

CRITERES DE CHOIX D'UN AUTOMATE D'IMMUNO-ANALYSE

Hatem MASMOUDI

Revue Tunisienne de Biologie Clinique. Décembre 2002, n°14, 34 - 40.

INTRODUCTION

Un automate d'immuno-analyse est un appareil qui permet de réaliser en milieu liquide et de façon automatique des dosages immunochimiques, c'est à dire des dosages basés sur l'utilisation de la réaction antigène-anticorps spécifique pour quantifier une substance dans un milieu biologique. Outre qu'elles dispensent de l'extraction préalable de l'analyte à partir de l'échantillon à doser grâce à l'utilisation d'immun-sérums ou d'anticorps (Ac) spécifiques (1) et qu'elles sont rapides et s'adaptent aux dosages par série, les méthodes d'immunodosage ont tiré profit d'une part, du développement des techniques de production d'Ac monoclonaux permettant l'obtention d'Ac homogènes de haute pureté et de forte affinité contre des substances aussi diverses que les protéines plasmatiques, les hormones, les antigènes (Ag) microbiens et tumoraux, les médicaments et les toxiques, et d'autre part, de la très grande sensibilité des signaux utilisés pour révéler la réaction Ag-Ac permettant d'atteindre des seuils de détection de l'ordre du nanogramme (ng) voire du picogramme par millilitre (pg/ml) (2, 3).

L'immuno-analyse a ainsi connu un développement considérable au cours 3 dernières décennies l'amenant rapidement à occuper une place prépondérante dans l'espace de la biologie clinique en Europe (près de 60 % des dosages en 2000) (4). Parmi les méthodes d'immuno-analyse et pour des raisons évidentes de commodité et de sécurité, ce sont surtout les méthodes automatisables sans marqueur ou utilisant un marqueur non radio-isotopique qui ont connu une très forte expansion au cours des 10 dernières années. Depuis la fin des années 80, la plupart des fabricants de réactifs de laboratoire se sont ainsi mis un à un à sortir chacun son propre automate d'immuno-analyse.

Le choix d'un automate d'immuno-analyse est une décision importante que le biologiste est amené à prendre en s'appuyant sur un certain nombre de critères que nous essayerons de développer dans les paragraphes suivants et qui concernent principalement :

- l'automate lui-même (composantes mécanique et informatique)
- les techniques immunologiques utilisées
- les besoins du laboratoire
- le coût (rapport qualité/prix)

- le service après vente

CRITERES LIES A L'AUTOMATE

I Caractéristiques générales

1- Le fabricant

Il est important d'avoir une idée sur le fabricant de l'automate, sa situation dans le monde de la biologie clinique et de l'immuno-analyse plus particulièrement, la qualité de ses kits d'immunodosage, son ancienneté et son expérience dans le domaine de l'immuno-analyse sans oublier l'avis des collègues qui utilisent déjà le même appareillage ou les évaluations déjà disponibles.

2- Le système : ouvert ou fermé

Les systèmes fermés n'acceptent que les tests programmés par le fabricant avec ses réactifs propres. Ils imposent ainsi une interdépendance du laboratoire vis à vis du fournisseur (fabricant). Cependant, les systèmes fermés, grâce à une automatisation optimisée, ont l'avantage de la rapidité et de la simplicité et donc d'un bien meilleur rendement.

A l'opposé, les systèmes ouverts ont l'avantage de la liberté de choix des réactifs avec possibilité de mise au point de tests-maison, le technicien est responsabilisé et le contrôle de qualité est personnalisé. Toutefois, avec les systèmes ouverts la productivité et le rapport bénéfice/coût sont beaucoup plus faibles (4).

3- Capacité de travail

Plusieurs paramètres permettent de situer les capacités de l'automate :

- le nombre total d'analyses réalisables et la diversité de la gamme de tests dans les différents secteurs de l'immuno-analyse
- la cadence définie par le nombre minimum et maximum de tests réalisés par heure
- le délai minimum et maximum d'obtention des résultats
- le nombre de paramètres en ligne (nombre de tests réalisables simultanément)
- l'autonomie de fonctionnement estimée en heures ou en nombre de tests (5).

4- Mode et souplesse de fonctionnement

- protocole rigide, ou protocole flexible permettant de travailler, selon le test, en une ou deux étapes avec des cycles de lavage et des temps d'incubation variables ;
- chargement et traitement des spécimens en continu avec accès aléatoire ("*random access*") au gré de la demande, ou non continu par liste de travail ;

- traitement des spécimens par patient ou par série ou les deux ;
- possibilité d'accès au mode urgence (prioritaire) en continu ou non et le nombre de positions disponibles à cet effet ;
- possibilité de dilution et de ré-analyse automatiques (5).

5- Formatage des éditions

- Exploitation intégrée du contrôle de qualité : exploitation en temps réel et réponse de l'automate (alarme, blocage ou indifférence), exploitation cumulative (cartes de contrôle, stockage en nombre de jours et de valeurs) ;
- Alarmes sonores, lumineuses ou imprimées sur papier et leurs types : analytiques : échantillon insuffisant, valeurs hautes, valeurs basse ; fonctionnement : centrage de l'aiguille, pilotage robotique ;
- Etalonnage : nombre de points, modélisation de la courbe, fréquence de calibrage, validation du calibrage.

II Gestion et traitement des spécimens

1- Identification des spécimens

- prélèvement sur tube primaire (avec ou sans adaptateur) ou sur un contenant secondaire (standard ou spécifique) ;
- identification positive du spécimen par un système code à barre, ou mode dégradé sans identification positive (saisie du numéro d'identification au clavier) ;
- système de code à barre uni ou bi-dimensionnel (permet d'emmagasiner beaucoup plus d'informations), à diode ou au laser ;
- lecteur de code à barre automatique intégré ou extérieur manuel.

En fait, la plupart des automates mis sur le marché ces dernières années, offrent la possibilité de travailler sur tube primaire (le tube de prélèvement contenant, après centrifugation, le sérum et le culot globulaire) avec identification positive du spécimen ce qui permet d'une part, d'éviter le transfert de tube à tube avec toutes les erreurs d'étiquetage et d'identification, et d'autre part de saisir directement les renseignements concernant le malade et les analyses demandées.

2- Contrôle du prélèvement

- détection du niveau de liquide (contrôle du volume de l'échantillon) ;
- détection de caillot de fibrine ;
- avec alarme sonore ou lumineuse, visible sur l'imprimante ou à l'écran ;

3- Protection contre la contamination inter-spécimen

Compte tenu des amplitudes, souvent très importantes, pouvant survenir d'un malade à l'autre pour le même paramètre, la maîtrise des risques de contamination inter-spécimen est un critère essentiel pour le choix d'un automate d'immuno-analyse. Elle peut être assurée par l'utilisation d'embouts à usage unique (Tosoh-Eurogenetics[®], Biomérieux[®]..) ou par l'emploi de fluides inertes et non miscibles pour la distribution des échantillons et des réactifs (technologie dite TRAF, utilisée par les automates Technicon[®]). Mais, la plupart des fabricants ont opté pour un protocole de décontamination de la sonde de prélèvement à usage multiple par lavage unique ou multiple. Dans ce cas, il est intéressant de préciser le nombre et la nature de(s) solution(s) de lavage et le nombre de cycles de lavage effectués à chaque fois.

III Gestion et traitement des réactifs

1- Conservation et stabilité des réactifs dans l'analyseur

La réaction immunologique ainsi que la réaction enzymatique doivent se dérouler à une température maintenue constante entre 20 et 25°C (éviter de placer l'automate près d'un radiateur de chauffage, la pièce où se trouve l'automate doit être climatisée en été). Tandis qu'il est préférable, pour une meilleure et plus longue conservation des réactifs à l'intérieur de l'automate, qu'ils y soient stockés à une température de 4 à 8°C. Certains fabricants ont ainsi prévu un compartiment réfrigéré pour le stockage des réactifs. Certains automates tels que le Kryptor (CIS-bio International[®]), bien que utilisant une technique révolutionnaire en phase homogène ("time resolved amplified cryptate emission") garantissant les meilleurs résultats en matière de sensibilité, de spécificité et de précision (6), n'ont pas trouvé le succès commercial escompté en raison d'un délai de stabilité trop court des réactifs spécifiques.

A l'intérieur de l'automate, les réactifs peuvent être prêts à l'emploi ou à reconstituer à chaque fois par l'analyseur. Certains fabricants ont pris leurs précautions pour éviter l'évaporation des réactifs : fermeture automatique du coffret après pipetage, packs de réactifs recouverts par une membrane en élastomère autoscellable après ponction par la sonde de distribution....

2- Gestion du stock de réactifs

La possibilité de connaître l'état du stock de réactifs à l'intérieur de l'automate est importante pour l'utilisateur afin d'assurer une bonne gestion des réactifs et d'éviter d'éventuelles interruptions. Elle est habituellement assurée par l'appareil à l'aide du suivi de

consommation (décompte) ou par détection de niveau des flacons de réactifs. Il est intéressant de savoir si la connaissance de l'état du stock peut être obtenue en position d'attente ("*stand-by*") uniquement ou même en cours de fonctionnement et s'il existe une alarme sonore ou visuelle pour la prévention de la rupture de stock.

3- Identification et distribution des réactifs

Il est préférable que les réactifs soient identifiés par un système code à barre intégré, ce qui permet d'éviter les erreurs et de détecter automatiquement les éventuelles péremptions. La distribution des réactifs peut se faire à l'aide de cônes à usage unique ou d'une sonde de prélèvement à usage multiple, auquel cas il est important, comme pour le pipetage des spécimens, de s'informer sur les procédés de décontamination.

Dans tous les cas, et comme la plupart des dosages en immuno-analyse se font dans un volume réactionnel très faible (de l'ordre de 100 µl) et impliquent le pipetage de volumes extrêmement réduits (quelques µl ou dizaines de µl à chaque fois) d'échantillons et de réactifs, la fiabilité de ces dosages tient pour une bonne partie à l'extrême précision des pipetages. C'est pourquoi il est important de s'assurer de la qualité de la précision mécanique de l'appareil et du contrôle automatique de cette précision.

L'homogénéisation du milieu réactionnel peut être obtenue par agitation, par des billes magnétiques ou par aspiration-refoulement successifs du liquide par le cône à usage unique.

IV Caractéristiques informatiques

- informatique incorporée dans l'automate ou extérieure.
- connexion au système informatique du laboratoire (S.I.L) mono ou bidirectionnelle, directe ou indirecte (nécessitant un micro-ordinateur supplémentaire)
- nombre et type de(s) microprocesseur(s)
- mémoire vive et mémoire de masse du disque dur en méga-octets et en nombre maximum de résultats et de dossiers
- type d'imprimante : matricielle, thermique, à jet d'encre ou laser
- écran et imprimante : couleur ou non, avec graphique ou non
- logiciel monotache ou multitache, sur DOS ou UNIX, avec environnement Windows ou Nextstep
- changement de version de logiciel : gratuit ou payant

CRITERES LIES AUX TECHNIQUE(S) IMMUNOLOGIQUE(S)

Il peut s'agir d'une méthode sans marqueur ou avec marqueur, en phase homogène ou en phase hétérogène, en un temps ou en 2 temps, avec lecture du signal en point final, en cinétique, ou en temps fixés.

I Méthodes sans marqueur

Ce sont les méthodes immuno-turbidimétriques et immuno-néphélométriques basées sur les principes de la réaction de précipitation immunologique quantitative en milieu liquide (Heidelberger, Kendall et Marrack) et ceux de la diffusion de la lumière dans les milieux troubles (Tyndal, Rayleigh et Mie) (7).

La formation des complexes immuns (particules en suspension) étant facilitée et amplifiée par l'addition de polyéthylène glycol (PEG) au tampon de dilution des échantillons et des immunsérums, on mesure soit l'intensité de la lumière transmise selon l'axe de propagation de la lumière incidente (turbidimétrie), soit l'intensité de la lumière diffusée selon un angle d'observation allant de 5° à 90° par rapport à l'axe de la lumière incidente (néphélométrie).

La mesure du signal peut être effectuée au bout d'un temps préfixé (15 à 20 minutes) obligatoirement le même pour tous les échantillons, étalons et contrôles. C'est la lecture en point final qui, en plus de la lenteur, a le grand inconvénient de ne pas détecter les échantillons avec excès d'Ag qui sont pris pour des échantillons faiblement concentrés voire négatifs (phénomène de zone) (8).

La lecture en cinétique, qui consiste à mesurer la vitesse maximum (V_{max}) de formation du précipité et le temps écoulé pour atteindre cette vitesse, permet d'éviter ces erreurs liées au phénomène de zone tout en écourtant significativement les temps de réaction (1 à 3 mn).

Certains fabricants ont opté pour la lecture en temps fixés. Il s'agit d'un mode de lecture intermédiaire où l'on calcule la moyenne de plusieurs mesures effectuées à des temps préfixés. Le temps de réaction est de l'ordre de 5 à 6 minutes et les échantillons avec excès d'Ag sont rapidement détectés grâce aux premières mesures.

Les méthodes néphélométriques et turbidimétriques automatisées ont l'avantage de la simplicité et de la rapidité. Ce sont des méthodes en phase homogène permettant de doser la plupart des protéines plasmatiques (certaines protéines peuvent être dosées dans les LCR ou les urines) avec un seuil de détection de l'ordre du milligramme voire du microgramme par millilitre ($\mu\text{g/ml}$). L'Ag à doser doit être polyvalent (comportant plusieurs épitopes) et les Ac polyclonaux (immunsérums).

L'utilisation récente de particules de latex ou de polystyrène ou d'autres microsphères hydrophyles de synthèse sur lesquelles peut être fixé l'Ac spécifique de l'Ag à doser, autorise l'utilisation d'Ac monoclonaux (9) et permet ainsi d'améliorer notablement la sensibilité (jusqu'à 100 fois plus) et d'élargir la gamme d'analyse à des Ag habituellement dosés avec les méthodes radio-immunologiques ou immuno-enzymatiques (7).

II Méthodes avec marqueur

Il peut s'agir de méthodes en phase homogène ne nécessitant aucune étape de séparation entre les complexes immuns formés et les réactifs en excès (Ag et Ac restés libres, qu'ils soient marqués ou non) ou, le plus souvent, de méthodes en phase hétérogène nécessitant l'adsorption de l'Ag ou de l'Ac sur une phase solide, la saturation de celle-ci et des lavages répétées (ou un autre mode de séparation : aimantation, élution...) après chaque étape pour éliminer les réactifs libres en excès.

La phase solide la plus couramment utilisée est représentée par les tubes en polystyrène, mais les billes et les micro-particules sont de plus en plus utilisées. En effet, elles augmentent considérablement la surface de contact (50 à 10 000 fois plus) accélérant ainsi la cinétique réactionnelle, ce qui permet de réduire les temps d'incubation. D'autre part, elles permettent d'optimiser les étapes de séparation lorsqu'elles sont aimantées.

Le réactif immunologique fixé sur la phase solide peut être l'Ag, l'Ac ou une antiglobuline (anti-IgM, anti-IgA...) pour les tests d'immuno-capture. Certains fabricants fixent de la streptavidine sur la phase solide, le premier Ac spécifique de l'Ag à doser étant biotinylé. D'autres fixent une antiglobuline (de chèvre ou de lapin...) anti-IgG de souris qui servira à capter le premier Ac monoclonal spécifique (produit chez la souris).

Les dosages en phase hétérogène peuvent obéir à un protocole en un temps ou à 2 temps. Dans le premier cas, l'échantillon à doser et l'Ac (ou l'Ag) marqué sont incubés en même temps avec la phase solide sensibilisée. Ce procédé est connu pour être fortement susceptible à l'effet dit de prozone (équivalent du phénomène de zone dans les réactions de précipitation) avec risque de résultats faussement négatifs ou paradoxalement bas pour des échantillons ayant en fait des titres très élevés (10). Les risques d'erreur liés au phénomène de prozone peuvent être minimisés par la limitation de l'amplitude de la courbe de calibration, la réduction du volume prélevé de l'échantillon et/ou l'introduction d'une étape de lavage avant l'addition du conjugué (procédé en 2 temps) (11).

Le protocole en 2 temps implique une étape obligatoire de séparation éliminant l'excès d'Ag non fixé avant l'addition du conjugué. Ce procédé permet d'éviter les erreurs liées à l'effet de

prozone et la plupart de celles liées à l'effet crochet ou "*Hook effect*", surtout lorsque la phase solide est constituée de microparticules (11).

Que ce soit en phase homogène ou en phase hétérogène, les 2 types de dosage les plus utilisés en immuno-analyse avec marqueur sont les dosages en "*sandwich*" et les dosages par compétition.

Dans les **dosages en sandwich**, l'Ag à doser est pris d'un côté par l'Ac spécifique préalablement fixé sur la phase solide, et de l'autre par l'Ac spécifique marqué. Selon que les 2 épitopes (déterminants antigéniques) sont similaires ou non, les 2 Ac peuvent être identiques ou différents.

Dans les **dosages en compétition**, l'Ag (ou l'Ac) à doser entre en compétition avec une quantité définie de l'Ag (ou de l'Ac) marqué pour la fixation sur des sites anticorps (ou des sites antigéniques) apportés en quantité limitante.

Les dosages par compétition, dont la majorité utilisent des Ac polyclonaux, sont beaucoup plus susceptibles aux problèmes de réactions croisées et aux risques d'erreurs par excès qu'elles peuvent engendrer que les dosages de type sandwich qui impliquent une double reconnaissance épitopique et utilisent des Ac monoclonaux (1).

Le marqueur utilisé pour révéler la réaction Ag-Ac spécifique peut être une enzyme, un fluorochrome ou un luminogène. La mesure du signal peut se faire en monochromatique ou mieux en bichromatique (pour éliminer les interférences éventuelles).

L'enzyme choisie doit être absente des milieux biologiques et pouvoir être couplée facilement aux molécules d'Ac et d'Ag. Le conjugué (Enz-Ac ou Enz-Ag), tout en restant soluble et stable, doit conserver l'activité catalytique de l'enzyme et l'activité spécifique de l'Ac (ou l'antigénicité de l'Ag). Le substrat utilisé doit engendrer une réaction enzymatique simple, rapide et sensible.

Pour une même enzyme et en fonction du substrat choisi, il est possible d'avoir un signal optique (réaction colorée visible à l'œil nu et mesurable par spectrophotométrie) ou mieux un signal fluorescent ou luminescent mesurable par luminométrie et pouvant être jusqu'à 5 000 fois plus sensible que le signal photonique classique (12, 13).

Afin d'éviter la susceptibilité des réactions enzymatiques aux variations des conditions physio-chimiques (pH, température, force ionique...), de nombreux fabricants ont opté pour le marquage direct de l'Ac ou de l'Ag avec un fluorochrome ou avec un luminogène dont l'excitation avec un faisceau lumineux (ou une différence de potentiel appliquée à l'électrode où sont maintenues les microparticules aimantées recouvertes des complexes immuns) entraîne la rémission d'un rayonnement de longueur d'onde éloignée (3). Plusieurs protocoles

de mesure ont été développés pour ce type de dosage : polarisation de fluorescence (Abott), transfert de l'énergie de fluorescence (Syva-Mérieux[®]), électrochimiluminescence (Boehringer-Roche[®])...

Indépendamment des techniques d'immunodosage, la fiabilité des dosages immunochimiques dépend en grande partie de la **qualité des réactifs immunologiques utilisés** :

- qualité des Ac : spécificité et affinité pour l'Ag correspondant, pureté, homogénéité, stabilité...

- qualité des préparations antigéniques : pureté et homogénéité (surtout pour les extraits naturels), spécificité (les procédés de purification de l'Ag naturel peuvent en altérer l'antigénicité, l'Ag recombinant produit par génie génétique peut ne pas reproduire l'intégralité des déterminants antigéniques de l'Ag naturel (14).

AUTRES CRITERES

I Les besoins du laboratoire

En plus des performances de l'automate, de la fiabilité et de la qualité des techniques et des réactifs immunologiques utilisés, le choix de l'automate doit se faire en fonction des besoins et des contraintes du laboratoire notamment en matière de cadence (nombre total d'examens d'immunoanalyse réalisés par jour), de diversité des examens à pratiquer au laboratoire (hormonologie, allergie, marqueurs tumoraux, médicaments...) et d'encombrement (grandeur, poids, charge au sol).

II Le coût

Le coût est souvent une contrainte difficile même si de nombreux fournisseurs proposent de plus en plus la solution de mise à disposition. Dans tous les cas, il est important de bien évaluer de façon comparative le rapport qualité-prix de chaque automate et de ses kits en y incluant les réactifs complémentaires nécessaires (diluants, conjugués, solutions de lavage...) lorsqu'ils sont vendus séparément.

III Le service après vente

L'existence d'un vrai service après-vente (S.A.V), le sérieux, la technicité et la disponibilité, en un mot le professionnalisme du représentant en Tunisie du fabricant de l'automate est un élément important de la décision amenant à choisir tel ou tel automate.

Le S.A.V doit inclure aussi les renseignements concernant les microcoupures du courant (onduleur), la maintenance (périodicité, vidéomaintenance, autogérée ou manuelle, coût), la formation (sur place ou chez le fournisseur, formation utilisateur et formation

ingénieur biomédical), la documentation (manuels d'utilisation et de maintenance, manuel de circuits intégrés) et enfin la prévention des risques biologiques (protocoles de décontamination et gestions des effluents).

Remerciements : L'auteur remercie le Professeur Mohamed Fadhel NAJAR pour sa lecture critique de l'article.

Références

1- *Piketty ML., Lebtahi R., Dumont A., Chevenne D., Dilouya A..*

La réaction croisée en immuno-analyse.

Immunoanal Biol Spéc. 1994. 9, 285 - 292.

2- *Gosling JP.*

A decade of development in immunoassay methodology.

Clin Chem. 1990. 36, 8, 1408 – 1427.

3- *Kricka LJ.*

Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays.

Clin Chem. 1994. 40, 3, 347 – 357.

4- *Messinger H.G.*

1994 : l'immuno-analyse à l'échelles européenne. Prospective et perspectives.

Immunoanal Biol Spéc. 1994, 9, 275 – 278.

5- *Comité scientifique de la Société Française de Biologie Clinique.*

Descriptif standardisé des analyseurs de biologie. Version automate d'immunoanalyse.

Ann Biol Clin. Numéro spécial, Mars 1998 , 12 – 34.

6- *Moutereau S., Rymer JC.*

Kryptor- Evaluation finale en situation de routine.

Immunoanal Biol Spéc. 1998. 13, 307 –316.

7- *Vassault A., Fievet P.*

Néphélométrie - Turbidimétrie.

Commission instrumentation de la Société Française de Biologie Clinique.

8- Duheille J., Hurez D.

Immunoprécipitation .

In : Méthodes en Immunologie.

Association des enseignants d'Immunologie des universités de langue française

MEDSI / Mc GRAW-HILL, 1990 .

9- Milstein C.

Les anticorps monoclonaux.

Pour la Science. Edition française de Scientific american. 1986. 38, 46-55.

10- Rymer JC.

Que peut attendre le malade aujourd'hui des dosages des marqueurs tumoraux ? Pièges en immuno-analyse.

Immunoanal Biol Spéc. 1993. 8, 258-261.

11- Naudin C.

Problèmes posés par la validation de techniques d'immunoanalyse. Etude de l'infléchissement de la courbe à haute concentration d'antigène ou effet crochet (Hook effect).

In : Cahier de Formation Biochimie. Assurance de qualité, Tome II, 41-43 Société Française de Biologie Clinique , 1994.

12- Nicolas JC., Terouanne B. et al.

Le point sur les marqueurs chimioluminescents et bioluminescents en immuno-analyse.

Immunoanal Biol Spéc. 1992. 34, 25 - 29.

13- Ternynck Th., Avrameas S.

Techniques immuno-enzymatiques.

Collection Techniques en Immunologie.

Société Française d'Immunologie. Editions INSERM , 1987.

14- Niccoli P., Ferrand V., Lejeune PJ, Carayon P.

Interest of Epitopic Dissection in Immunoanalysis of Proteins and Peptides : Review of Theoretical and Practical Aspects.

Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996. 34, 741 – 748.