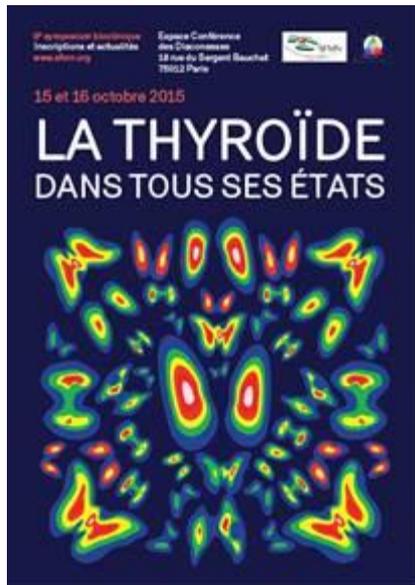


Interférences analytiques du bilan thyroïdien

Lesquelles ? Pour quelles solutions ?



9ÈME SYMPOSIUM BIOCLINIQUE
LA THYROÏDE DANS TOUS SES ETATS
15 et 16 octobre 2015
Espace des Diaconesses
PARIS



Agnès GEORGES

Service de Médecine Nucléaire

Laboratoire Hormonologie - Marqueurs Tumoraux

agnes.georges@chu-bordeaux.fr



- Fréquence du bilan T +++ pour suspicion ou impression de dysthyroïdie
- Fiabilité des dosages : satisfaisante
- Parfois : résultats jugés incohérents par le clinicien
 - Situation physiopathologique ou thérapeutique particulière ?
 - Existence d'un problème analytique ?

Quand suspecter une interférence ?

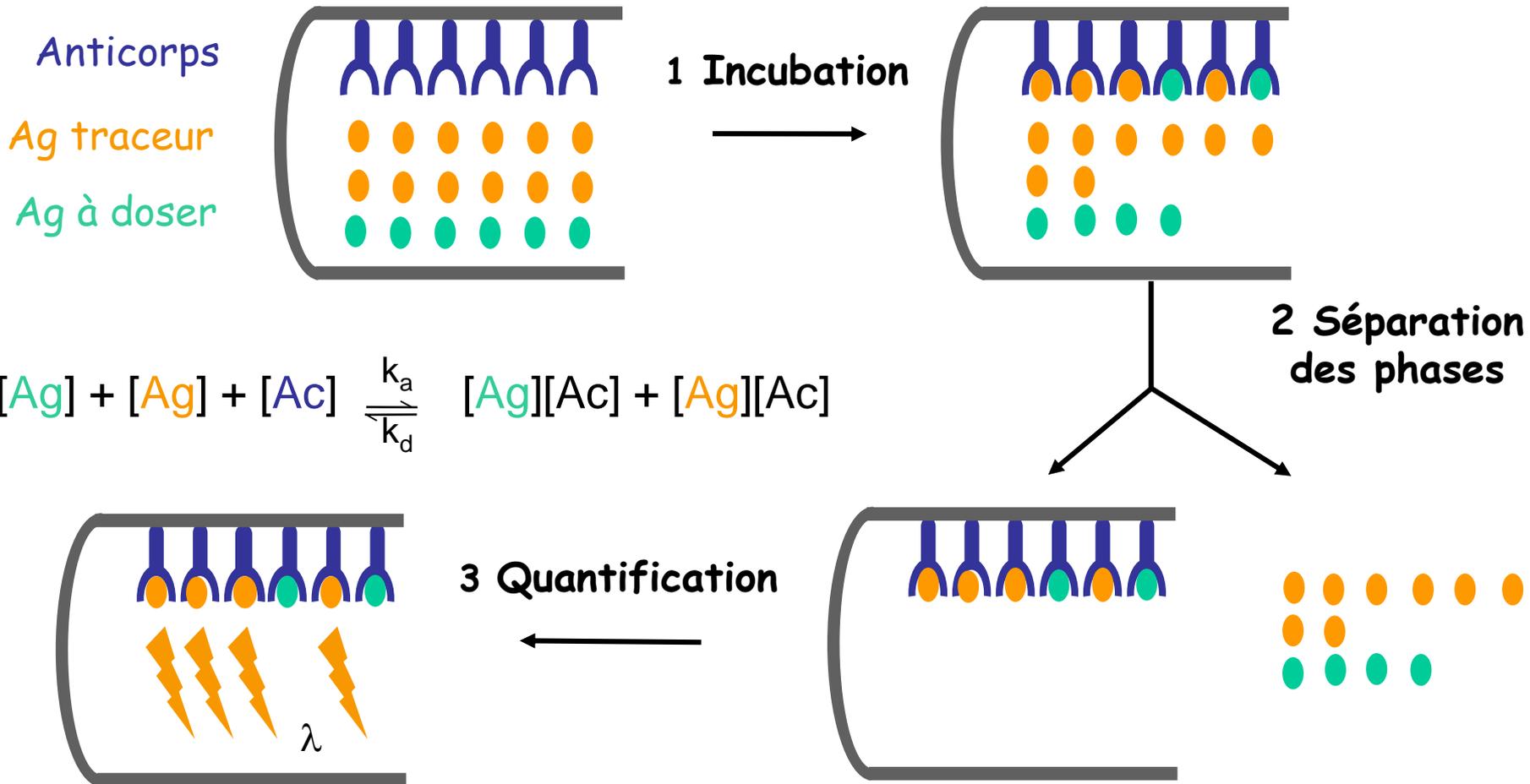
- Résultats incompatibles avec la clinique
- Pas de relation log inverse TSH-T4L mais pas de clinique pathologie centrale
- Discordance des antécédents
- Résultats discordants avec une autre méthode
- Valeur extrême par rapport aux valeurs de référence ou pathologiques courantes

Nous allons envisager

- Principes des immunodosages
- Principales interférences susceptibles d'être rencontrées
- Comment les identifier et même s'en prémunir dans certaines situations cliniques concrètes

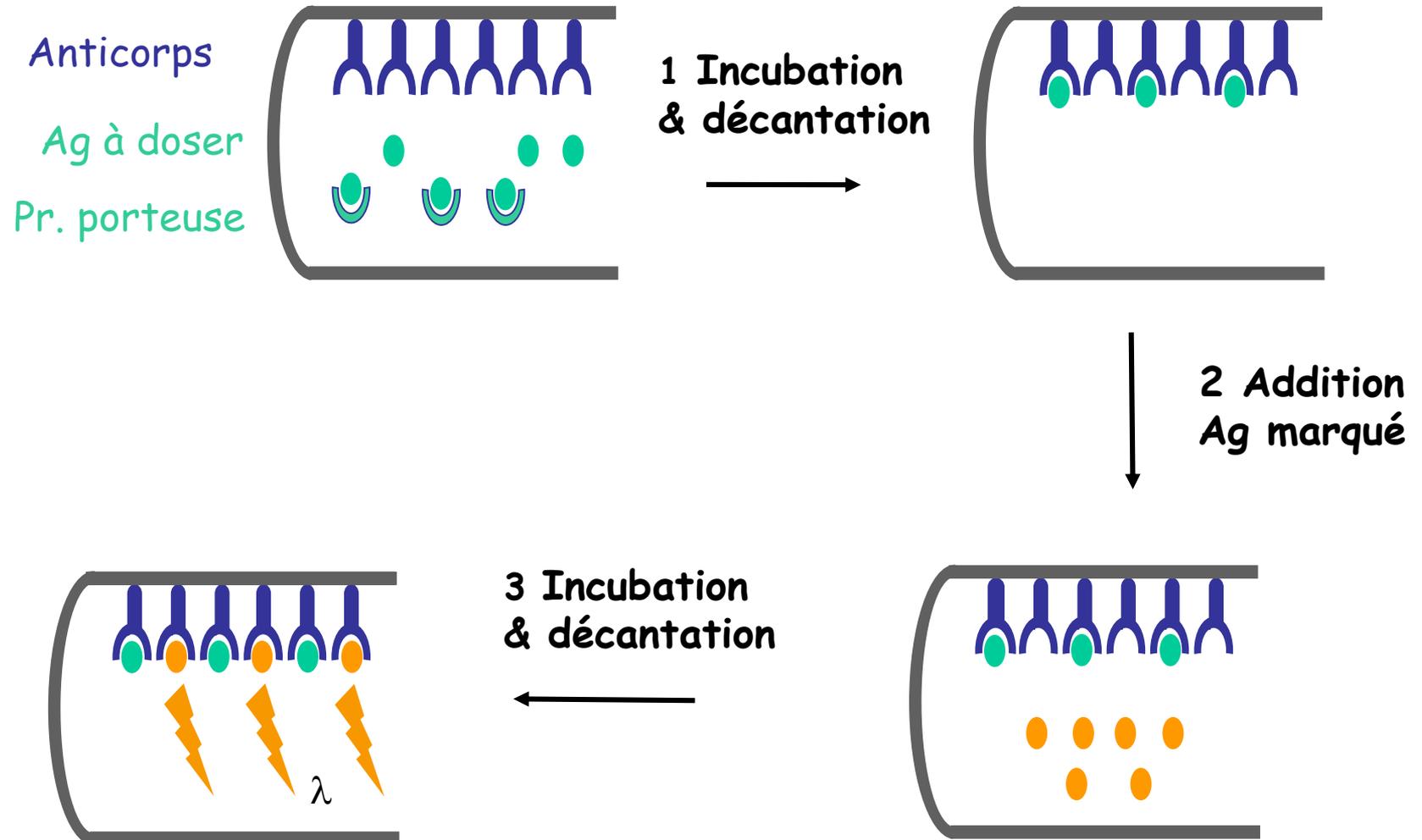
Dosage compétitif

Ac de capture en défaut par rapport à l'Ag marqué et l'Ag à doser



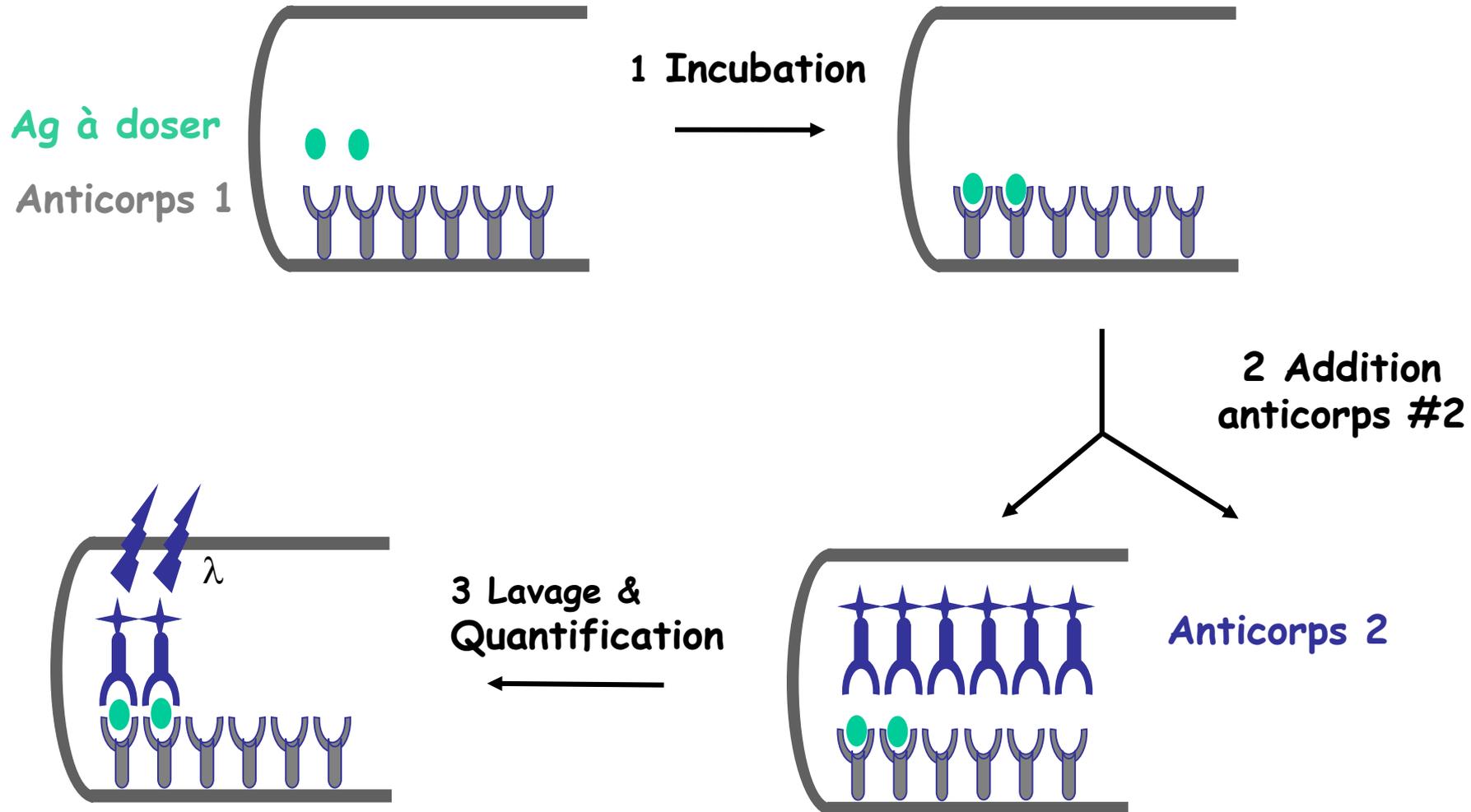
Hormones libres

Dosages en 2 temps préconisé

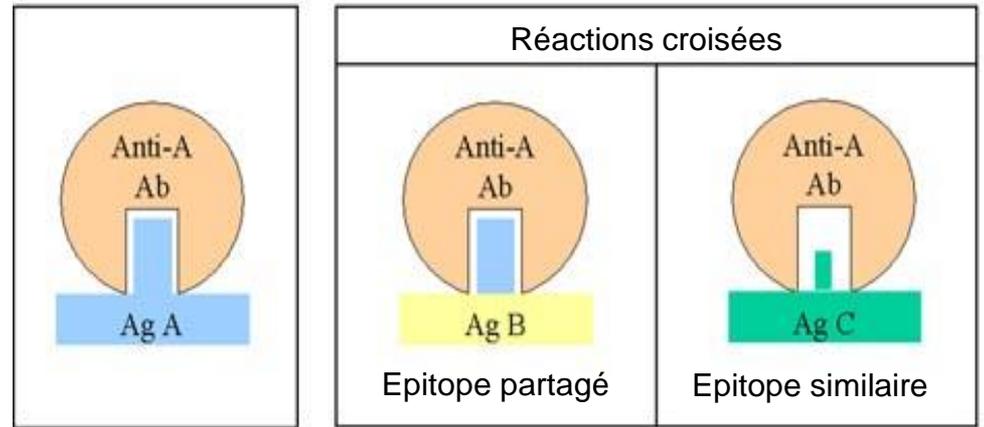


Dosage immunométrique « sandwich »

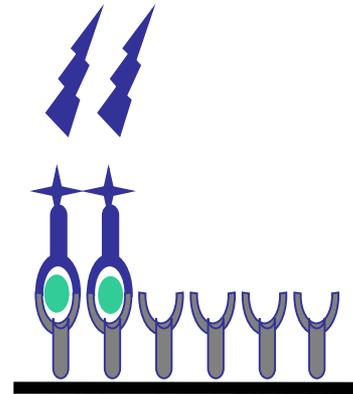
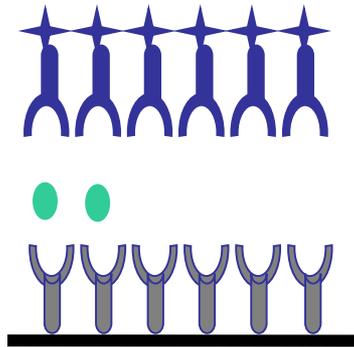
Les Ac de capture et Ac marqué sont en excès par rapport à l'Ag à doser



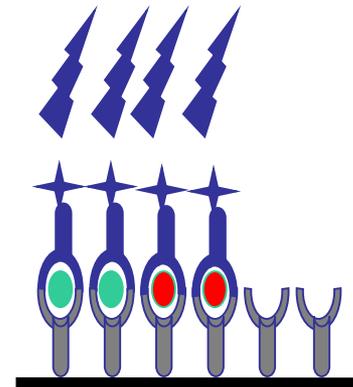
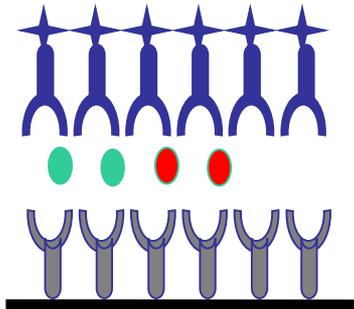
Réactions croisées



[Ag] +



[Ag] +
& Interf

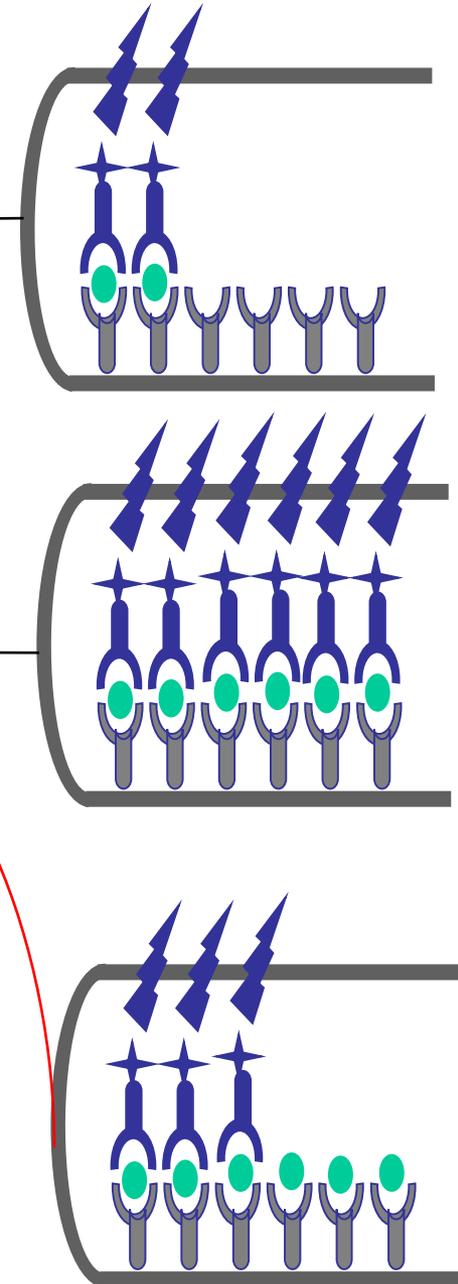
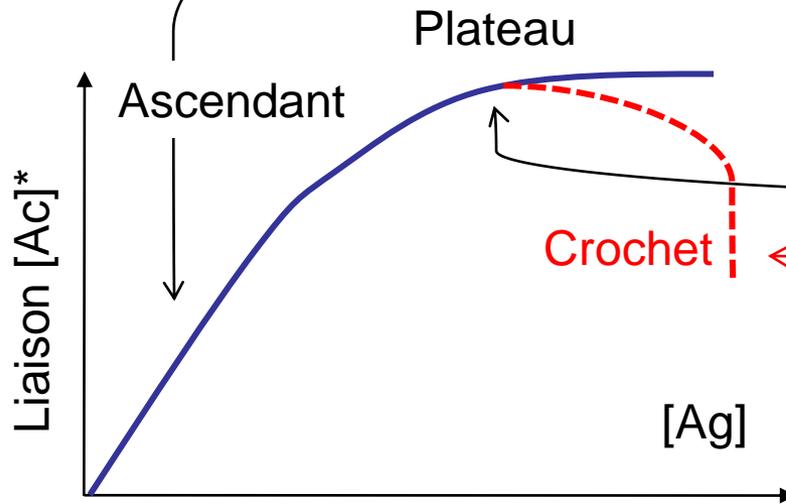


Erreur
par excès

Effet crochet

Surcharge majeure d'Ag

dans un dosage théoriquement en excès d'Ac



Courbe en U inversé : décroissance lorsque la concentration en Ag dépasse celle des Ac, plus de sandwich.

Valeur erronée, sous estimée.

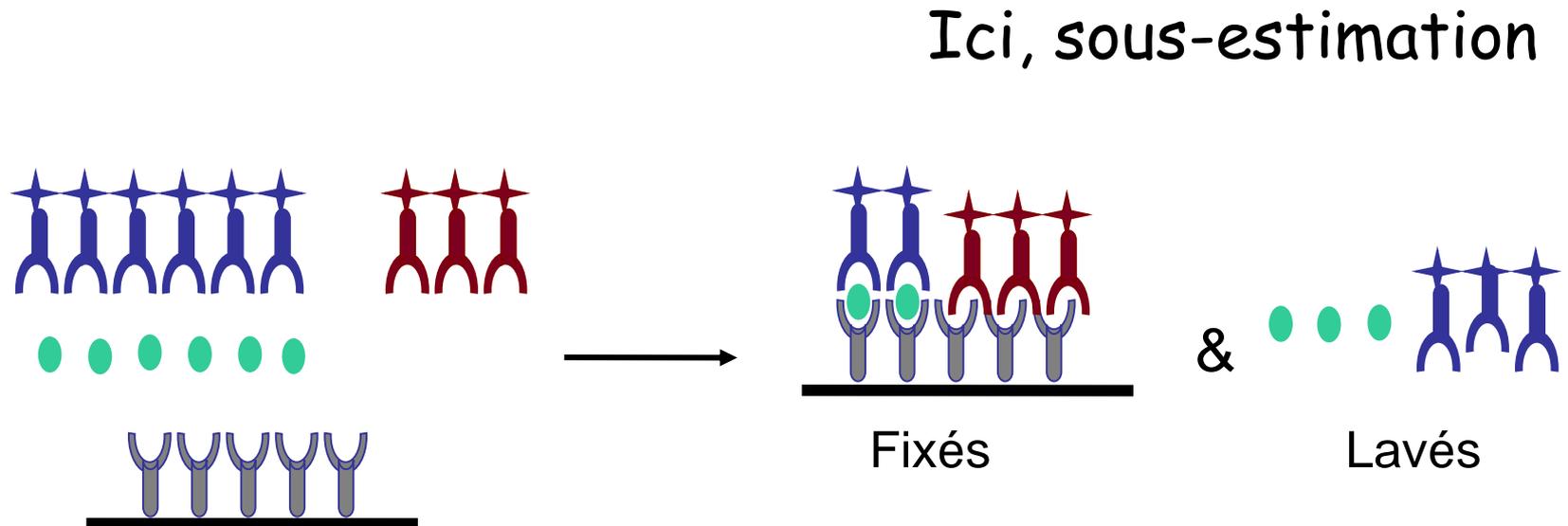
Anticorps anti-analytes

- Problème le + sérieux affectant le dosage de Tg
 - aucune méthode ne peut prétendre être indifférente à la présence d'AC et même des taux très faibles peuvent interférer
 - Risque de **sous-estimation** de la Tg
 - Disparité des résultats selon les méthodes
 - Nécessité d'associer antiTg à dosage Tg
- Anti-T3 ou anti-T4
 - Fausse élévation de T4L ou T3L ou les 2 !
- Anti-TSH
 - Après injection TSH bovine pas Thyrogen !
 - MAI thyroïdiennes

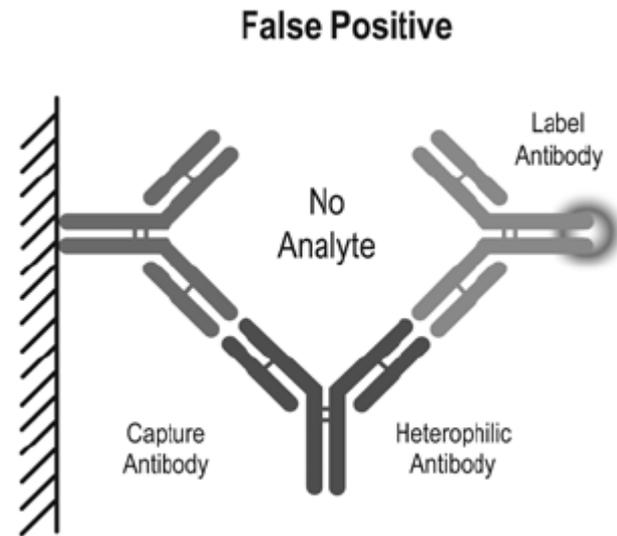
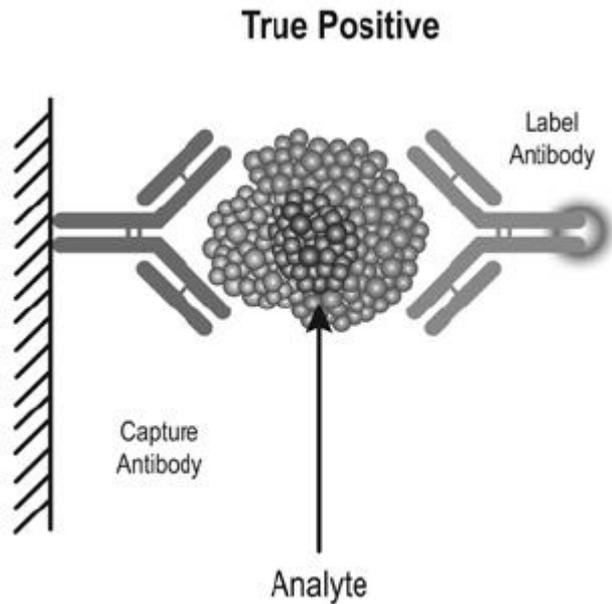
Anticorps dirigés contre les Ac du dosage

Présents dans le sérum = *endogènes*

Blocage des Ac de détection : valeur sous-estimée ou sur-estimée en fonction du type de dosage et de l'Ac interférent



Ici, surestimation

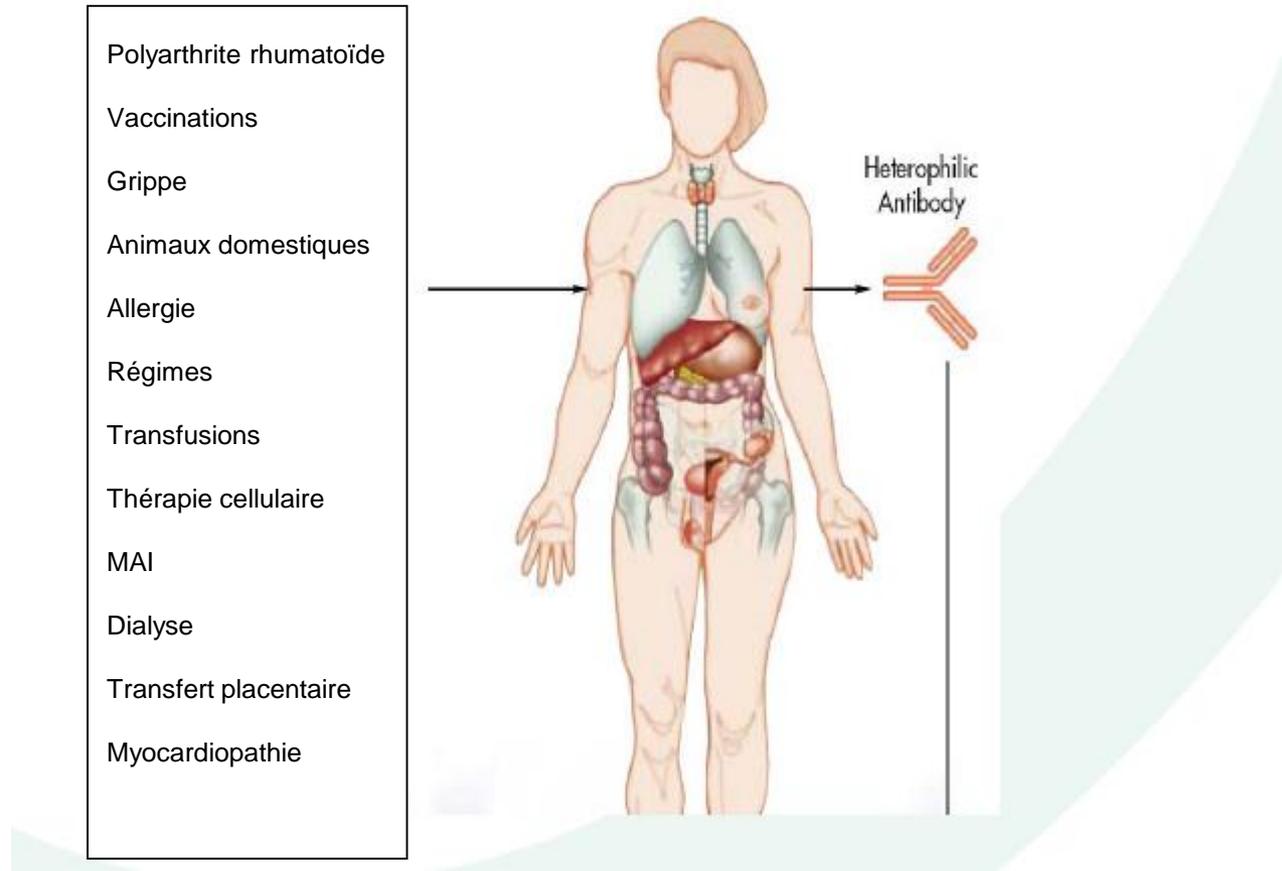


**Anticorps
hétérophiles**

Anticorps endogène, hétérophile : ou *Quand les dosages mentent...*

- Terme générique... « *Ac du patient qui faussent les résultats...* »
- 3 groupes
 - **Ac anti-animal** (HAMA, rares)
Ac apparus après injection d'anticorps d'origine animale
 - **Ac hétérophiles** (très fréquents)
pas d'exposition aux AC connue
 - **Facteur rhumatoïde**
IgM dirigées contre fragment Fc des IgG
- Fréquence : rares
 - 0,5 - 5% des serums « tout-venants »
 - 38 - 55% si screening d'Ac hétérophiles

Origine des anticorps interférents



D'après E. Cavalier

Causes iatrogéniques

Drug	Source
Antibody-targeted imaging reagents	Mouse Rat
Antibody-targeted drugs	Mouse Rat
Anti-thymocyte globulin	Horse Rabbit
Anti-snake venom	Horse
Calcitonin	Salmon
Digibind (anti-digoxin Fab)	Sheep
Factor VIII	Pig
Insulin	Pig
Vaccines	Rabbit Chicken
Patent medicines	Rabbit

Impression renforcée si

- ATCDT d'interférence analytique connue
- Notion d'exposition diagnostique ou thérapeutique à des anticorps monoclonaux
- Patients atteints de PAR
- Quand le résultat entraîne un impact fort sur le ttt
 - hCG
 - Troponin
 - serologie virale
 - endocrinologie

Comment confirmer une interférence sur un dosage ?

- « *bon sens médical* »
- Contrôle par la même technique
- Contrôle avec une autre technique
- Dilutions de l'échantillon (attention FP ou FN)
- Neutralisation des anticorps (Ig or *blocking reagent*)
- Elimination des anticorps hétérophiles
 - Précipitation (PEG, sulfate d'ammonium)
 - Extraction par affinité (protéine G ou A)
 - Exclusion de taille (ultrafiltration ou gel filtration)

Quel design idéal pour l'immunoassay ?

- Utilisation de fragments d'anticorps et un haut degré de purification
- Choix des solutions tampon et utilisation d'additifs (Ig)
- Format des techniques : maintien des étapes de lavage

Cas clinique 1

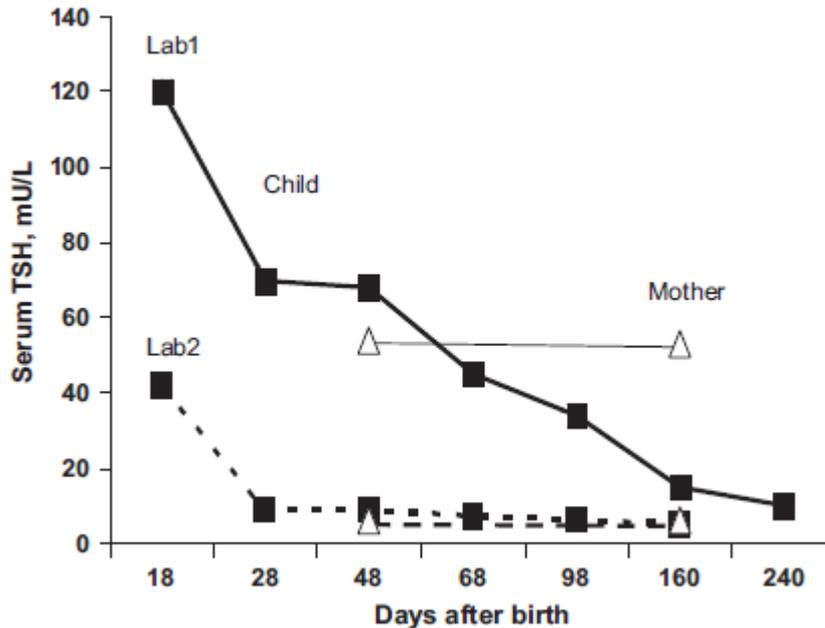
- Homme de 60 ans hospitalisé pour fracture du petit trochanter post syncopal
 - ATCDT hypertension, maladie coronarienne et dyslipidémie
 - A l'admission épisode de bradycardie, qui bien que prise de beta bloquants, a amené la réalisation d'un bilan T
 - TSH 232 !!!! Hormones libres N
- **Interférence ???**

Algorithme d'identification d'une macroTSH

Procedures on patient's serum	TSH results	Conclusion
Untreated Advia Centaur Vitros	122 mIU/liter 232 mIU/liter	Inappropriately elevated TSH levels despite clinical euthyroidism, suggestive of assay interference
Dilutions in Advia Centaur diluent, 10-fold	165 mIU/liter; 135% recovery	Increasing recoveries for patient sample suggest interference from heterophile antibodies, rheumatoid factor, or macro-TSH
Precipitation with PEG and reassay supernatant	3.9 mIU/liter; 3.2% recovery	Presence of a high molecular weight interfering substance
Heterophile-blocking tube	116 mIU/liter; 95% recovery	Considered a negative study, although heterophile antibodies interference cannot be ruled out because this test is specific but nonsensitive for heterophile antibodies interference
Incubation with hypothyroid patient sample	Expected, 144 mIU/liter; measured, 123 mIU/liter; 85% recovery	Presence of excess TSH binding capacity, likely macro-TSH interference
Gel filtration chromatography analysis (Perkin-Elmer DELFIA assay)	Presence of high molecular weight TSH fraction, which increased after incubation with hypothyroid patient sample	Confirmed the presence of macro-TSH

MacroTSH

- Rare chez l'adulte, surtout F, euthyroidie
- Immun complexe → réduction de clairance rénale de la TSH
- Important à détecter chez nouveau-né par passage d'AC maternels



Suivi pédiatrique +++
Décroissance Ac maternels

Cas clinique 2

- F 33 ans, fatigue perte de poids en PP
- Bilan thyroïdien
 - TSH aug.
 - T4L et T3L N
- Levothyrox pendant 1 an... pas de modification de TSH

- Adressée à clinique endocrino
 - Echo Thyr Normale, TPO N
 - Bilan complet : TSH, FSH, PRL, PTH, ACTH, beta-hCG

Bilan biologique complet

	Architect C8000, Abbott (CLIA)	Advia Centaur XP, Siemens (CLIA)	Dxl, Beckman Coulter (CLIA)	Cobas, Roche Diagnostics (ECLIA)
PRL, ng/mL	246 (5.2–26.5)	2.3 (2.8–29.2)	105 (3.3–26.7)	32.1 (4.8–23.3)
TSH, μ IU/mL	259 (0.35–4.94)	70 (0.35–5.50)	13.4 (0.34–5.60)	1.88 (0.27–4.20)
FSH, IU/L	>150 (3.03–8.08)	26 (1.5–33.4)	125 (1.79–22.51)	3.35 (3.5–12.5)
β -hCG, μ IU/mL	2908 (0–5)	67 (0–5)	255 (<0.5)	0.1 (0–5)
iPTH, pg/mL	566 (15–68.3)	180 (14–72)	44 (12–88)	43.8 (15–65)
ACTH, pg/mL	>1500 (4.7–48.8)	17.2 (5–45)	NA	19.8 (7.2–63.3)

Résultats intertechniques tous discordants !

Avant et après dilution

	Without Dilution	1/2 Dilution	1/4 Dilution	1/8 Dilution
PRL (5.2–26.5), ng/mL	246	>400	474	412
TSH (0.35–4.94), μ IU/mL	259	204	237	260
FSH (3.03–8.08), IU/L	>150	248	255	300
β -hCG (0–5), μ IU/mL	2908	2650	1485	1008
iPTH (15–68.3), pg/mL	566	506	441	512
ACTH (4.7–48.8), pg/mL	>1500	392	165	144

Suspicion d'interférence analytique multiple

Avant et après passage sur tubes bloquants (HBT)

	Before	After
PRL (5.2–26.5), ng/mL	228.1	22.04
TSH (0.35–4.94), μ IU/mL	>100	1.736
FSH (3.03–8.08), IU/L	>150	3.39
β -hCG (0–5), μ IU/mL	3219	<1.2
iPTH (15–68.3), pg/mL	601.6	81.3
ACTH (4.7–48.8), pg/mL	>1500	7.66
IGF-1 (130–354), ng/mL	1864	244
RF (0–20), U/mL	188	<20
Calcitonin (0–11.5), pg/mL	270	<2



→ Présence d'anticorps hétérophiles

Dosage de facteur rhumatoïde : 188 U/mL +++

Avant et après PEG

	At Presentation	After 24 mo
TSH (0.35–4.94), μ U/mL	>100/0.12 (<0.12%)	84.36/0.22 (0.26%)
PRL (5.2–26.5), ng/mL	128/0.52 (0.2%)	545.2/16.22 (2.98%)
β -hCG (0–5), μ U/mL	3219/<1.2 (0.003%)	2227/<1.2 (<0.08%)
ACTH (4.7–48.8), pg/mL	>1500/21.21 (<1.4%)	NA
FSH (3.0–8.0), IU/L	>150/2.96 (<1.97%)	167.2/3 (1.7%)
iPTH (4.7–48.8), pg/mL	601.6/81.3	745/28.8 (3.86%)
RF (0–20), U/mL	188/<20	NA
Calcitonin (0–4.8), pg/mL	504/30.4 (1.7%)	378/127 (33.8%)

→ Normalisation de toutes les hormones et du FR...

Caractérisation de l'Ac interférent

- Dosages des Ig N, pas de pic à l' IF
- Incubation du serum avec Ig G souris (*blocking-reagent*) → hormones sub N

→ **Interférence** =

- anticorps anti-isotype (région constante)
- plutôt que anti-idiotypic (région hypervariable)

Cas clinique 3

Tg IMA	Cisbio Tg IRMA (µg/L) ^a			Brahms Tg IRMA (µg/L) ^a	Kryptor® Tg (µg/L) ^a	Access® Tg (µg/L) ^a		
Functional sensitivity ^b	0.7			0.5	1.5	0.1		
HBT ^c addition	-	+	++	-	-	-	+	++
7/09/2005	<0.7							
TSH-suppressed								
23/11/2006	3.5			<0.5		7.4		
TSH-suppressed								
1/12/2006	4.9				<1.5			
TSH-stimulated (20 mIU/L)								
25/01/2007	5.9	1.7	<0.7	<0.5	<1.5	12.7	2.1	<0.1
TSH-stimulated (28 mIU/L)								
16/05/2007	<0.7			<0.5	ND	ND		
TSH-stimulated (49 mIU/L)								

Patiente 54 ans

Suivi CDT (TT + IRA)

Apparition FR transitoire...

Cas clinique 3 bis

Mr S 64 ans suivi pour arythmie ventriculaire

Découverte hypothyroïdie, Substitution par Levothyrox

Bilan T : TSH T4L, T3L aug.

Dates	Methods	Untreated serum			HBT-treated serum		
		TSH, mU/L	FT4, pmol/L	FT3, pmol/L	TSH, mU/L	FT4, pmol/L	FT3, pmol/L
2008/10/xx	Not available	Elevated ^a					
2008/12/17	Unicel Dxi (Beckman Coulter)	40.8	Elevated ^a				
	IRMA & RIA (Brahms)	0.16	Elevated ^a				
2009/01/30	Unicel Dxi (Beckman Coulter)	33	Elevated ^a				
	IRMA & RIA (Brahms)	0.15	27.7	7.9			
	IRMA & RIA (Beckman Coulter)	1.22	32.1	5.8	0.03	29.8	5.3
2009/03/02	IRMA & RIA (Brahms)	0.28	27.7	6.9			
	IRMA & RIA (Beckman Coulter)	1.62	33.8	5.5	0.08	31.8	5.3
	Immulite 2000 (Siemens)	<0.01	37.8	9.4			
	Centaur (Siemens)	<0.05	32.2	5.4			
2010/06/02	Unicel Dxi (Beckman Coulter)	18	13.4	4.5	6	13	4.2

Dosage FR : 2700 UI/mL

Georges et al., Clin Chim Acta 2011

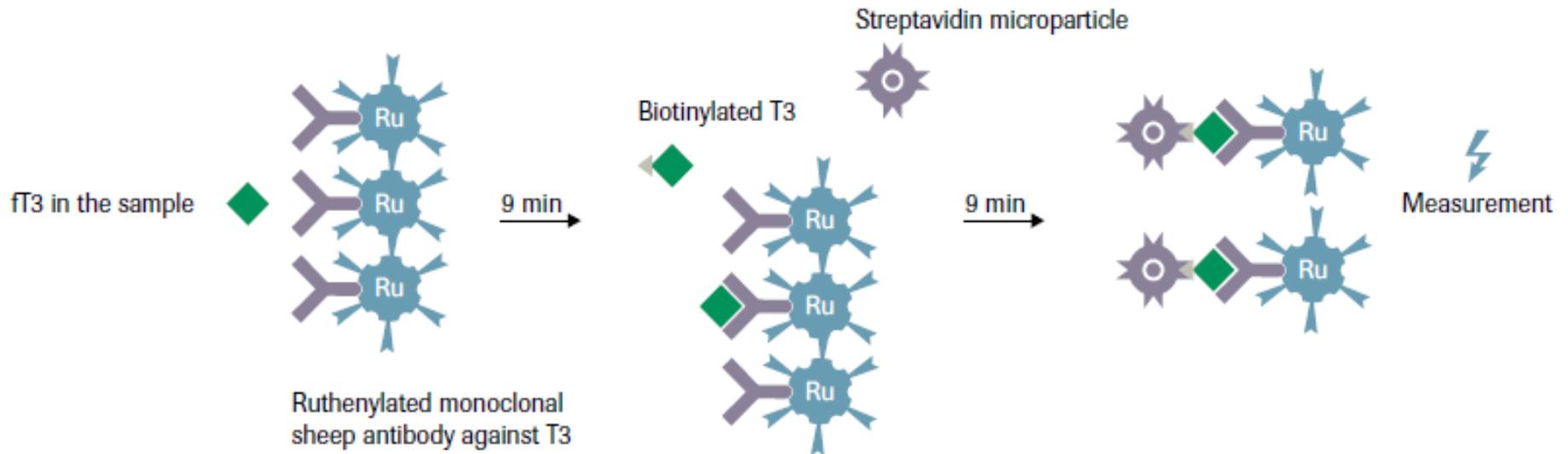
Et sur les hormones périphériques...?

- F 41 ans
- Asthénie, frilosité, vertiges œdème palpebral
- Bilan thyroïdien : TSH et T3L aug., T4L N → Adénome thyroïdienne ?
 - Exploration TSH : HBT neg, dilution OK
 - Exploration HT : interférence Immulite et Centaur

Contrôle par 3 techniques différentes

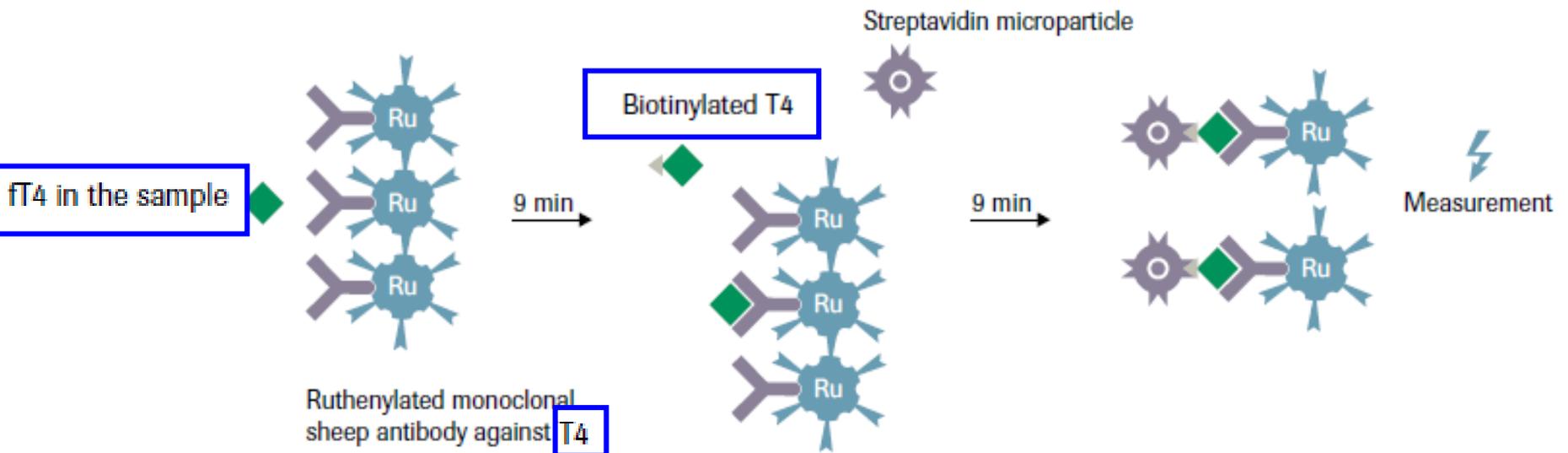
TSH (mIU/L)	Immulite 2000® (ILMA)	Advia-Centaur® (ILMA)	Cobas® (ECLIA)	Access® (ILMA)	
22/04/2008	106 (0.35–5)				
13/05/2008	120 (0.35–5)	121 (0.4–4)	147 (0.4–4)	>100 (0.15–3.7)	
13/05/2008 + HBT ^a	128 (0.35–5)	129 (0.4–4)			
16/06/2008	146 (0.35–5)	141 (0.4–4)			
FT3 (pmol/L)	Immulite 2000® (LIA)	Advia-Centaur® (LIA)	Cobas® (ECLIA)	Access® (LIA)	Dia-Sorin (RIA)
22/04/2008	49.6 (2.8–6.5)				
13/05/2008	42.7 (2.8–6.5)	2.3 (3.5–8.9)	3.4 (3.8–7.4)	3.5 (3.8–6)	2.3 (3.1–6.1)
16/06/2008	53.3 (2.8–6.5)				
16/06/2008 + PEG ^b	2.7* (2.8–6.5)				
FT4 (pmol/L)	Immulite 2000® (LIA)	Advia-Centaur® (LIA)	Cobas® (ECLIA)	Access® (LIA)	Dia-Sorin (RIA)
22/04/2008	11.6 (10.3–24.5)				
13/05/2008	10.3 (10.3–24.5)	17.8 (10.3–20.6)	7.5 (12.2–23.2)	2.8 (7.5–21.1)	6 (12.5–25)
16/06/2008	12 (10.3–24.5)	19.7 (10.3–20.6)			
16/06/2008 + PEG ^b	<3.9* (10.3–24.5)	4.4* (10.3–20.6)			

Et les anticorps anti-ruténium...?



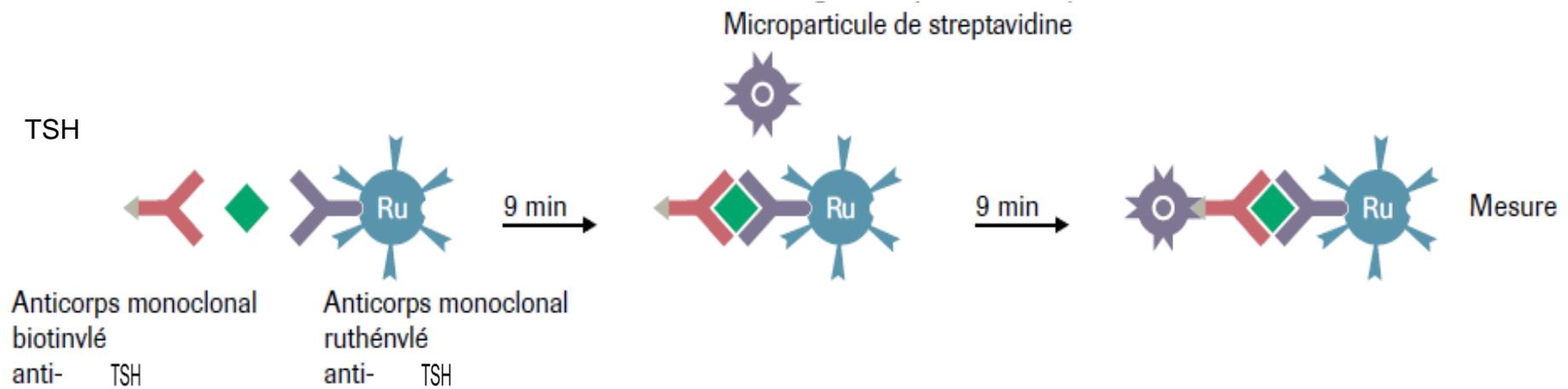
Ohba et al., Endocr J 2012
Buijs et al., Ann Clin Biochem 2011

Et les anticorps anti-ruténium...?



Ohba et al., Endocr J 2012
Buijs et al., Ann Clin Biochem 2011

Et les anticorps anti-ruthénium...?



Ohba et al., Endocr J 2012
Buijs et al., Ann Clin Biochem 2011

- Nombreux cas d'interférences décrits dans la littérature
 - compétition 
 - Sandwich 
- → Modification des anticorps du dosage par le fabricant
- Interférence macroTSH en plus
- Interférence anti-avidine ou anti-streptavidine en plus
- Et la Biotine ?...

Peltier et al., Clin Chem Lab Med 2015
Zaninotto et al., Clin Chem Lab Med 2014
Gessl et al., Clin Chem Lab Med 2014
Decoudier , SFE 2015



La vie ^{n'}est *pas*
un long fleuve
tranquille. **!!!**

UN FILM DE
ETIENNE CHATILIEZ

Take-home message

- Interférences analytiques aussi vieilles que les immunodosages...
- Rares... même si souvent évoquées (souhaitées...) par nos « amis » cliniciens
- Arsenal de laboratoire (spécialisé...) pour les mettre en évidence, mais pas toujours efficace...
- Dialogue clinicien/biologiste/industriel +++

