

LES PROBLÈMES DE RÉACTIVITÉ CROISÉE ET D'INTERFÉRENCES HÉTÉROPHILES DANS LES TESTS IMMUNOLOGIQUES.

Raymond Lepage, PhD, FCACB
 Biochimiste clinique
 CHUM Hôpital Saint-Luc
 1058 rue Saint-Denis
 Montréal, QC, Canada
 H2X 3J4
 raymond.lepage.chum@ssss.gouv.qc.ca

INTRODUCTION

Au printemps 2004, Cole et Khanlian ont décrit, dans *Clinical Biochemistry*, 58 cas d'interférence dans le dosage de la bêta-hCG totale qui avaient été soumis au *USA hCG Reference Service* entre 1998 et 2003 (1). Le Tableau 1 résume les conséquences médicales de 47 de ces résultats erronés, résultats tous obtenus sur l'analyseur AxSym de la compagnie Abbott. Au total, 85 % des patientes avaient reçu un traitement médical inapproprié allant du traitement standard de la grossesse ectopique (dilatation et curetage accompagnés d'un traitement au méthotrexate) à des interventions beaucoup plus invasives et irréversibles : hystérectomie (5 cas), polychimiothérapie (4 cas) dont 1 cas évoluant en coma diabétique suite à la destruction du pancréas, et salpingo-oophorectomie bilatérale (3 cas). Une des patientes avait même subi une thoracotomie dans le but de rechercher d'éventuelles métastases. L'article de Cole et Khanlian (1) montre que, même en l'absence de données de confirmation indépendantes, certains cliniciens accordent énormément d'importance à des résultats de dosage anormaux répétés chez leurs patientes. Les auteurs ont démontré que la vaste majorité de ces erreurs étaient dues à la présence d'anticorps hétérophiles dans le sérum des patientes, un des principaux types d'interférences affectant les essais immunologiques.

Les méthodes de dosage basées sur l'utilisation d'anticorps en tant que réactifs, appelées essais immunologiques ou immunoessais, ont pris une place considérable dans l'arsenal des tests diagnostiques. Qu'il s'agisse de tests de routine ou d'analyses plus complexes, on peut voir au Tableau 2 que toutes les spécialités du laboratoire les utilisent à grande échelle. Et ce n'est pas surprenant ! Dans un éditorial accompagnant l'article de Cole et Khanlian, E.P. Diamandis rappelle que les essais immunologiques sont des tests remarquables capables de mesurer, avec une grande spécificité, d'infimes concentrations d'une substance de l'ordre du ng/L dans un mélange de plusieurs centaines de milliers de molécules différentes dont la concentration totale est de l'ordre de 10^{11} ng/L (2). À une autre échelle, c'est comme si une technique permettait de repérer à coup sûr un individu unique dans l'ensemble de la population du globe (6×10^9 habitants) ! Mais Diamandis rappelle également que malgré ce pouvoir extraordinaire, les essais immunologiques ne sont pas parfaits et, même si elles sont relativement rares, des interférences de toute nature peuvent les affecter.

Compte tenu de la popularité toujours grandissante des essais immunologiques dans les laboratoires et des volumes de requêtes d'analyses de plus en plus élevés, **il est hautement improbable qu'au cours de sa vie un individu subissant des tests de**

laboratoire n'ait aucun dosage utilisant des anticorps comme réactifs. Il est par conséquent très probable qu'un nombre grandissant d'individus présenteront des résultats de dosages sujets à une interférence.

Tableau 1

Interventions médicales suite à des faux résultats positifs obtenus au dosage de la bêta-hCG totale. D'après Cole et Khanlian (1).

| | |
|---|-------------|
| • Dilatation et curetage | 79 % |
| • Méthotrexate | 70 % |
| • Laparoscopie | 45 % |
| • Actinomycine D | 19 % |
| • Hystérectomie | 11 % |
| • Polychimiothérapie | 9 % |
| • Salpingo-oophorectomie bilatérale | 6 % |
| • Thoracotomie | 2 % |
| Total des cas avec intervention: | 85 % |

Je vous présente ici une brève revue des deux principaux types d'interférences analytiques affectant les essais immunologiques, soient l'hétérogénéité moléculaire et les anticorps hétérophiles, de même que certains moyens dont on dispose pour identifier et corriger ces interférences.

PRINCIPES DE BASE DES ESSAIS IMMUNOLOGIQUES

Les essais immunologiques couramment utilisés dans les laboratoires sont généralement de trois types : immuno-compétitifs, immunométriques et immunoturbidimétriques (ou néphélométriques). Les interférences les plus courantes affectant ces essais proviennent de l'hétérogénéité moléculaire et de la réactivité croisée, de la présence d'anticorps hétérophiles, d'interactions avec le système indicateur, d'effets de matrice ou d'effet crochet. Comme certaines de ces interférences se manifestent différemment selon le principe de base de chaque technique, nous allons tout d'abord rappeler brièvement les différents principes de mesure.

Essais immunocompétitifs

Les essais immunocompétitifs (Figure 1a), comme le traditionnel RIA, sont basés sur une **compétition** entre la molécule à mesurer

(l'antigène) et un analogue marqué de cette molécule pour la liaison avec un nombre limité d'anticorps. Les éléments les plus importants de l'essai compétitif sont l'affinité de l'anticorps et sa concentration limitante. Pour que le système fonctionne, l'anticorps doit en effet avoir une **haute affinité** pour la molécule à mesurer afin d'obtenir une sensibilité adéquate et diminuer ainsi tous les types d'interférences. De plus, l'anticorps doit être présent en **concentration limitante**, généralement calculée de façon à ne pouvoir lier que 20 à 50 % de l'antigène marqué (en absence de l'antigène à mesurer).

Tableau 2

Principaux tests immunologiques

| | |
|--|---|
| Médicaments | acétaminophène, digoxine, gentamicine, cyclosporine, etc. |
| Drogues | cannabis, cocaïne, benzodiazépines, etc. |
| Marqueurs cardiaques | troponines, myoglobine, CK-MB, BNP |
| Hormones | TSH, T ₄ libre, cortisol, PTH, hCG, etc. |
| Marqueurs du cancer | PSA, CEA, AFP, etc. |
| Protéines spécifiques | transferrine, IgG, IgA, IgM, etc. |
| Marqueurs du diabète | HbA _{1c} , microalbumine |
| Vitamine D, téllopeptides, phosphatase alcaline osseuse | |
| Sérologie | hépatites, rubéole, HIV, etc. |
| Anticorps anti-tissulaires | anti-ADN, FI, LKM, TPO, etc. |
| Facteurs de coagulation | D-dimères, protéine C, protéine S, etc. |

On reconnaît un essai immunométritif à l'allure de sa courbe d'étalonnage : une hyperbole représentant une relation inversement proportionnelle entre le signal et la concentration de l'antigène à mesurer (Figure 1b). Bien que capables de mesurer

des molécules de toutes tailles, les essais immunométritifs sont aujourd'hui le plus souvent réservés aux petites molécules (< 5000 daltons) dont la taille ne permet pas la présence de deux épitopes distincts nécessaires à la production des deux anticorps utilisés dans les essais immunométriques de type sandwich. Plusieurs types de traceurs ont été utilisés pour les essais immunométritifs : radioactif, fluorescent, chimiluminescent, enzymatique, etc.

En général, les essais immunométritifs manuels ou automatisés nécessitent, après une période d'incubation, la séparation de la fraction du traceur lié à l'anticorps de la fraction non liée. Cette séparation peut se faire de plusieurs façons dont l'utilisation d'un deuxième anticorps ou d'un agent de précipitation ou encore via la liaison de l'anticorps à une surface solide (paroi d'un tube, microparticules, billes magnétiques, etc.). Quelques versions automatisées d'essais immunométritifs, dédiés surtout aux dosages de médicaments et drogues, utilisent une technique dite homogène qui ne nécessite pas la séparation des fractions liée et libre : inhibition de polarisation de fluorescence, inhibition de l'amplification enzymatique (EMIT[®]) ou de la turbidimétrie amplifiée par des microparticules, système enzyme-donneur/accepteur (CEDIA[®]) et autres. Tous les systèmes indicateurs utilisés dans les essais immunométriques peuvent être eux-mêmes la source d'interférences méthodologiques (biotine alimentaire, présence de radioisotopes, activité enzymatique endogène anormale, etc.).

On peut donc résumer les essais compétitifs comme étant des réactions utilisant, pour la réaction première, un seul anticorps à haute affinité et en quantité limitée.

Essais immunométriques

Il existe plusieurs variantes des essais non compétitifs ou immunométriques : sandwich, détection d'anticorps utilisant des antigènes liés à une phase solide, etc. Au laboratoire, on les retrouve sous plusieurs formes dont les essais en phase liquide, les ELISA en microplaques, les essais immunonéphélo- ou immunoturbidimétriques, etc. Sauf pour ces deux derniers, les essais immunométriques utilisent le plus souvent deux anticorps

Figure 1
Essais immunométritifs

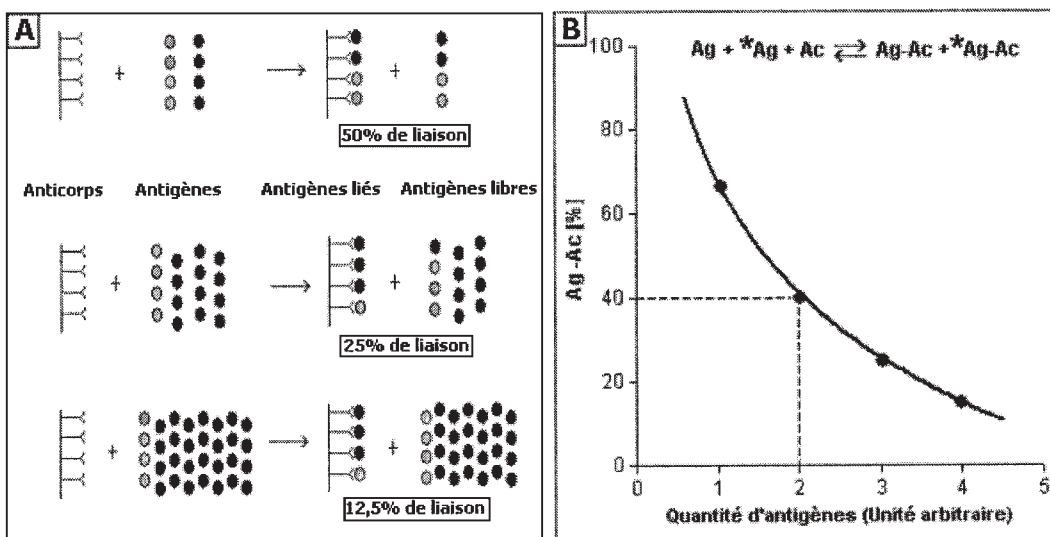
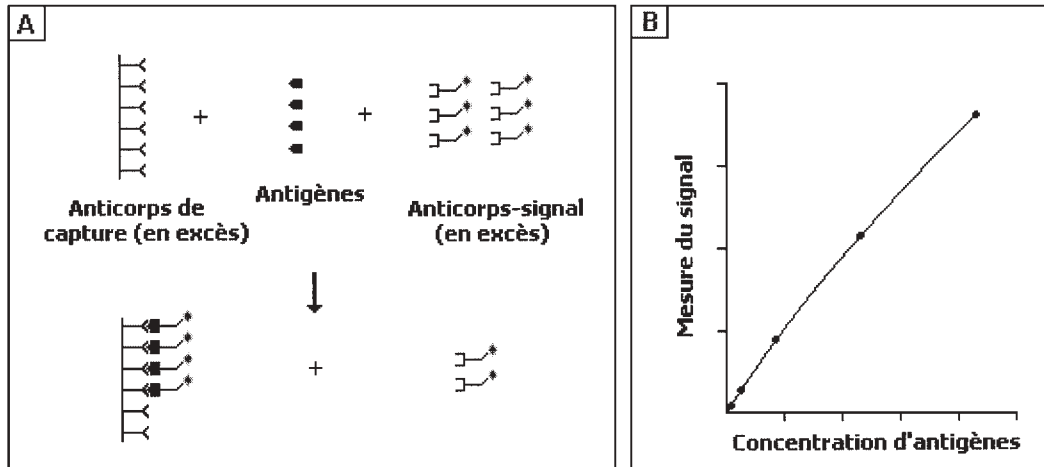


Figure 2
Essais immunométriques

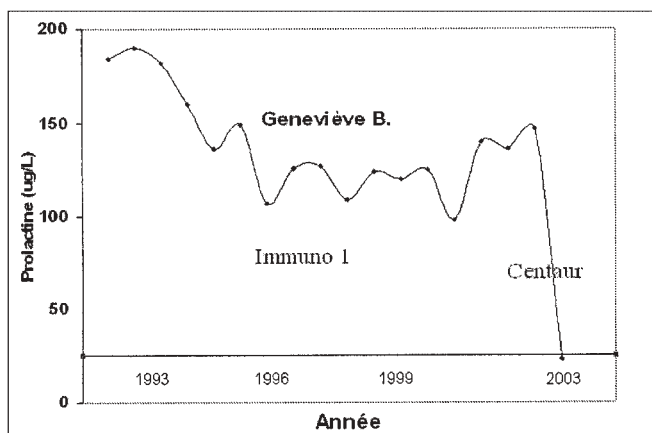


dont un servira à « immuno-extraire » l'antigène d'intérêt (anticorps de capture) et le second servira à le révéler (anticorps-signal) (Figure 2a). La liaison des deux anticorps à l'antigène à mesurer forme un sandwich lié le plus souvent à une phase solide par l'anticorps de capture. Après élimination des molécules d'anticorps-signal n'ayant pas réagi, différents systèmes de détection mesurent le signal lié à la phase solide (radioactivité, fluorescence, chimiluminescence, activité enzymatique, etc). Dans la grande majorité des cas, ces systèmes utilisent une phase solide avec grande surface de contact pour faciliter la rencontre entre l'anticorps de capture et l'antigène. Dans ce type de technique, les anticorps sont donc présents en excès par rapport à l'antigène et ces anticorps sont de moindre affinité que ceux retrouvés dans les essais immunocompétitifs. Les systèmes de type sandwich utilisant deux anticorps dirigés contre des épitopes distincts du même antigène sont évidemment réservés aux grosses molécules (> 5 000 daltons).

réponse paradoxalement basse en présence de concentrations très élevées de l'antigène à mesurer.

Les essais immunonéphélométriques et immunoturbidimétriques sont également des essais de type non compétitif mais utilisant un seul anticorps. Au lieu d'utiliser un anticorps-signal, la formation des complexes antigène-anticorps est suivie par la mesure du changement de la diffraction de la lumière par le milieu réactionnel (directement ou avec amplification) causé par la modification de la taille de ces complexes. Ces essais destinés à mesurer des concentrations de composants de l'ordre du milligramme sont les plus résistants aux interférences de toutes sortes. Cependant des titres élevés d'anticorps anti-animaux ou de facteur rhumatoïde vont occasionnellement causer des problèmes.

Figure 3
Guérison miraculeuse au CHUS



Les essais immunométriques à deux anticorps sont plus sensibles et plus spécifiques que les essais compétitifs. Comme leur plage d'utilisation couvre généralement trois ordres de grandeur et plus, ils sont aussi plus pratiques (moins de reprises sur dilution). A noter cependant que la présence de deux anticorps de faible affinité rendra ce type d'essai beaucoup plus susceptible aux interférences hétérophiles. Finalement, seuls les essais immunométriques seront sujets au phénomène d'effet crochet qui se traduit par une

RÉACTIVITÉ CROISÉE ET HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE

La Figure 3 illustre l'évolution des dosages de prolactine chez une jeune patiente suivie pendant plusieurs années au CHUS. Dès son adolescence, ses résultats de prolactine étaient anormalement élevés, fluctuant entre 4 et 6 fois la limite supérieure des valeurs de référence. Cette jeune femme a subi de nombreux examens complémentaires qui n'ont jamais confirmé la présence d'un prolactinome. Entre 1992 et 2003, les dosages de prolactine étaient effectués sur un analyseur Immuno1 de la compagnie Bayer. Le taux de prolactine est « miraculeusement » revenu à la normale en 2003 lorsque le laboratoire a changé son analyseur pour un autre (Centaur) de la même compagnie ! La Figure 3 illustre un des nombreux cas de « macroprolactinémie » rapportés dans la littérature dont plusieurs, contrairement au cas de cette jeune patiente, ont souvent résulté en traitements agressifs (explorations, médication, chirurgie). Ce cas me permet d'introduire le sujet des interférences dues à la réactivité croisée et à l'hétérogénéité moléculaire.

Réactivité croisée

On appelle « réactivité croisée » la capacité de molécules distinctes de réagir avec un même anticorps. Ces molécules ont généralement une fonction biologique différente mais réagissent avec l'anticorps d'un dosage parce qu'elles ont des structures chimiques globales similaires (les stéroïdes par exemple) ou des épitopes semblables à celui utilisé pour obtenir un des anticorps du

dosage (par exemple, la sous-unité alpha commune à la TSH, la FSH, la LH et l'hCG). On peut inclure dans ce groupe la réactivité croisée de métabolites inactifs de médicaments ou encore de fragments inactifs de certaines protéines (PTH par exemple) ou les complexes de certaines hormones avec des anticorps circulants lorsque ces formes sont inactives. Les phénomènes de réactivité croisée sont responsables d'une surévaluation de l'antigène recherché.

Les molécules à réactivité croisée réagissent de façon variable avec l'anticorps. Le plus souvent, elles vont réagir moins fortement que l'antigène principal, mais il y a des exceptions : le fragment inactif hPTH(7-84) de la parathormone humaine réagit de façon équimolaire à l'hormone native hPTH(1-84) dans plusieurs dosages commerciaux (3). Certains métabolites de médicaments peuvent parfois réagir plus fortement que le médicament actif. Comme conséquence, il y a le plus souvent perte de la relation entre le résultat numérique du test et la concentration physiologiquement active du composé d'intérêt.

Tableau 3

Réactivité de la macroprolactine : moyennes selon les méthodes pour un spécimen contenant 93 % de macroprolactine et 7,1 µg/L de prolactine monomérique. (Clin Chem 2000;46:2022-3)

| Méthode | N labos | Moyenne µg/L |
|-------------------|---------|--------------|
| Beckman Access | 5 | 22,5 |
| Bayer Centaur | 7 | 24,6 |
| Bayer ACS 180 | 63 | 25,7 |
| BioChem MAIAclone | 2 | 36,8 |
| Randox ELISA | 1 | 32,8 |
| Roche Cobas Core | 2 | 46,5 |
| Ortho Vitros Eci | 1 | 53,4 |
| Roche Enzymun | 14 | 61 |
| DPC Immulite 2000 | 2 | 62,1 |
| DPC Immulite | 9 | 62,5 |
| Wallac DELFIA | 22 | 72 |
| Bayer Immuno-1 | 42 | 90,8 |
| J & J Amerlite | 2 | 93,1 |
| Abbott AxSYM | 57 | 95,3 |
| Abbott IMx | 8 | 109 |
| Tosoh AIA | 4 | 119 |
| Roche Elecsys | 12 | 143,1 |

Comme l'indiquent les Tableaux 3 et 4, les problèmes de réactivité croisée varient énormément selon les systèmes analytiques. Le Tableau 3 extrait d'un article paru dans *Clinical Chemistry* (4) montre la variation dans les résultats obtenus par des laboratoires britanniques pour un spécimen de contrôle externe contenant 93 % de macroprolactine et 7,1 µg/L de prolactine monomérique. Parmi les 17 systèmes analytiques testés, les résultats ont varié de 22,5 à 143,1 µg/L, soit un écart de 6,4 fois. L'analyseur Immuno1 réagissait 3,7 fois plus à la macroprolactine que le Centaur, confirmant les résultats observés pour la patiente du CHUS. Ce ratio peut évidemment varier selon les caractéristiques moléculaires de la macroprolactine propre à chaque individu.

La macroprolactine serait responsable d'environ 20 % des cas de prolactine élevée (5). Idéalement, tous les résultats élevés devraient être confirmés par reprise de l'analyse après précipitation au polyéthylène glycol ou ultrafiltration. Le Tableau 3 indique cependant que certains systèmes analytiques sont peu affectés par la présence de macroprolactine. En cas de doute, il sera souvent plus facile de simplement faire confirmer un résultat douteux dans un laboratoire utilisant une des techniques à faible réactivité croisée.

Le Tableau 4 est extrait d'un article publié par Stanczyk et al. dans *Steroids* en 2003 (6). Ces auteurs ont comparé pour 30 spécimens les taux d'œstradiol mesurés par 5 essais immunologiques automatisés et 4 essais radioimmunologiques manuels dont un incluait une étape d'extraction organique. Ils ont comparé ces résultats à leur essai RIA « conventionnel » impliquant une extraction organique et une chromatographie de partition sur mini-colonne de Célite. Les auteurs ont démontré que seul le RIA commercial avec extraction organique donnait des résultats similaires à leur méthode « conventionnelle ». Le Tableau 4 montre certaines différences observées entre les 5 techniques automatisées pour une douzaine de spécimens. Des variations de taux jusqu'à 12 fois ont été observées démontrant le manque de robustesse des systèmes automatisés devant les problèmes de réactivité croisée.

De plus les laboratoires n'utilisent pas toujours les essais immunologiques uniquement dans le contexte pour lequel ils ont été validés. Un exemple fréquent est l'utilisation d'un automate pour le dosage du cortisol urinaire. Les données de réactivité croisée indiquées sur les feuillets méthodologiques du dosage du cortisol n'indiquent qu'une très faible probabilité de réactivité croisée pour la série de molécules testées. Or, si cette liste fait du sens pour le sérum, il en est tout autrement pour les urines où les dérivés glucuronidés et sulfatés représentent souvent plus de 80 % du spécimen ! Aucun de ces dérivés n'a été testé par le fabricant de la trousse de dosage ! On peut contourner une bonne partie du problème en réalisant une extraction préalable de l'urine avec un solvant organique. Ce ne sera pas toujours suffisant et la meilleure façon de contourner le problème de réactivité croisée sera de recourir à l'analyse par HPLC (7).

Hétérogénéité moléculaire

L'hétérogénéité moléculaire résulte pour sa part de la présence de plusieurs formes actives de la molécule d'intérêt : isotopines ou isoformes résultant de modifications post-transcriptionnelles (ex. formes hyperglycosylées de l'hCG) ou de la formation de dimères actifs (prolactine). On peut également inclure dans cette classe les métabolites actifs de certains médicaments dont le dosage doit être inclus avec celui de la drogue-mère. À moins que les formes hétérogènes de l'antigène réagissent de façon équimolaire comparativement à l'antigène d'intérêt, l'hétérogénéité moléculaire résulte en une sous-évaluation de la quantité totale de l'antigène recherché.

ANTICORPS HÉTÉROPHILES

Dans le contexte des immunoessais, un anticorps hétérophile provient d'une source (humaine) autre que celle de l'anticorps (ou des anticorps) utilisé dans le dosage (souris, lapin, cobaye, chèvre...) et est capable de réagir avec ce(s) dernier(s). On distingue différents types d'anticorps hétérophiles dont les

anticorps humains anti-animaux, le facteur rhumatoïde et les anticorps humains anti-idiotypes. La Figure 4 illustre que ces différents anticorps ne réagissent pas avec la même portion de l'IgG animale des trousse de réactifs, les anticorps anti-animaux et le facteur rhumatoïde réagissant avec la portion Fc de l'anticorps, les anticorps anti-idiotypes réagissant plutôt avec les portions Fab.

Il existe d'autres différences entre les anticorps anti-animaux et le groupe des anticorps anti-idiotypes et du facteur rhumatoïde. Les anticorps anti-animaux sont des anticorps spécifiques produits chez des individus suite à leur exposition à des préparations d'origine animale (morsure, contact prolongé avec des animaux, injection d'immunoglobulines animales à des fins médicales). Ces anticorps sont dirigés spécifiquement et souvent avec grande affinité contre les protéines de l'espèce animale en cause. Dû à cette affinité élevée, les anticorps anti-animaux sont susceptibles d'interférer dans tous les types d'essais immunologiques incluant les tests immunonéphélométriques et immunoturbidimétriques. Cependant, comme ils sont dirigés vers une source animale spécifique, il sera plus facile de bloquer ce type d'interférence en ajoutant aux réactifs des protéines sériques de même source animale que celle des anticorps de dosage.

Tableau 4

Réactivité comparée de 5 essais automatisés pour l'oestradiol (pmol/L). Extrait de Stanczyk FZ et al. Steroids 2003;68:1173-8.

| EIA 1 | EIA 2 | EIA 3 | CIA 1 | CIA 2 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 44 | 257 | 73 | 44 | 37 |
| 48 | 114 | 73 | 44 | 70 |
| - | 143 | 73 | 44 | 37 |
| 37 | 106 | 73 | 44 | 117 |
| 114 | 92 | 110 | 59 | 59 |
| 62 | 103 | 73 | 73 | 81 |
| 44 | 158 | 117 | 44 | 117 |
| 37 | 139 | 73 | 44 | 151 |
| 73 | 253 | 268 | 92 | 268 |
| 73 | 184 | 73 | 66 | 51 |
| 154 | 264 | 264 | 92 | 176 |
| 211 | 253 | 191 | 103 | 184 |

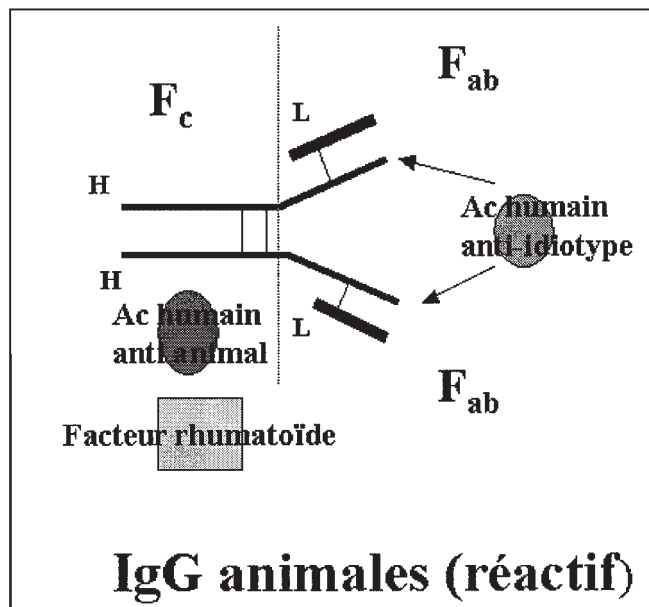
Au contraire des anticorps anti-animaux, les anticorps anti-idiotypes et le facteur rhumatoïde sont des anticorps naturels non spécifiques présents chez tous les individus. Certains types sont par ailleurs plus spécifiquement associés aux maladies autoimmunes. Comme ils ne sont pas le résultat d'une exposition à des protéines hétérophiles, ces anticorps ne sont spécifiques à aucune espèce animale en particulier et seront le plus souvent de faible affinité. Pour cette raison, ils sont plus susceptibles d'interférer avec les essais immunométriques qui utilisent justement des anticorps de faible affinité plutôt qu'avec les essais immunocompétitifs. À cause de la faible spécificité de ces anticorps pour un antigène particulier, il sera plus difficile de bloquer leur interférence en ajoutant des protéines animales au milieu réactionnel. Il faudra souvent utiliser des protéines

provenant de plusieurs sources animales et souvent même ces mélanges de protéines ne suffiront pas à éliminer le problème.

Le cas d'une patiente d'une cinquantaine d'années de Nicolet dont le dosage d'oestradiol avait été acheminé au laboratoire du CHUS illustre ce type d'interférence. Après obtention d'un résultat extrêmement élevé d'oestradiol au CHUS (10 000 pmol/L, trousse RIA manuelle directe de Diagnostic Products Corporation) et en absence de toute autre explication à l'histoire et à l'examen cliniques, la patiente fut référée au CHUM pour investigation d'un potentiel cancer ovarien sécréteur. Après une semaine d'investigations variées, les cliniciens ont obtenu un résultat d'oestradiol de 150 pmol/L avec la technique utilisée au CHUM (CIA compétitif sur Centaur). Ce résultat était beaucoup plus compatible avec la valeur attendue chez une femme ménopausée (<163 pmol/L) et indiquait la présence d'une interférence avec la méthode RIA. Celle-ci aurait pu provenir d'anticorps anti-lapin présents dans le sérum de la patiente. La technique du Centaur utilise également des anticorps de lapin anti-oestradiol mais contient également des anticorps monoclonaux de souris anti-IgG de lapin en excès. Il est possible que ces derniers ou un mélange d'agents bloquants ajoutés aux réactifs aient neutralisé les

Figure 4

Sites de liaison des anticorps hétérophiles.



anticorps circulants anti-lapin de la patiente. Par ailleurs, on ne peut complètement exclure la présence chez cette patiente d'anticorps polyvalents ou anti-idiotypes mais avec, par hasard, une constante d'affinité étonnamment élevée pour les IgG de lapin. L'interférence rapportée chez cette patiente semble stable puisqu'un contrôle acheminé à Sherbrooke un an plus tard a donné un taux d'oestradiol toujours de l'ordre de 10 000 pmol/L.

De telles interférences sont régulièrement rapportées dans la littérature médicale (8). Un autre cas a été observé au CHUS pour un patient de Victoriaville dont le taux de testostérone très élevé et reproductible mesuré par essai RIA compétitif (Diagnostic Systems Laboratories Inc.) avec anticorps de lapin apparaissait cliniquement impossible chez un patient de 75 ans. Devant la nature suspecte de ce résultat, nous avons fait contrôler le dosage et avons obtenu un résultat tout à fait normal par une autre technique (Roche Elecsys, dosage immunocompétitif avec anticorps de souris).

Dans un essai immunocompétitif (Figure 1a), le système mesure strictement le signal (la radioactivité ou autre) lié à l'anticorps de mesure tapissant les parois du tube dans le cas des essais DPC et DSL utilisés ci-haut. Comme la courbe réponse est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène (Figure 1b), toute substance empêchant la liaison du traceur à l'anticorps, comme la présence d'anticorps anti-animal, entraînera un signal bas et par conséquent un résultat de dosage élevé.

Tableau 5

Immunoglobulines d'origine animale utilisées en médecine.

- OKT3 - anti-CD3 (anti-rejet de greffon)
- Herceptin - anti-Her-2/Neu cancer du sein
- Rituxan - lymphome non-hodgkinien
- ReoPro - anti-aggrégation plaquettaire
- Synagis - anti-virus respiratoire syncytial
- Remicade - anti-TNF α - R.A., Crohm
- Digibind - Fab anti-digoxine

Il ne faut pas oublier que les anticorps anti-animaux vont à plus forte raison interférer avec les essais immunométriques. Or, s'il n'y a pas de raison apparente pour que le nombre de sujets mordus par des animaux ou en contact prolongé avec des animaux augmente, l'usage d'immunoglobulines animales à des fins médicales est pour sa part de plus en plus répandu. Le Tableau 5 fournit une liste de quelques-unes des préparations animales couramment utilisées en médecine au Québec et susceptibles de provoquer la formation d'anticorps anti-animal. À l'exception du Digibind qui contient des fragments Fab anti-digoxine de poulet, toutes les autres contiennent des anticorps monoclonaux de souris. Bien que ces préparations aient été « humanisées » pour diminuer le développement de réactions immunitaires chez les patients, elles peuvent être la source d'interférence potentielle dans les techniques immunométriques utilisant des anticorps de faible affinité. Ce sont ces dernières techniques qui ont connu les plus grands développements ces dernières années (marqueurs cardiaques, indicateurs de tumeur, hormones protéiques, etc.).

Nous assistons donc au développement simultané de techniques de dosage extrêmement sophistiquées et d'autres techniques diagnostiques ou thérapeutiques interférant avec les premières !

La Figure 5 illustre les possibilités d'interférence par les anticorps hétérophiles (toutes les variétés) dans les essais immunométriques à deux anticorps. Dans ce modèle d'essai de type sandwich avec l'anticorps de capture lié à une phase solide, le système mesure la quantité de signal lié à la paroi solide et assume que toute liaison a été causée par les molécules d'antigène. Cependant un anticorps capable de réagir à la fois avec l'anticorps de capture et l'anticorps signal (via les fragments Fab dans ce cas) va reproduire le sandwich attendu et donc créer une interférence positive dans le dosage. Il est cependant facile de concevoir qu'un anticorps interférant pourrait réagir seulement avec l'un ou l'autre des deux anticorps de l'essai et empêcher la formation du sandwich. Dans ce cas, l'interférence sera négative c'est-à-dire moins de signal lié à la phase solide. Le sens et l'importance des interférences dans les essais immunométriques sont donc imprévisibles ! La nature des choses fait que le plus

souvent, les cliniciens vont réagir à un résultat inapproprié bas ou élevé mais beaucoup plus rarement à un résultat faussement normal !

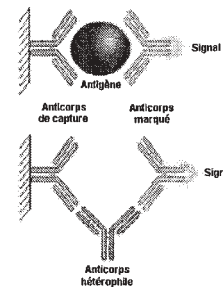
ANTICORPS POLYSPÉCIFIQUES ET ANTI-IDIOTYPES

Ce n'est que récemment que la communauté scientifique a commencé à élucider la nature de l'ensemble des anticorps interférant dans les essais immunologiques. Les anticorps anti-animaux ont été les premiers identifiés et leur origine facilement démontrée. Le facteur rhumatoïde est connu depuis de nombreuses années à cause de son association avec les maladies autoimmunes. Une troisième classe d'anticorps circulants comprendrait des anticorps naturels, c'est-à-dire ne résultant pas d'une exposition à des protéines animales hétérophiles. On retrouve parmi ces anticorps naturels, les anticorps polyspécifiques et anti-idiotypes.

Figure 5

Modèle d'interférences par les anticorps hétérophiles dans les essais immunométriques (Extrait du site Web de la compagnie Scantibodies Clinical Laboratory).

- Dans un essai immunométrique à 2 anticorps, les anticorps anti-animaux et hétérophiles vont interférer en créant un pont entre l'Ac de capture et l'Ac signal (réponse élevée) ou en neutralisant un ou les deux Ac empêchant leur réaction (réponse abaissée).



- Le sens et l'importance de l'interférence sont imprévisibles.

Les anticorps naturels sont des anticorps de faible affinité dirigés contre une grande variété de structures chimiques et d'autoantigènes présents chez tous les individus. Ces anticorps seraient produits de façon continue par les lymphocytes B qui ont la capacité innée de combiner des gènes pour produire une cinquantaine de millions d'anticorps de faible affinité à régions variables différentes. Lorsqu'une de ces nombreuses immunoglobulines rencontre un des antigènes avec lequel elle peut se lier, le système immun enclencherait une série d'événements menant à la production d'anticorps de plus en plus spécifiques et à haute affinité pour cet antigène. Donc, si la synthèse d'anticorps spécifiques à haute affinité ne peut se produire qu'après exposition à l'antigène, le système immun produit continuellement une grande variété d'anticorps naturels à faible affinité. Les autoanticorps associés aux maladies autoimmunes présentent souvent des caractéristiques de polyspécificité. Bien qu'ils soient également de faible affinité, les autoanticorps montrent un peu plus de spécificité et réagissent avec un profil plus limité de molécules que les anticorps naturels. On peut comprendre que des anticorps polyspécifiques naturels ou associés à une maladie auto-immune aient par hasard un certain potentiel de réactivité avec les protéines animales (l'anticorps) présentes dans les trousse de réactifs.

Les recherches des dernières années ont révélé qu'en plus du site de liaison de l'antigène, le fragment Fab contient un site particulier auquel d'autres anticorps peuvent se lier. Ce site antigénique se nomme idiotope et les anticorps capables de s'y lier des anticorps anti-idiotypes. Les liaisons entre idiotope et anticorps anti-idiotypes

pourraient servir de mécanisme de régulation du système immunitaire. Assez curieusement, les anticorps anti-idiotypes réagissent plus fortement dans un pool de sérums que dans un sérum individuel. Cette réaction pourrait s'expliquer par la présence dans un pool de sérums d'une plus grande variété d'idiotypes et donc d'idiotypes plus spécifiques pour les anticorps anti-idiotypes présents. Ceci est confirmé par l'observation au microscope électronique, que dans un pool de sérums, la très grande majorité des IgG se présentent sous forme de dimères reliés par liaison Fab-Fab (9). On peut donc comprendre le potentiel d'interférence de ces anticorps anti-idiotypes dans les systèmes immunométriques utilisant souvent des anticorps provenant de deux sources animales différentes et la difficulté de bloquer ces réactions ne connaissant pas les idiotypes visés.

Tableau 6

Caractéristiques de la trousse AxSym de dosage de la bêta-hCG.

- Anticorps de capture monoclonal de souris anti-bêta-hCG (non bloqué).
- Anticorps signal polyclonal de chèvre anti-bêta-hCG (non bloqué).
- Le diluant contient du sérum bovin et caprin.
- Seuls les spécimens avec résultat >1000 seraient dilués avec l'agent bloquant.

Le Tableau 6 montre les caractéristiques de la trousse AxSym responsable des faux positifs de bêta-hCG totale ayant entraîné les interventions médicales rapportées au Tableau 1. La trousse de réactif contiendrait des anticorps de capture de souris non bloqués et des anticorps-signal de chèvre non bloqués. C'est le diluant qui contiendrait les anticorps bloquants d'origine bovine et caprine. Or, selon les instructions accompagnant le produit, il semblerait que seuls les spécimens ayant des résultats supérieurs à 1000 U/L soient automatiquement dilués avec le diluant protecteur et non tous les spécimens. Cependant les résultats faussement positifs ayant conduit à des interventions médicales invasives étaient beaucoup plus bas que 1000 U/L. Une hystérectomie a même été pratiquée chez une patiente montrant des taux aussi faibles mais reproductibles de 17 U/L. Cole et Khanlian ont démontré qu'en diluant simplement de moitié les spécimens en cause avec le diluant de la trousse, ils avaient éliminé l'interférence dans 16 des 17 spécimens testés (1). La compagnie Abbott a cependant contesté ces observations (10).

Le cas d'une patiente de 65 ans de Trois-Rivières illustre bien le problème des interférences hétérophiles. Cette patiente avait été référée au CHUS pour un bilan thyroïdien atypique obtenu sur l'analyseur AxSym montrant une TSH à 18 mU/L accompagnée d'une T₄ libre à 18,4 pmol/L. Ces résultats étaient reproductibles et une revue rigoureuse de l'histoire et de la clinique ne conduisait à aucune explication rationnelle pour cette combinaison de résultats. La patiente a donc été référée à Sherbrooke pour investigation d'un potentiel cas très rare d'hyperthyroïdie secondaire ou encore de résistance aux hormones thyroïdiennes. Le bilan obtenu avec l'analyseur Immuno1 montrant une TSH à 0,53 mU/L pour une T₄ libre semblable à celle observée avec l'AxSym démontre plutôt un autre cas d'interférence par des anticorps hétérophiles dans le dosage de la TSH (essai immunométrique de type sandwich). Et il ne s'agit là qu'un des nombreux cas d'interférence rapportés dans les fort populaires tests de la fonction thyroïdienne.

Tableau 7

Techniques pour éliminer les interférences hétérophiles.

- **Par élimination des anticorps avant dosage**
Ultracentrifugation, protéine A ou G, chauffage à 90°C, TCA, éthanol ou polyéthylène glycol.
- **Par blocage non spécifique des anticorps pendant le dosage**
Globulines non-immunes, sérum animal (≥ 2 espèces) ou dilutions sériées avec ces mélanges.
- **Par blocage spécifique des anticorps pendant le dosage**
Immunoglobulines anti-Ac hétérophiles et HAMAs (IIR); IgG monoclonales de souris anti-IgM humaines (HBR)
- ...

FRÉQUENCE DES INTERFÉRENCES HÉTÉROPHILES

Fort heureusement, les interférences hétérophiles sont relativement rares parce que la plupart des essais commerciaux contiennent des agents bloquants assez efficaces. Les interférences résiduelles seraient de l'ordre de 0,05 %, beaucoup moins que les 10 % observés en absence d'agents bloquants (9). Un simple calcul effectué au CHUM montre cependant que cette très faible incidence n'est pas sans conséquence. En effet entre 600 000 et 1 000 000 de résultats sont produits annuellement au CHUM par divers essais immunologiques. Une proportion aussi faible que 0,05 % représente tout de même de 300 à 500 résultats incorrects par année ou 1 à 2 par jour ! Combien maintenant pour tout le Québec ?

DÉTECTION ET ÉLIMINATION DES INTERFÉRENCES HÉTÉROPHILES

Les interférences hétérophiles ne sont pas facilement repérables au niveau du laboratoire. Bien que ce type d'interférence puisse être identifié par la non concordance des résultats obtenus sur des dilutions sériées, seuls les spécimens avec des valeurs extrêmement élevées d'antigène sont sujets à une reprise sur dilution, encore plus rarement sur dilutions sériées. Même dans ce dernier cas, les dilutions seront parfois presque linéaires et le faux résultat transmis au médecin traitant avec en plus la mention « résultat contrôlé ». C'est donc le clinicien qui est le mieux placé pour mettre à jour ce type d'interférence, soit parce que le résultat ne colle pas avec la clinique ou bien que des résultats discordants ont été obtenus pour cette analyse dans différents laboratoires. Tel que mentionné précédemment, il est beaucoup plus difficile de détecter des faux résultats normaux que des résultats faussement élevés ou abaissés. Conséquemment, les patients avec un faux résultat normal seront diagnostiqués plus tardivement ou à partir d'autres techniques diagnostiques (imagerie, etc.). Comme le clinicien est le plus susceptible de détecter ces interférences, il faut que le personnel du laboratoire soit sensibilisé à leur existence et au fait qu'une simple révision des résultats du contrôle de qualité de l'analyse suspecte ne permet pas de les mettre à jour. Des résultats de contrôles interne et/ou externe rigoureusement dans les normes ne peuvent exclure la possibilité d'un résultat d'analyse

Tableau 8

Interférence variable des anticorps hétérophiles selon les techniques et instruments.

| Instrument | TSH mU/L | Anticorps utilisés | Volume d'échantillon | T ₄ libre pmol/L | Anticorps utilisés | Volume d'échantillon |
|-------------|----------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|
| AxSym | 18,08 | Souris (bille) et chèvre (conjugué) | 189 µL | 18,39 | Mouton | 55 µL |
| Access | 3,6 | Souris seulement | 110 µL | > 75 | Souris | 30 µL |
| Immuno-1 | 0,53 | Souris seulement | 55 µL | 21,3 | Souris | 5 µL |
| Elecsys | 0,64 | Souris seulement | 50 µL | 17,8 | Mouton | 15 µL |
| ECL (Ortho) | 9,95 | Souris seulement | 80 µL | 34,9 | Mouton | 25 µL |
| Centaur | 10,26 | Souris (conjugué) et chèvre (bille) | 200 µL | 25,8 | Lapin | 25 µL |

erroné ! Les conséquences potentiellement dramatiques d'un faux résultat devraient inciter les professionnels du laboratoire à une grande prudence lorsqu'un clinicien les consulte sur la signification clinique d'un résultat de laboratoire.

Les fabricants de produits diagnostiques ayant éliminé plus de 99 % des interférences hétérophiles, il est moins motivant pour les laboratoires d'ajouter localement des procédures lourdes d'élimination des interférences résiduelles. Le Tableau 7 montre que les techniques d'élimination de ce type d'interférence sont lourdes et qu'au mieux, elles pourront servir ponctuellement à éliminer une interférence probable. L'élimination avant le dosage des anticorps présents dans le spécimen par ultracentrifugation ou ajout de protéine A ou G (deux protéines extraites de bactéries et montrant une grande affinité pour la portion Fc des IgG) ne peut évidemment pas s'appliquer aux techniques de dosage d'anticorps. Le blocage non spécifique ou spécifique des anticorps pendant le dosage fonctionne bien mais n'est pas efficace dans tous les cas. Des préparations commerciales de mélanges neutralisants peuvent être utilisées mais il serait préférable de faire une courbe de dilution du spécimen avec ces substances neutralisantes pour identifier le maximum d'interférences.

Une des façons les plus simples d'identifier une interférence (à défaut de l'éliminer) consiste à faire effectuer le dosage du spécimen dans un laboratoire voisin utilisant obligatoirement un système de dosage différent du nôtre. Et pas besoin de faire affaire avec un centre universitaire ! La qualité des dosages immunologiques automatisés est la même quelle que soit l'importance de l'institution. Il suffit de choisir un centre utilisant des produits différents (et non, sauf exception, des analyseurs différents d'un même fournisseur de réactifs). Si deux techniques non apparentées donnent le même résultat, il est peu probable que nous soyons en présence d'une interférence hétérophile. Si les systèmes donnent des résultats différents, il est probable qu'un des résultats sera plus conforme à la clinique et pourra être utile au clinicien. Voilà un bon argument à présenter à un organisme qui rêverait d'imposer le même système analytique à tous les laboratoires...

Mais parfois, rien ne semble fonctionner. Le Tableau 8 reprend le cas de la patiente de Trois-Rivières précédemment mentionné. Confronté au résultat obtenu à Sherbrooke, André Audet, biochimiste clinique à Trois-Rivières, a décidé de faire mesurer la TSH et la T₄ libre de ce spécimen par tous les centres hospitaliers

de la Mauricie et par un hôpital montréalais. Les résultats obtenus sont effarants ! Les taux de TSH variaient entre 0,5 et 18 mU/L pour les 6 systèmes utilisés et les taux de T₄ libre entre 18 et > 75 pmol/L ! Ces différences résultent en bonne partie de l'origine différente des anticorps utilisés par chaque système analytique, de la variation des concentrations relatives du spécimen et du réactif, des mélanges (secrets) d'agents plus ou moins bloquants, mais quand même !

L'IDENTIFICATION DE L'INTERFÉRENCE EST-ELLE SUFFISANTE ?

Face aux résultats divergents rapportés pour le spécimen de la patiente de Trois-Rivières, nous avons décidé, par curiosité scientifique, d'effectuer un dosage de troponine T (Elecsys de Roche) sur ce même spécimen. À notre (pas très ?) grande surprise, la concentration de troponine T, marqueur d'atteinte cardiaque, se situait à 4 µg/L, résultat compatible avec un infarctus du myocarde et totalement incohérent avec la clinique. **Un individu chez qui on a démontré une interférence provenant d'anticorps hétérophiles (anti-animaux ou autres) dans un test présentera une probabilité élevée de connaître des interférences au niveau d'autres tests immunologiques.** Le médecin et son patient devraient être avisés de cette possibilité. Comment ? Un bracelet d'alerte médicale indiquant que les spécimens provenant de cette personne sont susceptibles de présenter des interférences avec les immunoessais ? La question est lancée.

RÉFÉRENCES

1. Cole LA, Khanlian SA. Easy fix for clinical laboratories for the false-positive defect with the Abbott AxSym total beta-hCG test. *Clin Biochem* 2004;37:344-9.
2. Diamandis EP. Immunoassay interference: a relatively rare but still important problem. *Clin Biochem* 2004;37:331-2.
3. Lepage R, Roy L, Brossard JH, Rousseau L, Dorais C, Lazure C et al. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem* 1998;44:805-9.

4. Fahie-Wilson MN. Detection of macroprolactin causing hyperprolactinemia in commercial assays for prolactin (Letter). *Clin Chem* 2000;46:2022-3.
5. Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clin Chem* 2003;49:1504-9.
6. Stanczyk FZ, Cho MM, Endres DB, Morrison JL, Patel S, Paulson RJ. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids* 2003;68:1173-8.
7. Murphy BE. How much "UFC" is really cortisol? (Editorial) *Clin Chem* 2000;46:793-4.
8. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999;45:942-56.
9. Levinson SS, Miller JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin Chim Acta* 2002;325:1-15.
10. Koziarz JJ. Rebuttal to "Easy fix for clinical laboratories for the false positive defect with Abbott AxSYM Total BhCG test" by Dr. Laurence Cole, *Clin Biochem* 37(5) , 344-349 (2004) (Letter). *Clin Biochem* 2004;37:500.

ABRÉVIATIONS

| | |
|------------|---|
| Ac | anticorps |
| CHUM | Centre hospitalier universitaire de Montréal |
| CHUS | Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke |
| CIA | chemiluminescence immunoassay |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| FPIA | fluorescence-polarization immunoassay |
| HBR | heterophilic blocking reagent |
| HAMA (IIR) | human anti-mouse antibodies (immunoglobulin inhibiting reagent) |
| MEIA | microparticle enzyme immunoassay |
| RIA | radioimmunoessai |
| TCA | acide trichloracétique |