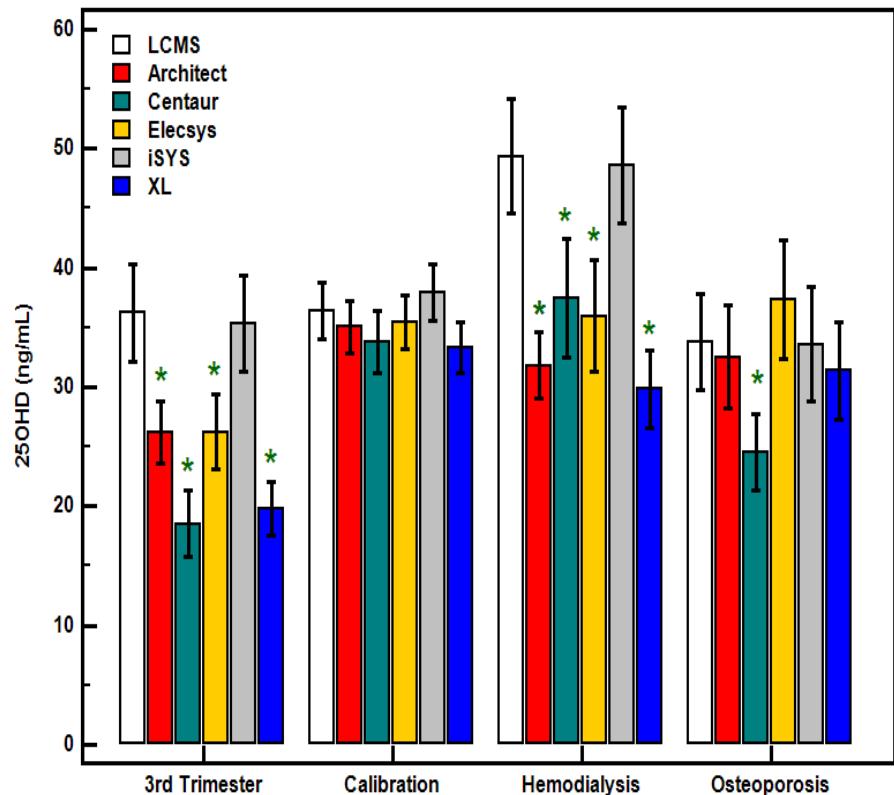
High Vitamin D Binding Protein (VDBP) levels in pregnant women can affect dramatically the measurement of 25OHD concentration.

Hemodialysis patients,(n=28)

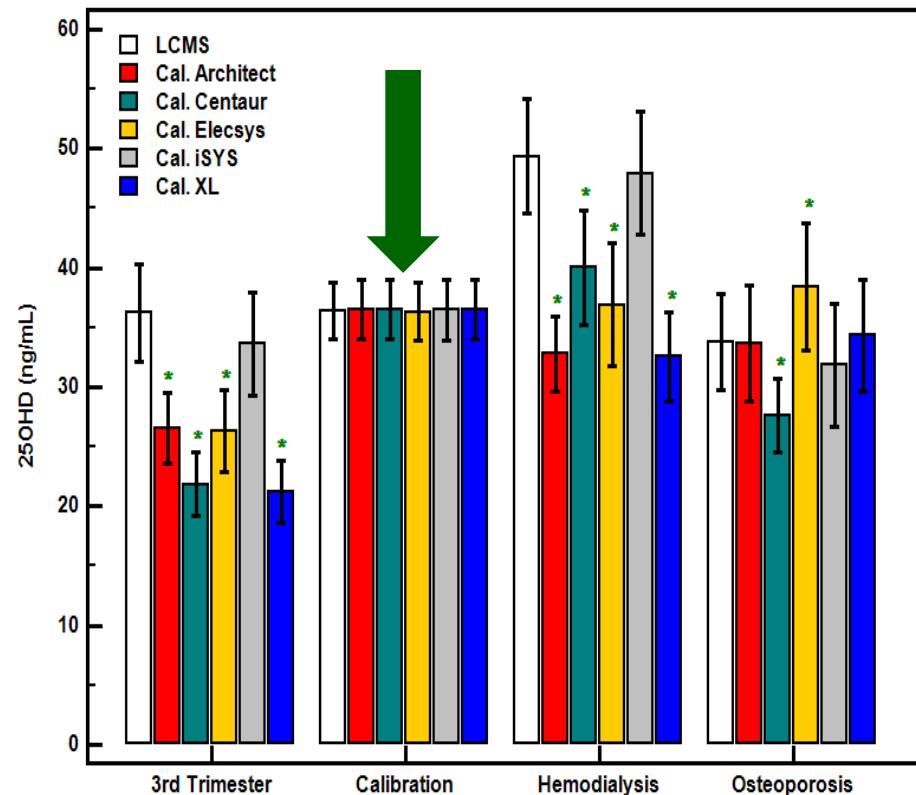
Control group: Osteoporosis Patients, (n=34), generally supplemented with 25OHD, according to clinical guidelines.

# After calibration, there are still differences in the patients groups

(A) Before calibrating



(B) After calibrating



After calibration against LC-MS/MS, all assays give similar results for the calibration samples but not in the samples of pregnant women, hemodialysis and osteoporotic patients.

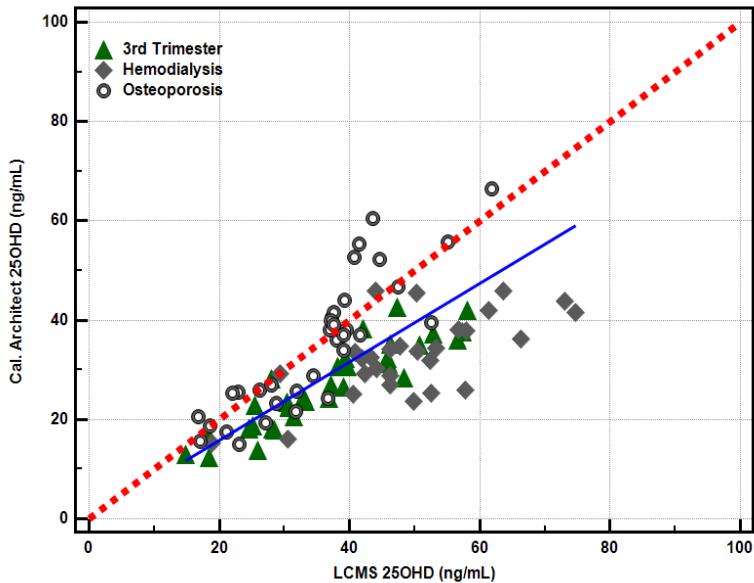
Error bar represents 95% CI. of the mean; \* denotes statistical difference ( $P < 0.05$ ) by independent samples t-test.

# LC-MS/MS vs Architect and iSYS

After calibration

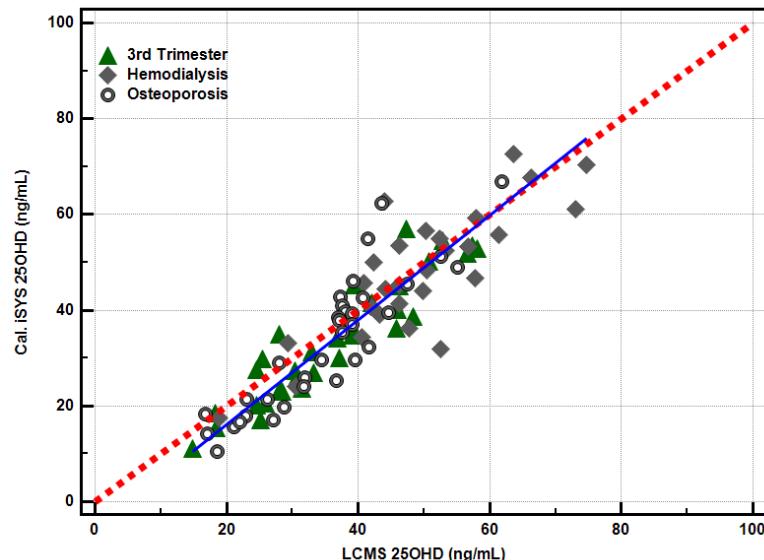
**LC-MS/MS vs Architect**

$$\text{Architect} = 0.792(\text{LC-MS/MS}) - 0.1$$



**LC-MS/MS vs iSYS**

$$\text{iSYS} = 1.091(\text{LC-MS/MS}) - 5.6$$



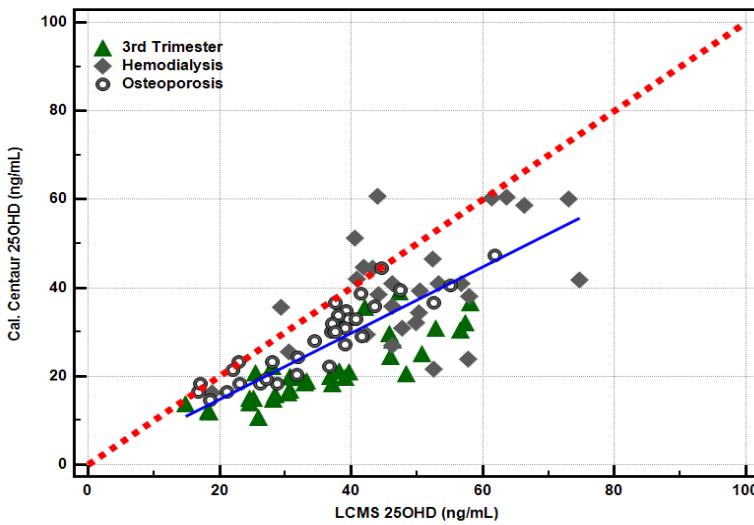
Architect still under estimates values in pregnant women and hemodialysis patients. iSYS seems little affected by special populations.

# LC-MS/MS vs Centaur and Elecsys

After calibration

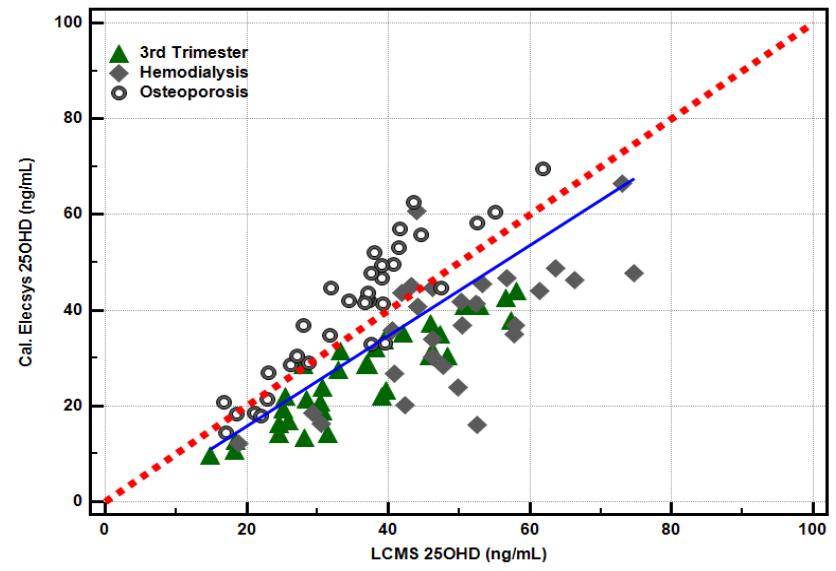
**LC-MS/MS vs Centaur**

$$\text{Centaur} = 0.749(\text{LC-MS/MS}) - 0.3$$



**LC-MS/MS vs Elecsys**

$$\text{Elecsys} = 0.944(\text{LC-MS/MS}) - 3.1$$



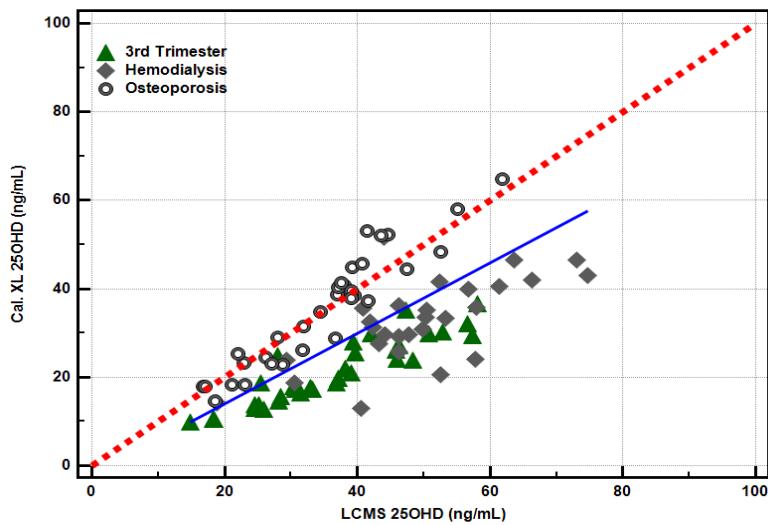
Centaur still under-estimates values in pregnant women, hemodialysis and osteoporosis patients.

Elecsys still under-estimates values in hemodialysis patients and over estimates osteoporosis patients.

# LC-MS/MS vs. LIAISON XL

## After calibration

LC-MS/MS vs LIAISON XL  
 $XL = 0.799 \times (\text{LC-MS/MS}) - 2.0$



XL still under-estimates values in pregnant samples and hemodialysis patients. Osteoporotic patients are OK

So,

- Re-standardization of the current 25(OH)D immunoassay will globally improve the differences.
- Transposition of the same “cut-off” values to all the assays will probably be possible, which will help the daily life of the physician which works with different labs.
- Problems remaining with special populations
- New cut-offs?

## Conclusion

**GARDONS UN  
ESPRIT  
CRITIQUE SUR  
NOS DOSAGES**

# Merci pour votre attention!

