



INTERFÉRENCES: MORT DES IMMUNODOSAGES?

Fleur Wolff, LHUB-ULB



Corata, Troyes 2019

Plan

Immunodosages

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Mécanisme des interférences quelques chiffres sur les interférences

- ✓ Ac antistreptavidine
- ✓ Biotine
- ✓ Ac hétérophiles

Quelques chiffres sur les interférences

La spectrométrie de masse

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Immunoessai versus spectrométrie de masse

Plan

Immunodosages

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Mécanisme des interférences quelques chiffres sur les interférences

- ✓ Ac antistreptavidine
- ✓ Biotine
- ✓ Ac hétérophiles

Quelques chiffres sur les interférences

La spectrométrie de masse

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Immunoessai versus spectrométrie de masse

Les immunodosages

Avantages:

- ✓ Facilité d'utilisation
- ✓ Faible coût
- ✓ Débit élevé d'analyses
- ✓ Disponibilité de kits marqués CE-IVD



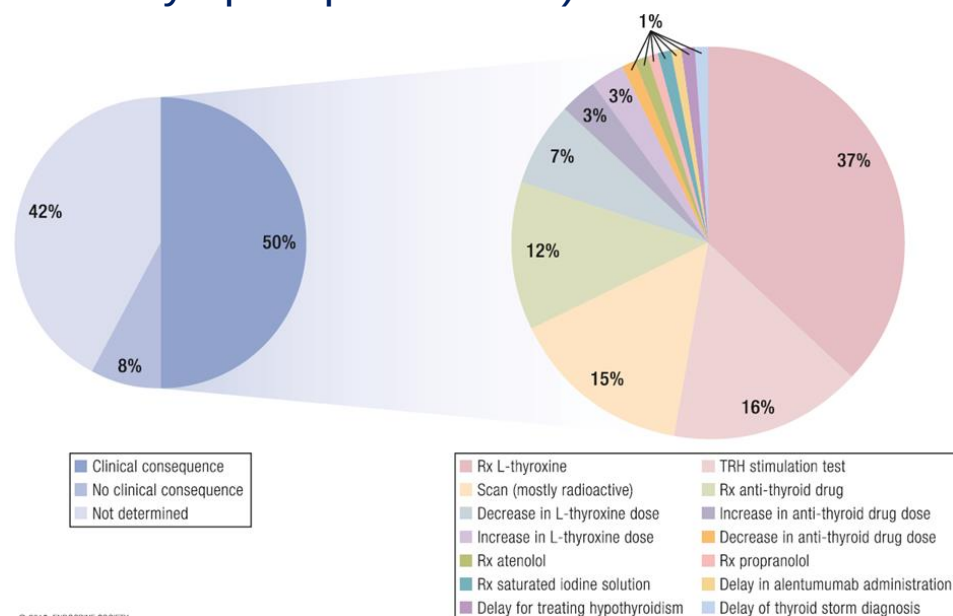
Les immunodosages

Inconvénients:

- ✓ Hétérogénéité des résultats obtenus (calibration, spécificité des anticorps utilisés)
- ✓ Sensibilité parfois insuffisante (faible affinité des Ac anti-stéroïdes)
- ✓ Peu de kit commerciaux développés pour les paramètres plus rarement demandés
- ✓ Manque de spécificité (interférences analytiques potentielles)

➤ Conséquences cliniques

dans 50% des cas (Favresse et al, 2018)



Plan

Immunodosages

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Mécanisme des interférences et quelques chiffres sur leur prévalence

- ✓ Ac antistreptavidine
- ✓ Biotine
- ✓ Ac hétérophiles

Quelques chiffres sur les interférences

La spectrométrie de masse

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Immunoessai versus spectrométrie de masse

Mécanisme des interférences

Ac antistreptavidine (ASA) et biotine

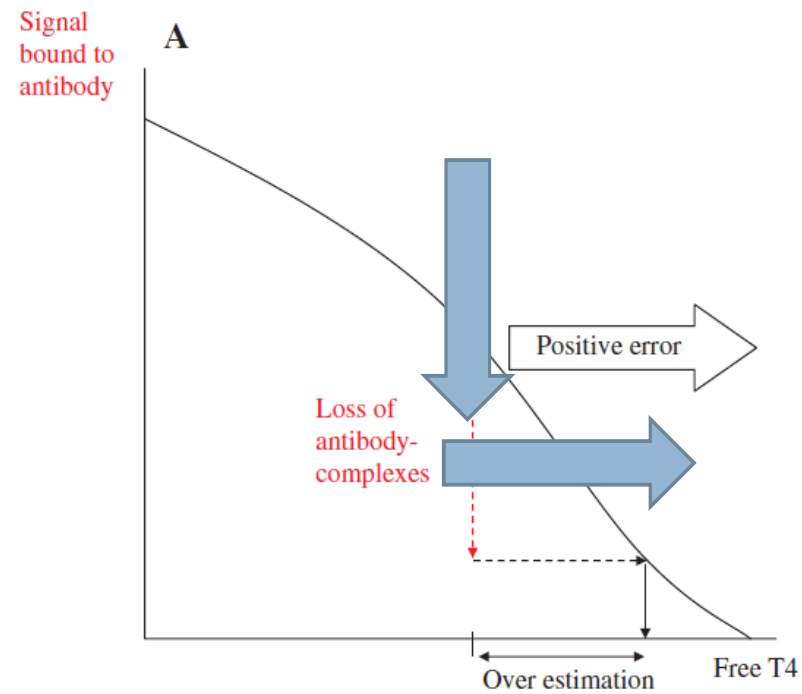
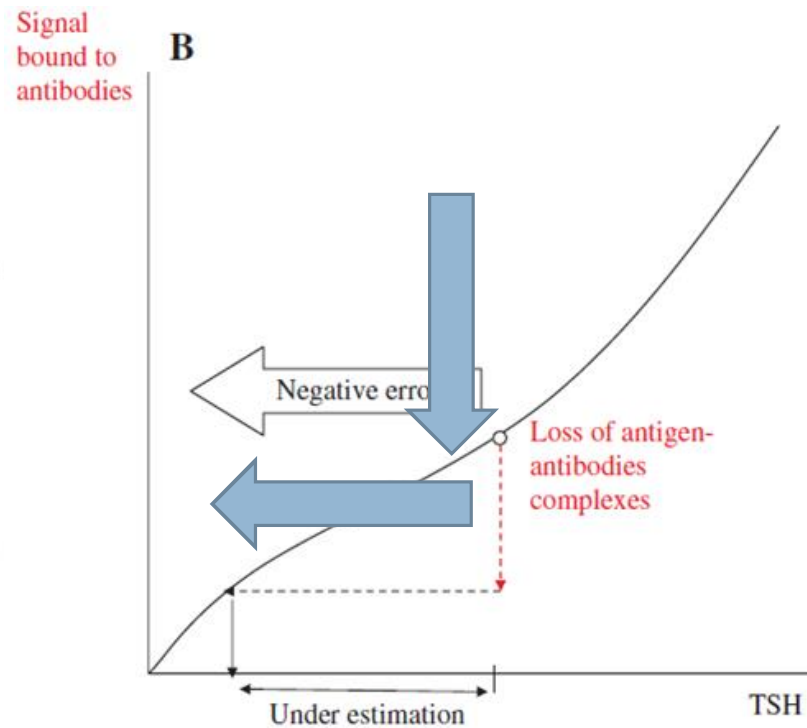
- Impact sur les plateformes analytiques utilisant la liaison biotine-streptavidine pour la séparation des complexes immuns → 50% des tests immunologiques commerciaux (Favresse et al, 2018)
- Interférence variable selon le format du test, le volume d'échantillon, les étapes de lavage



Mécanisme des interférences



Ac antistreptavidine (ASA) et biotine (Piketty et al, 2017; Luong et al, 2019):



Points essentiels

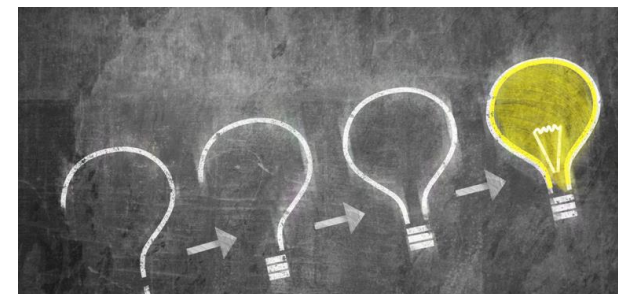
ASA

- Mécanisme lié à l'immunisation inconnu
- Impact prolongé (plusieurs mois)
- Impact plus prononcé pour les essais compétitifs par rapport aux essais en sandwich
- Pour les tests thyroïdiens, profil évoquant un syndrome de sécrétion inappropriée de TSH (Piketty et al, 2017)

Table 4: Reported interferences due to anti-streptavidin antibody.

Result (alternative method)		Duration of artifact	Clinical consequences	Ref. (year)
Total T4, nmol/L	179	≥ 2 years	Yes, inappropriate anti-thyroid drug	[16] (2013)
TSH	1.59			
25OH Vitamin D, nmol/L	> 250 (101)	ND	None	[4] (2010)
PTH, pg/mL	0.94 (16)			
FT4, pmol/L	27 (14)			
TSH, mUI/L	0.35 (0.79)			
FT4, pmol/L	25.6 (13.3)	≥ 18 months	Yes, inappropriate anti-thyroid drug	[17] (2016)
FT3, pmol/L	13.8 (4)			
TSH mUI/L	0.83 (2)			
Anti-TPO, TRAb, anti-TG	All positives (negatives ^a)			

Values indicated in bold were out of the age and method-related reference range. ND, not described. FT3, all results have been converted to pmol/L. FT4, all results have been converted to pmol/L. PTH, all results have been converted to pg/mL. ^aDetailed data not given in the case report.



Quelques chiffres sur la prévalence

- Faible, peu de cas rapportés dans la littérature (Favresse et al, 2018)
- Dans le futur, probable diminution des cas publiés, prise de précautions par certaines firmes
 - ✓ FT4 (Roche Diagnostics)



Quelques chiffres sur la prévalence

ASA (cas clinique)

- Femme 37 ans- palpitations, insomnie, fatigue, perte de poids
- Histoire familiale (père: Hashimoto, sœur: Basedow)
- Pas de prise de médicament/supplémentation vitaminique
- Palpation de la thyroïde normale
- TSH: 0,38 mIU/L (VN: 0,27-4,2), T4L: 25,4 pmol/L (VN: 12-22, 2nd génération, Roche e602)

FT4 (pmol/L)					
	Cobas e602/Roche (2 nd gen.)	Cobas e602/Roche (2 nd gen.)	Cobas e602/Roche (3 rd gen.)	Centaur/Siemens	Lumipulse G600II/Fujirebio
Pré-traitement	Aucun	High capacity streptavidin agarose	Aucun	Aucun	Aucun
Concentration (pmol/L)	48.7	18.3	18	15.5	15.5
Valeurs normales (VN)	12-22	12-22	12-22	9-26	10-20

Points essentiels

Biotine

- Vitamine B hydrosoluble (B8, B7, H)
- Coenzyme (transfert de groupements carboxyliques)
- Dose journalière recommandée (DJR): 30 µg/jour (Piketty et al, 2016)
- Traitement de maladies métaboliques (5 à 30 mg/jour), sclérose en plaques (300 mg/jour; dose > 10000 X DJR, Qizenday®)
- Automédication- complexe multivitaminé- 1 mg (réduction chute de cheveux, ongles renforcés); dose > 300 X DJR
- Période de washout dépendante la plateforme, du test et des paramètres susceptibles d'impacter les paramètres PK de la biotine (Peyro Saint Paul et al, 2016)



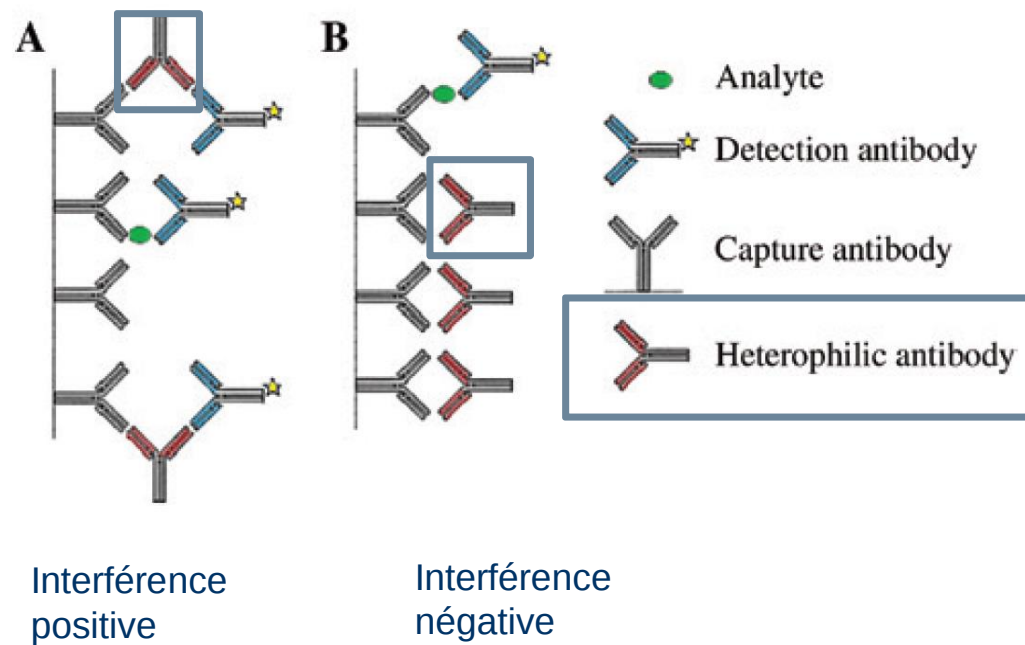
Quelques chiffres sur la prévalence

- Cas publiés fréquents
- Prévalence de la prise de biotine ou de concentrations sériques en biotine susceptibles d'interférer: $\pm 7\%$ étude US ñ patients se présentant aux urgences (Katzmann et al, 2018)
- Précautions prises par certaines firmes, augmentation de la valeur seuil pour l'interférence à la biotine (FT4, TSH, Troponine; Roche Diagnostics)



Mécanisme des interférences

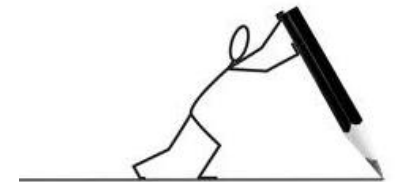
- Anticorps hétérophiles
 - ✓ Mécanisme d'action (Censi et al, 2016)



Points essentiels et quelques chiffres sur la prévalence

Anticorps hétérophiles

- Définitions très variables dans la littérature
- Anticorps à l'origine de résultats erronés (immunodosages)
- Anticorps humain anti-animal / anticorps hétérophiles
- Persistance plusieurs mois après exposition à l'espèce animale concernée



Prévalence

- Très fréquent: prévalence de 30-40% dans la population générale (prévalence des interférences: 0.05-0.5%) (Oostendorp et al, 2017)
- Précautions prises par les firmes: ajout de faibles quantités de sérum animal (souris ou chèvre), ajout d'AgGs animales polyclonales



Plan

Immunodosages

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Mécanisme des interférences et quelques chiffres sur leur prévalence

- ✓ Ac antistreptavidine
- ✓ Biotine
- ✓ Ac hétérophiles

Quelques chiffres sur les interférences

La spectrométrie de masse

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Immunoessai versus spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse

- Avantages (chromatographie couplée à la spectrométrie de masse)

- ✓ Sensibilité
- ✓ Spécificité
- ✓ Mesure simultanée de plusieurs paramètres biochimiques (panel stéroïdes, panel immunosuppresseurs) ñ volume d'analyse plus faible ñ temps d'analyse plus court

Panel stéroïdes: ex Chromsystems®

Panel 1: aldostérone, corticostérone, cortisol, cortisone, 11-déoxycortisol

Panel 2: D4-androstènedione, DHEA, DHEAS, DHT, oestradiol, 17-OH progestérone, progestérone et testostérone

Panel immunosuppresseurs: tacrolimus, ciclosporine, évérolimus et sirolimus

- ✓ Différentes matrices analysables: urine, salive, sang total sur papier buvard



La spectrométrie de masse

- Inconvénients (Antonelli et al, 2017)
 - ✓ Coût
 - ✓ Technique d'extraction (automatisation possible)
 - ✓ Personnel qualifié
 - ✓ Débit faible d'analyses
 - ✓ Peu de kits marqués CE-IVD



La spectrométrie de masse

- La solution à tout?

- ✓ Complexité et temps d'exécution +++
 - ✓ Standardisation appropriée
 - ✓ Importance des valeurs de référence (panel stéroïdien: impact du cycle menstruel, du statut ménopausal, de la prise de contraceptifs)
 - ✓ Validation appropriée (impact du choix des standards internes)
- « A mass spectrometry method does not necessarily constitute a reference method » (Antonelli et al, 2017)



Plan

Immunodosages

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Mécanisme des interférences et quelques chiffres sur leur prévalence

- ✓ Ac antistreptavidine
- ✓ Biotine
- ✓ Ac hétérophiles

Quelques chiffres sur les interférences

La spectrométrie de masse

- ✓ Avantages
- ✓ Inconvénients

Immunoessai versus spectrométrie de masse

Immunoessai versus spectrométrie de masse

Cortisol

- ✓ Diagnostic d'insuffisance surrénalienne (Endocrine Society):

 - Mesure du cortisol total sanguin après un test de stimulation à l'ACTH (250 µg)

 - Mesure du cortisol total sanguin et de l'ACTH à 8h du matin

- ✓ Tests de screening pour un syndrome de Cushing:

 - Cortisol libre urinaire ñ collecte de 24h (2 collectes différentes)

 - Cortisol salivaire de minuit (2 collectes différentes)

 - Cortisol total sanguin après test de suppression à la dexaméthasone



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Cortisol urinaire de 24h



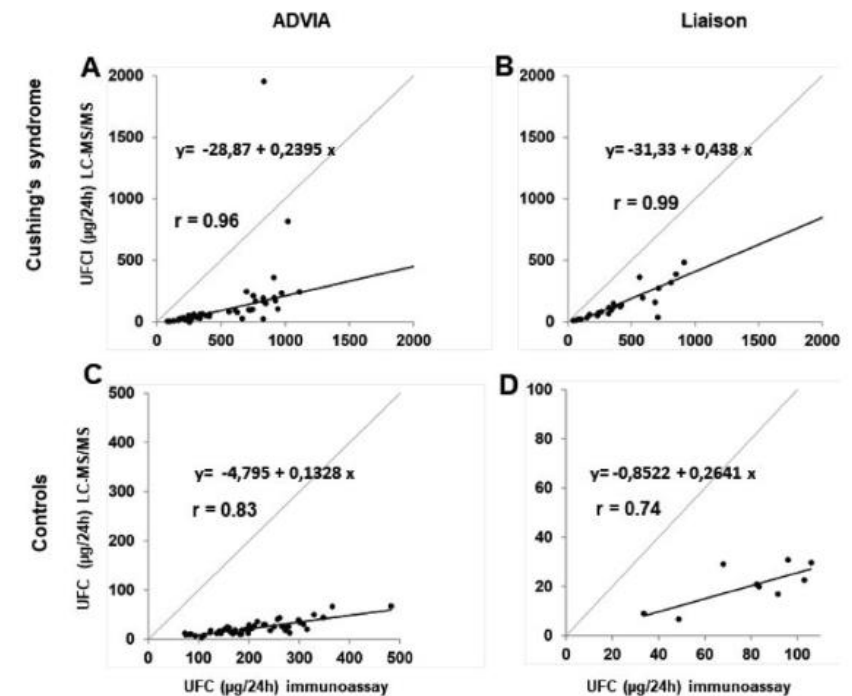
- ✓ Intègre les variations circadiennes de la cortisolémie
- ✓ Reflet de la forme libre, bioactive



- ✓ Incompliance
- ✓ Risque de collecte incomplète

Recommandation de la spectrométrie de masse

- ✓ Spécificité +++, réactivité croisée avec métabolites endogènes ou exogènes (Osswald et al, 2019)



Immunoessai versus spectrométrie de masse

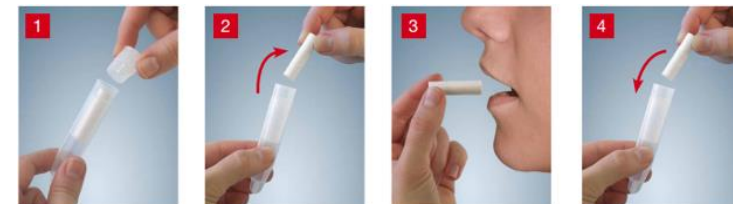
Cortisol salivaire



- ✓ Reflet de la forme libre, bioactive
- ✓ Production par diffusion à travers les cellules des glandes salivaires
- ✓ Concentration non affectée par le débit salivaire ou la présence d'enzymes salivaires (Nalla et al, 2015)
- ✓ Prélèvement non invasif

Recommandation de la spectrométrie de masse (Taylor et al, 2015)

- ✓ Spécificité +++, sensibilité +++
- ✓ Mesure simultanée du cortisol et de la cortisone



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Delta-4 androstènedione (D'Aurizio & Cantu 2018):

- Techniques immunologiques versus MS/MS: surestimation d'environ 10 à 20%

17-OH progestérone:

- Techniques immunologiques versus MS/MS: surestimation, pourcentage impacté par le moment de prélèvement (réactivité croisée avec progestérone, 11-déoxycortisol, pregnenolone, etc.)

Oestradiol

- Techniques immunologiques: critères de performances acceptables (suivi des ε en PMA ou diagnostic des tumeurs oestrogéno-dépendantes)
- Nécessité d'atteindre une limite de quantification basse dans certaines conditions (enfants, hommes et femmes sous inhibiteurs de l'aromatase)

Testostérone (Taylor et al, 2015)

- Faible sensibilité des immunoessais dans les valeurs basses (valeurs normales chez l'enfant et la femme)



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Thyroglobuline

- Glycoprotéine (660 kDa)
- Suivi des patients avec carcinome différencié de la thyroïde
- Molécule fortement hétérogène!!!

Epissage différent de l'ARNm codant pour la Tg

Différences au niveau des modifications post-traductionnelles (glycosylation, contenu en acide sialique, sulfatation et iodation)



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Thyroglobuline

○ Tests immunologiques hautement sensibles (D'Aurizio & Cantu 2018)

TABLE IV.—Analytical performance characteristics of some commercially current thyroglobulin assays as quoted by manufacturers. All methods are standardized with the Certified Reference Material BCR[®] 457 and use µg/mL.

Manufacturer	Platform	Technology	LoD* (µg/L)	LoQ*/FS** (µg/L)	Hook effect (µg/L)	Reference range (µg/L)
Beckman-Coulter	DxI	CLIA	0.1	Not declared	40,000	1.59-50.03
Diasorin	Liaison	CLIA	0.2	FS: 1.0	137,000	0.2-70
Roche Diagnostics	Cobas-Elecsys	ECLIA	0.04	LoQ: 0.1 (Total CV≤30%)	120,000	3.5-77
Siemens Healthineers	IMMULITE 2000 XPi	CLIA	0.2	FS: 0.9	500,000	1.6-59.9
SNIBE	Maglumi	CLIA	0.1	FS: 0.8	Not declared	<55
Thermo Fisher Scientific	Kryptor	TRACE	0.09	LoQ:0.17 FS: 0.15	200,000	1.6-61.3
BRAHMS						
Tosoh Bioscience	AIA-2000	FIA	0.09	Not declared	Not declared	2.68-33.2
Tosoh Bioscience	AIA-CL2400	CLEIA	0.029	LoQ: 0.052 (Total CV≤10%)	Not declared	3.4-53.2

CLIA: chemiluminescence immunoassay; CLEIA: chemiluminescence enzyme immunoassay; CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute; ECLIA: electrochemiluminescence immunoassay; FIA: fluoroimmunoassay; FS: functional sensitivity; M: manufacturer; NACB: National Academy of Clinical Biochemistry; TRACE: time resolved amplified cryptate emission.

*LoD and LoQ are defined by the CLSI protocol EP17-A;¹¹ **FS is defined by NACB protocol as Tg concentration with total CV ≤20%.^{68, 74}



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Thyroglobuline

○ Tests immunologiques

- ✓ Variabilité inter-méthode élevée: épitopes différents reconnus, standardisation (BCR457: variabilité inter-méthode $\pm 30\%$) (D'Aurizio & Cantu 2018)

Table 1

Data from UKNEQAS Serum Thyroglobulin Survey. Sample 76A consisted of normal pooled serum spiked with serum from a patient with thyroid cancer to obtain sufficient material for distribution in the scheme.

ALTM (all laboratory trimmed mean). Outliers are trimmed from both tails of the ranked data set, with a corrected estimate of dispersion (SD or CV) usually by the method of Healy [102] to allow for the removal of extreme values which are not 'true' outliers. SD and CV calculated for groups with more than 6 participants.

Sample 76A	Number of laboratories	Mean Tg ($\mu\text{g/L}$)	S.D.	CV (%)
Beckman Access/Dxl	6	21.6	0.7	3.1
Brahms Tg Plus	4	21.9		
BYK Liaison	1	11.1		
DPC Immulite	1	9.6		
DPC Immulite 2000/2500	28	9.0	1.2	13.3
Genesis Diagnostics	1	16.1		
In-house RIA	2	18.7		
Roche Elecsys	5	32.2		
Wallac DELFIA	1	0.3		
All methods [ALTM]	50	13.9	8.0	57.6

Immunoessai versus spectrométrie de masse

Thyroglobuline

- Tests immunologiques impactés par la présence d'anticorps anti-Tg
 - ✓ Présence des anti-Tg chez 10 à 30% des patients suivis (Katrangi et al, 2017)
 - ✓ Impact variable selon le test
 - ✓ Faible corrélation entre le degré d'interférence et le taux d'anticorps



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Techniques par spectrométrie de masse:

- Solution potentielle pour l'interférence liée aux anti-Tg (digestion enzymatique d'une Tg immuno-capturée)
- Technique longue (procédure d'extraction et digestion par trypsine)
- Limite de quantification supérieure par rapport aux techniques immunologiques (MS/MS: entre 0,5 et 1 $\mu\text{g/L}$) (Azmal et al, 2017)
- La détermination de la Tg par MS/MS améliore-t-elle la prise en charge des patients avec anti-Tg?



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Hepcidine-25: molécule clef dans la régulation systémique du fer (Pigeon et al, 2001)

Techniques de spectrométrie de masse:

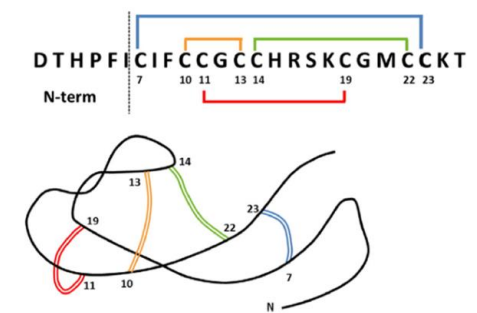
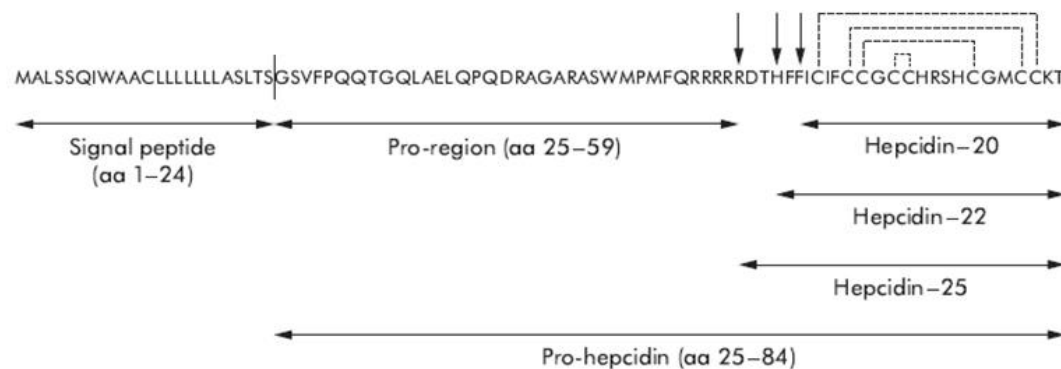


✓ Absence de réactivité croisée avec les isoformes 20 et 22



✓ Techniques de spectrométrie de masse: Etude « Round Robin » → forte hétérogénéité des concentrations en hepcidine pour les méthodes immunologique et les méthodes utilisant la spectrométrie de masse (Kroot et al, 2012)

✓ Absence de matériel de référence



Immunoessai versus spectrométrie de masse

Conclusions:

- Tests immunologiques:

Précautions prises par les firmes pour limiter les interférences

Une sensibilité analytique meilleure est parfois requise dans certaines conditions cliniques



- Tests spectrométrie de masse

Sensibilité, spécificité +++

Plus compliqué à mettre en pratique pour les analyses à haut débit

Nécessité d'une validation et standardisation optimales!



Merci pour votre attention