

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Electrophorèse des protéines
Recherche d'immunoglobuline monoclonale
Anticorps anti-nucléaires

Stéphanie ALBAREDE, Anne GUYARD (Afssaps)
Alain DAUNIZEAU (CH - Lens)
Jacques DE GRAEVE (CHU – Toulouse)
Bach-Nga PHAM (INTS - Paris)

Expédition : 06 juin 2007

Clôture : 02 juillet 2007

Edition des comptes-rendus individuels :

Paramètres contrôlés : **07G9 – Electrophorèse des protéines (fractions en %)**

Recherche d'immunoglobuline monoclonale

07G8 – Anticorps anti-nucléaires

Nombre de laboratoires concernés* : 2330

Nombre de laboratoires participants** : 2243

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer les analyses concernées par l'envoi

**Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

L'opération 07AT11 a concerné les laboratoires ayant déclaré pratiquer l'électrophorèse des protéines, et/ou la recherche d'immunoglobuline monoclonale, et/ou la recherche d'anticorps anti-nucléaires.

L'échantillon 07G9 était un plasma normal contenant pas d'immunoglobuline monoclonale. La présence de fibrinogène dans l'échantillon donnait lieu à un pic étroit dans la zone des gamma-globulines rapides au niveau de l'électrophorèse des protéines (support gel d'agarose). En électrophorèse capillaire (automate Capillarys), les modifications de la fraction bêta 2 globulines par rapport à un sérum normal devaient faire suspecter une anomalie. L'analyse d'un plasma à la place d'un sérum a permis de mettre en évidence un manque de spécificité de certains anti-sérums utilisés pour la recherche d'une immunoglobuline monoclonale. Ceci explique en partie le taux de mauvaises réponses « présence d'une immunoglobuline monoclonale » ou « présence d'une protéine de Bence Jones » (2,7%).

L'échantillon 07G8, sérum d'une patiente atteinte de sclérodémie, contenait des anticorps anti-nucléaires avec un titre de 1 :320. Le taux de bonnes réponses, c'est à dire « résultat positif » en test de dépistage en immunofluorescence indirecte n'est que de 88,7%. Ce taux montre que cette technique de dépistage n'est pas complètement maîtrisée par tous les laboratoires.

La grande disparité des résultats concernant les anticorps anti-ADN natif ou les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles souligne la complexité du diagnostic biologique en auto-immunité liée au manque de standardisation des techniques, et rappelle que Clinique et Biologie ne peuvent être dissociées.

Méthode statistique et expression des résultats

1 – Electrophorèse des protéines

Pour les résultats quantitatifs (fractions protéiques en %), l'analyse statistique a comporté les étapes suivantes, appliquées à l'ensemble des résultats et à l'intérieur de chaque groupe technique :

- élimination des valeurs aberrantes (ex : erreurs grossières de type erreur d'unité, de transcription...) sur l'effectif non tronqué (N).
- calcul de la valeur cible, c'est-à-dire moyenne (m) obtenue après double troncature à deux écarts-types ; cette double troncature permet d'éliminer les valeurs extrêmes ; la valeur cible obtenue est toujours très proche de la médiane.
- l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) obtenus après cette double troncature sont considérés comme représentatifs de la dispersion des résultats.

2 – Titrage des anticorps anti-nucléaires.

La médiane des titres obtenus sur cellules HEP2 a été calculée à partir des titres en inverse de dilution.

Echantillon 07G9

Electrophorèse des protéines et/ou recherche d'immunoglobuline monoclonale

Le nombre de laboratoires ayant effectué au moins une des analyses sur l'échantillon 07G9 est de 1876. La répartition selon les analyses est la suivante :

- 1335 laboratoires ont effectué l'électrophorèse des protéines et la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale,
- 513 laboratoires ont effectué uniquement l'électrophorèse des protéines,
- 28 laboratoires ont effectué uniquement la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale.

Définition de l'échantillon

L'échantillon 07G9 était un plasma liquide d'origine humaine.

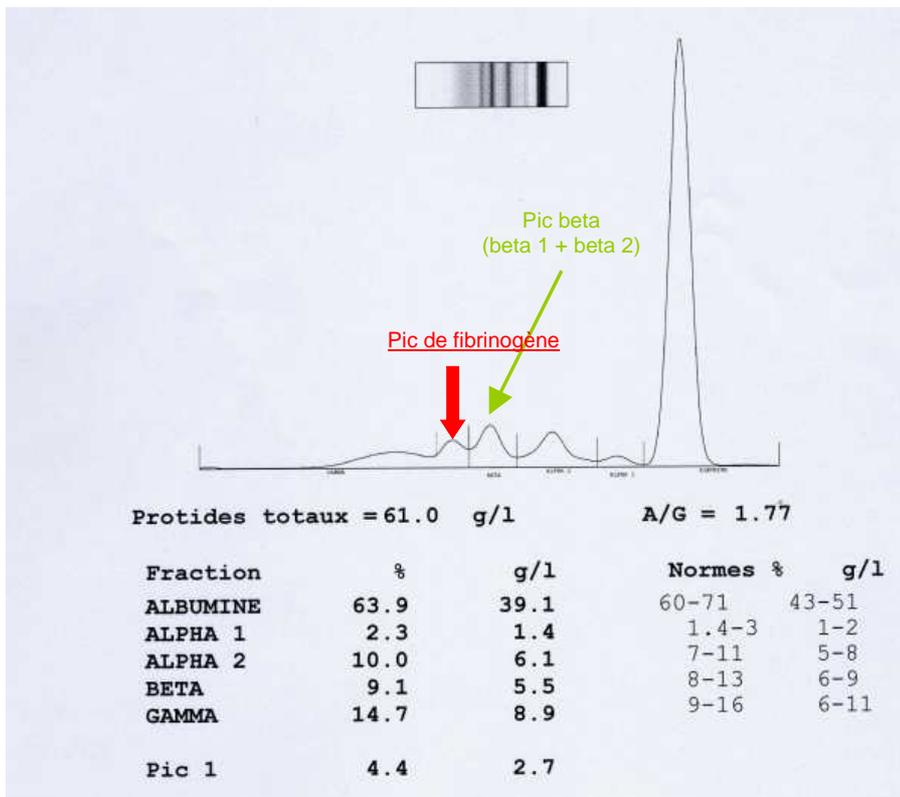
Les commentaires des experts figurent aux paragraphes 1 et 2 ci-dessous :

Dr J. Bienvenu (C.H. Lyon sud – Lyon - 69), Dr A. Chevaillier (CHU – Angers - 49), Dr J. De Graeve (C.H.U Ranguel – Toulouse - 31), Dr A. Daunizeau (C.H. Schaffner – Lens - 62), Dr JM Gombert (Hôpital de la Milétrie – Poitiers - 86).

1 – Electrophorèse des protéines

Réponses attendues, obtenues à partir des réponses des experts : présence d'un pic étroit dans la zone des gamma-globulines rapides correspondant à du fibrinogène (figure 1).

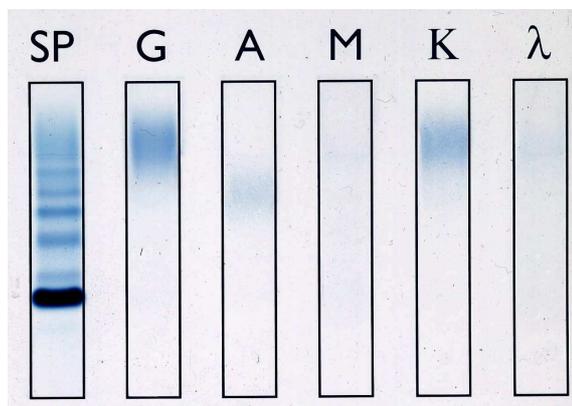
Figure 1 : Exemple d'un tracé électrophorétique obtenu avec l'échantillon 07G9 (gel d'agarose, noir amide)



2 – Recherche de l'immunoglobuline monoclonale

Résultat attendu obtenu à partir de la réponse des experts : Absence d'immunoglobuline monoclonale (figure 2).

Figure 2 : Immunofixation obtenue avec l'échantillon 07G9



Résultats des participants

1 – Electrophorèse des protéines

Le nombre de laboratoires ayant répondu pour cette analyse est de 1848.

Ce nombre est en constante diminution : 2191 laboratoires avaient répondu pour cette analyse en 2004 ; 1993 laboratoires en 2005 et 1937 en 2006 ; soit une diminution de 15,6% en 3 ans.

1 – 1 - Méthodes et réactifs

Les méthodes et réactifs utilisés sont présentés dans le tableau I.

Le support le plus utilisé est le gel d'agarose : 79,3% d'utilisateurs (contre 82,3% en 2006). L'acétate de cellulose n'est plus utilisé que par 2,9% de laboratoires (contre 3,1% en 2006).

L'électrophorèse capillaire poursuit sa progression avec 17,3% d'utilisateurs (319 laboratoires) contre 14,3% (277 laboratoires) en 2006, 10% (200 laboratoires) en 2005 et 4,6% (101 laboratoires) en 2004.

Concernant le choix du colorant, sur gel d'acétate de cellulose, seul le rouge ponceau est utilisé. Parmi les 1465 utilisateurs de gel d'agarose, le noir amide (amidoschwarz) est le plus souvent utilisé (84,7% des utilisateurs). Puis, viennent le bleu acide utilisé par 223 laboratoires (15,2%) et le rouge ponceau utilisé par 1 laboratoire (moins de 0,1%).

Tableau I – Electrophorèse des protéines (%) – Echantillon 07G9 – Méthodes et réactifs utilisés

Méthodes	Nombre d'utilisateurs	%
Support Acetate de cellulose - rouge ponceau [cell-Pon]	54	2,9
Elitech (Helena), Titan III Protéines (rouge ponceau)	52	
Olympus, Hite System (rouge ponceau)	2	
Support Agarose - amidoschwarz (noir amide, amido black) [aga-Schw]	1241	67,2
Beckman Coulter, Paragon SPE	6	
Biomidi, Midigel Protéines	10	
Elitech (Helena), Titan Gel Protéines (HR) (amidoschwarz)	3	
Elitech (Helena), Kit REP SPE Appicateurs (amidoschwarz)	4	
Elitech (Helena), Kit REP b1-b2 Appicateurs (amidoschwarz)	6	
Sebia, Hydragel b1-b2 [HYDRASYS]	135	
Sebia, Hydragel (Hydratest) (HR) Protein(e) [HYDRASYS]	834	
Sebia, Hydragel Protein(e) K20 (amidoschwarz)	243	
Support Agarose - bleu acide [aga-Bleu]	223	12,1
Elitech (Helena), Kit (Titan) Protéines 2000 (bleu acide)	80	
Elitech (Helena), SAS-MX Serum Protein (bleu acide)	47	
Elitech (Helena), SAS-MX Serum Protein SB (bleu acide)	18	
Elitech (Helena), SAS-1 Serum Protein (bleu acide)	74	
Elitech (Helena), SAS-1 Serum Protein SB (bleu acide)	4	
Support Agarose - rouge ponceau [aga-Pon]	1	0,05
Elitech (Helena), REP (rouge ponceau)	1	
Electrophorèse capillaire [capillaire]	319	17,3
Beckman Coulter, Paragon CZE 2000 (SPE kit)	22	
Sebia, Capillarys Protein(e) 5/6/HR	297	
Non précisés	10	0,5

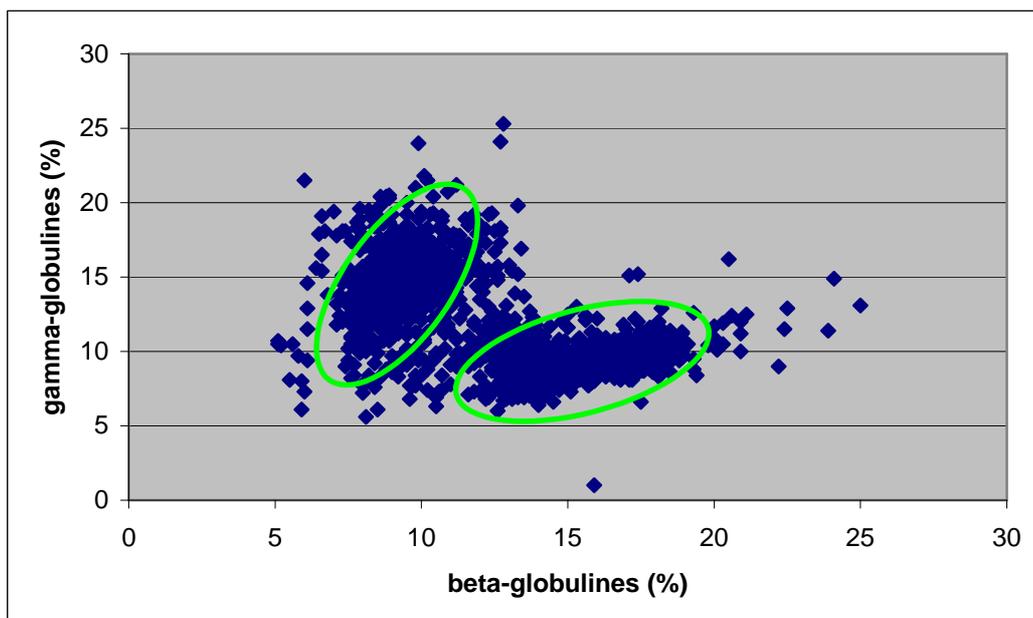
1– 2 - Résultats quantitatifs

L'analyse statistique des résultats quantitatifs (fractions protéiques en %) est reportée dans le tableau II. Les coefficients de variation élevés reflètent l'hétérogénéité des résultats comme le montrent la figure 3. En effet, l'expression graphique des résultats bêta-globulines versus gamma-globulines (figure 3) met en évidence l'existence de deux nuages de points distincts. Cette variabilité s'explique par le fait que les laboratoires n'ont pas tous traité l'échantillon de la même façon. Dans certains cas, les résultats ont été rendu après traitement de l'échantillon avec de la thrombase. Dans d'autres cas, en absence de traitement avec la thrombase, le pic de fibrinogène a été intégré par les participants soit en bêta soit en gamma-globulines. Concernant l'automate capillarys de la société Sébia (génération 1 ou 2), il n'y avait pas de pic observable mais une fraction bêta 2 supérieure à la fraction bêta1 et présentant une forme élargie.

Tableau II – Electrophorèse des protéines – Echantillon 07G9 : résultats quantitatifs (fractions protéiques en %)

Réactifs - Appareil	N	Albumine		α 1-globulines		α 2-globulines		β -globulines		γ -globulines	
		m	CV(%)	m	CV(%)	m	CV(%)	m	CV(%)	m	CV(%)
Ensemble des résultats	1786	63,2	4,7	2,6	21,5	10,0	10,6	12,4	23,9	11,3	24,6

Figure 3 - Electrophorèse des protéines – Echantillon 07G9 : Béta-globulines (%) versus gamma-globulines (%)



1- 3 – Analyse du tracé

La présence du pic de fibrinogène a été observée soit en position gamma soit en position bêta par 1045 participants soit 56,7% (tableau III). Parmi les 209 réponses « Augmentation de la fraction bêta2-globulines » et « Augmentation de la fraction bêta-globulines », 64 ont été rendu par des utilisateurs de l'automate Capillarys.

Tableau III – Electrophorèse des protéines – Echantillon 07G9 : Analyse du tracé

Analyse du tracé	Effectif
Pic étroit dans la zone des gamma-globulines.	557
Pic étroit dans la zone des bêta2-globulines.	383
Diminution de la fraction gamma-globulines.	283
Pas de commentaire particulier.	208
Augmentation de la fraction bêta2-globulines.	137
Pic étroit dans la zone des bêta-globulines.	101
Augmentation de la fraction bêta-globulines.	72
Hypoalbuminémie.	12
Restriction d'hétérogénéité des gamma-globulines.	11
Diminution de la fraction bêta-globulines.	9
Pic étroit dans la zone des bêta-globulines + pic étroit dans la zone des gamma-globulines.	7
Bande large dans la zone des gamma-globulines.	7
Augmentation de la fraction gamma-globulines.	7
Augmentation de la fraction alpha2- globulines.	6
Augmentation de la fraction alpha1-globulines.	5
Bisalbinémie.	4
Pic étroit dans la zone des bêta1-globulines.	4
Diminution de la fraction alpha2- globulines.	4
Bloc beta-gamma.	3
Augmentation de la fraction bêta1-globulines.	2
Profil oligoclonal.	2
Pic étroit dans la zone des alpha-globulines + pic étroit dans la zone des gamma-globulines.	1

1- 4 – Commentaires

La présence de fibrinogène a été signalée par 47,7% des participants (tableau IV).

Tableau IV – Electrophorèse des protéines – Echantillon 07G9 : Commentaires

Commentaires	Effectif
Présence de fibrinogène	882
Aucun commentaire à ajouter	776
Présence de lipides	28
Présence de cryoglobuline	19
Prélèvement hémolysé	6

1- 5 – Analyse des résultats

Le taux de 56,7% de laboratoires ayant observé la présence d'un pic étroit à l'électrophorèse des protéines peut paraître insuffisant. En réalité, ce taux reflète l'utilisation de techniques d'électrophorèse différentes. Si le pic étroit était visible en électrophorèse sur gel d'agarose, il était mal voire non individualisé en technique d'électrophorèse capillaire. En ce qui concerne l'automate Capillarys, la présence d'une fraction bêta 2 supérieure à la fraction bêta 1, avec une forme élargie, devait faire suspecter une anomalie et entraîner des examens complémentaires. Le fabricant recommande dans ce cas de superposer la courbe du patient à celle d'un sérum normal pour vérifier ces variations. L'hypothèse d'une augmentation de la fraction C3 du complément (entraînant $\beta 2 > \beta 1$) pouvait être exclue en l'absence d'un profil de type inflammatoire. Il fallait donc s'orienter vers la présence de fibrinogène ou d'une bande monoclonale.

2 – Détection et caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale

Le nombre de participants est de 1363, nombre identique à celui de 2006.

2 – 1 – Techniques et réactifs

Le bordereau réponse permettait aux laboratoires de saisir deux réactifs au plus : un réactif relevant de la technique d'immunofixation et un réactif relevant d'une autre technique. L'ensemble des réactifs utilisés est détaillé dans le tableau V.

L'analyse des réponses montre que :

- 1116 laboratoires utilisent uniquement la technique d'immunofixation.
- 231 laboratoires utilisent uniquement un réactif relevant d'une technique autre que l'immunofixation
- 16 laboratoires utilisent deux techniques dont l'immunofixation.

L'électrophorèse capillaire continue son ascension avec 17,4% d'utilisateurs contre 13% en 2006 au détriment de l'immunofixation. Cette dernière reste cependant majoritairement utilisée avec 83% d'utilisateurs contre 88% en 2006.

Le nombre d'utilisateurs d'Immunoélectrophorèse reste inchangé et bas : 10 contre 11 en 2006.

2 – 2 – Résultats

La réponse « Absence d'immunoglobuline monoclonale » a été rapportée par 89,5% des participants (tableau V). Trois laboratoires n'ont pas réalisé l'analyse, considérant l'échantillon non conforme vu la présence de fibrinogène.

On note 5,5% de biologistes qui, en routine, auraient transmis l'échantillon pour qu'il soit testé en présence de sérum anti-IgE et anti-IgD.

Le pourcentage de mauvaises réponses, c'est à dire le nombre de réponses signalant une anomalie monoclonale (tableau VI), est de 2,7%. Parmi ces 37 réponses erronées, 19 signalent la présence d'une protéine de Bence Jones Lambda soit 51%.

2 – 3 – Analyse des résultats

Comme en 2005 (05AT12), une sur représentation des erreurs liées à la détection d'une protéine de Bence Jones de type Lambda a été notée. Il semblerait que, pour ces deux contrôles, la présence de fibrinogène interfère avec les anti-sérums anti-chaînes libres Lambda. Cette remarque souligne l'importance du temps pré-analytique.

2 – 4 – Conséquence de l'opération 07G9

Suite à cette opération, le Département de l'Evaluation Externe de la Qualité a déposé un signalement au Département de Vigilance, concernant l'ensemble des réactifs ayant donné lieu à des interférences (tableau VI : réactifs commercialisés par la Société Helena Biosciences et la Société Sébia). Parallèlement, l'unité de Réactovigilance de l'Afssaps a reçu un signalement d'un laboratoire rapportant l'apparition d'une bande parasite au niveau des chaînes légères lambda (technique d'immunofixation), lors de l'utilisation de « l'antisérum chaîne légère lambda » commercialisé par la société Helena Biosciences. La bande parasite était bien due à la présence de fibrinogène dans l'échantillon, fibrinogène reconnu par manque de spécificité par l'anti-sérum anti-lambda. La notice d'utilisation du réactif recommande de travailler de préférence sur sérum sans proscrire l'utilisation de plasma. Suite à cet incident, Helena Bioscience a donc pris la décision de modifier son système de contrôle de qualité lors de la libération des lots d'antisera pour améliorer leur spécificité. Tous les nouveaux lots sont désormais testés à la fois sur plasma et sur sérum et tous ceux susceptibles de reconnaître le fibrinogène sont écartés de la distribution. Les utilisateurs concernés ont été informés le 13 Septembre 2007, par la société Elitech distributeur des produits Helena Biosciences, que les lots d'antisera peuvent dorénavant être utilisés sans distinction sur sérum et sur plasma. Concernant les réactifs de la société Sébia, les notices précisent dans la rubrique « Echantillon à éviter » : « ne pas utiliser de plasma. Le fibrinogène donne une bande proche du point de dépôt. Cette bande peut fausser l'interprétation du test (confusion avec une gammopathie) ».

Conclusion

Si la distribution d'un plasma plutôt que d'un sérum a suscité de nombreux commentaires de la part des biologistes participant au Contrôle National de Qualité en Immunopathologie (prélèvement n'entrant pas théoriquement dans les conditions pré-analytiques requises pour l'analyse), cet échantillon n'en a pas moins permis de repérer le manque de spécificité inacceptable de certains réactifs. Cette opération était d'autant plus intéressante qu'elle démontre aux biologistes l'importance de participer au Contrôle National de Qualité à travers le lien qui existe avec la Réactovigilance, afin de répondre au mieux au système qualité en Biologie.

Tableau V – Recherche d'immunoglobuline monoclonale – Echantillon 07G9 : résultats par réactifs

Réactif d'immunofixation	Autre réactif	n	Absence d'Ig monoclonale	Prélèvement transmis pour tests en présence de sérums anti-IgD et anti-IgE	Présence d'une anomalie monoclonale	A traiter au mercapto-ethanol	Absence de réponse	Ininterprétable	Prélèvement non conforme
Tous réactifs confondus		1363	1220	75	37	11	10	7	3
BECKMAN Paragon IFE		8	6	1	1				
ELITECH / HELENA Kit Titan gel IFE 2000		41	36	1	4				
ELITECH / HELENA SAS-3 Immunofix		11	8		1		1	1	
ELITECH / HELENA SAS-I Immunofix		35	26	6	3				
ELITECH / HELENA SAS-MX Immunofix		16	12	2	1			1	
SEBIA Hydragel Bence Jones K20		2	2						
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 Bence Jones (MD) [Hydrasys]		4	1		3				
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 Bence Jones (MS) [Hydrasys]		2	1		1				
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasys]		536	490	32	10		2	1	1
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasys]		275	246	19	9		1		
SEBIA Hydragel 2 IF/BJ (HR) (MS) [Hydrasys]		15	13	2					
SEBIA Hydragel 3/6 CSF (MS) [Hydrasys]		1	1						
SEBIA Hydragel IF K20 / double IF K20		151	123	8	3	10	2	3	2
SEBIA Hydragel IF Penta K20		12	10	2					
Autres		7	6		1				
	BECKMAN Paragon IEP	1	1						
	BECKMAN Electrophorèse capillaire	16	15				1		
	SEBIA Hydragel IEP sans antiserum [K20]	4	3			1			
	SEBIA Capillars Immunotyping	210	205	1			3	1	
BECKMAN Paragon IFE	BECKMAN Electrophorèse capillaire	1	1						
ELITECH / HELENA Kit Titan gel IFE 2000	BECKMAN Electrophorèse capillaire	1	1						
ELITECH / HELENA SAS-3 Immunofix	Immunoélectrophorèse « maison »	1	1						
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasys]	SEBIA Hydragel IEP sans antiserum [K20]	3	3						
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasys]	SEBIA Capillars Immunotyping	7	6	1					
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasys]	SEBIA Capillars Immunotyping	2	2						
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasys]	Immunoélectrophorèse « maison »	1	1						

Tableau V I – Recherche d'immunoglobuline monoclonale – Echantillon 07G9 : type d'immunoglobuline monoclonale caractérisée par réactifs

Réactif d'immunofixation	n	IgG Kappa	IgA Kappa	IgA Lambda	IgE Lambda	IgM Lambda	PBJ Lambda*	IgD ou IgE lambda + PBJ Lambda
BECKMAN Paragon IFE (réf : 444930 / 446390)	8	1						
ELITECH / HELENA Kit Titan gel IFE 2000 (réf : 21016)	41		1	1	1	1		
ELITECH / HELENA SAS-3 Immunofix (réf : 300300)	11						1	
ELITECH / HELENA SAS-I Immunofix (réf : 200300)	35						2	1
ELITECH / HELENA SAS-MX Immunofix (réf : 100300)	16				1			
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 Bence Jones (MD) [Hydrasys] (réf : 4321/4322/4324/4383)	4						3	
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 Bence Jones (MS) [Hydrasys] (réf : 4821/4822/4824/4883)	2						1	
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasys] (réf : 4301/4302/4304/4308/4309/4381/4382)	536		2				8	
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasys] (réf : 4801/4802/4804/4808/4809/4881/4882)	275	4	2				3	
SEBIA Hydragel 2 IF/BJ (HR) (MS) [Hydrasys] (réf : 4803)	15							
SEBIA Hydragel 3/6 CSF (MS) [Hydrasys] (réf : 4850/4851)	1							
SEBIA Hydragel IF K20 / double IF K20 (réf : 3031/3036/3222)	151			2			1	
Autres	7						1	
<i>Tous réactifs confondus</i>	<i>1102</i>	<i>5</i>	<i>7</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>19</i>	<i>1</i>

* protéine de Bence Jones Lambda

Echantillon 07G8

Anticorps anti-nucléaires

Définition de l'échantillon

L'échantillon est un sérum liquide d'origine humaine.

Les experts suivants : Dr C. André (CHU Henri Mondor – Créteil), Dr N.Fabien (CH Lyon Sud – Lyon), Dr F. Fortenfant (Hôpital de Rangueil – Toulouse), Dr C. Johanet (Hôpital St Antoine - Paris), Pr P. Youinou (CHU – Brest) ont testé l'échantillon 07G8.

Ils ont répondu de façon unanime :

- **pour le dépistage des anticorps anti-nucléaires en IFI sur cellules HEp2** : dépistage positif avec un titre moyen de 1:320 et un aspect de fluorescence homogène +/- moucheté, ou +/- nucléolaire selon les experts.

- **pour l'identification** :

o Recherche d'anticorps anti-ADN natif :

- Techniques de Farr et cytométrie : résultats négatifs
- Techniques ELISA et d'immunofluorescence indirecte (IFI) : pas de consensus

o Recherche d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles :

Quelle que soit la technique utilisée, la recherche des anticorps anti-Sm, anti-(U1) RNP, anti-SS-B, anti-JO1 et anti-SCL 70 est négative. Pour la recherche des anticorps anti-SS-A, les résultats dépendent de la technique employée :

- Techniques ELISA et immunofluorométrie de flux : résultat négatif
- Technique immunodot : résultat douteux (réactivité anti-Ro52)
- Technique Ouchterlony :
 - Sur cellules lymphoïdes humaines : présence d'anticorps anti-SS-A
 - Sur rate humaine : résultat douteux
 - Sur thymus de lapin : absence d'anticorps anti-SS-A

Résultats des participants

1 – Dépistage des anticorps anti-nucléaires

Le nombre de participants ayant réalisé le dépistage des anticorps anti-nucléaires sur cellules HEp2 pour l'échantillon 07G8 est de 597.

1 – 1 Matériel et méthodes : immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2.

Grossissement de l'objectif : le grossissement utilisé a été précisé par 587 laboratoires. Les grossissements x40 et x50 sont utilisés par 96% des participants (tableau VII). Ce pourcentage est stable depuis 2005 (05AT11).

Tableau VII : IFI sur cellules HEp2 - Grossissement de l'objectif utilisé par les participants

Grossissement	Effectif
16	2
20	7
25	8
40	491
50	66
57	1
60	2
63	2
80	1
100	7

Dilution de dépistage : 14 laboratoires n'ont pas renseigné cet item. Les dilutions de dépistage 1:80 et 1:100 sont utilisées par 85,1% des participants contre 84,8% en 2006 et 80,5% en 2005 (tableau VIII).

Tableau VIII : IFI sur cellules HEp2 - Dilution de dépistage utilisée par les participants

Titre de dépistage en inverse de dilution	Effectif
20	1
30	1
40	46
50	4
80	441
100	56
128	1
160	26
200	2
320	5
640	1

Réactifs : Les réactifs utilisés par les participants sont répertoriés dans le tableau IX. Les cellules HEp 2000 sont employées par 20,6% des utilisateurs. Ce taux diminue lentement depuis 2003 : 25,7% en 2003, 23,9% en 2005 et 21,3% en 2006.

Tableau IX : IFI sur cellules HEp2 – réactifs utilisés par les participants

Réactif	Effectif
BIO-RAD Quantafluor Lame HEp2	178
BIOADVANCE IF-HEp2 / Foie de primate	22
BIOADVANCE IF-HEp20-10 / Foie de primate	7
BIOADVANCE IFI : HEp2 anti ANA	63
BIOADVANCE IFI : HEp20-10 anti ANA	94
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Coffret Hep 2000	17
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Coffret HEp 2000 (ANA-Ro)	57
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS HEp 2000 (lames et conjugué)	28
DIAMED ANA Hep-2 cells IFA (Gamme DIAMEDIX)	1
DIAMED Kit Tests AAN HEp2 coffret complet (Gamme ZEUS)	7
DIAMED Lame HEp2 (Gamme ZEUS)	9
DIASORIN Anafluor	1
IMMUNOCONCEPT ANA-Ro fluorescent HEp2000	21
INGEN / ZEUS ANA HEp2 IFI (ref 24012B)	3
INSTITUT J.BOY HEp2.ANA	5
INSTITUT J.BOY LAMES HEp2	1
MENARINI DIAGNOSTICS Nova- lite ANA HEp2	19
ORGENTEC Cellules HeP2 Coffret	13
ORGENTEC Cellules HeP2 lames	2
SERVIBIO ServIF Hep	9
THE BINDING SITE Coffret ANA cellules HEp2 - technologie AIM	2
THE BINDING SITE Kit ANA cellules HEp2	20
THE BINDING SITE Lames HEp2	2
Technique "maison"	4
non précisé ou code erroné	12

Les réactifs utilisant des cellules Hep 2000 sont signalés en gras

1 – 2 Résultats

Concernant les 595 résultats qualitatifs recueillis, on observe 528 résultats positifs et 67 résultats négatifs, soit 88,7% de bonnes réponses. Les résultats négatifs ne sont pas liés à un réactif en particulier. Parmi ces réponses erronées, 3 ont été obtenues avec un grossissement inadéquat et 8 avec une dilution de dépistage non adaptée.

L'aspect de la fluorescence a été rendu homogène par 60,2% de laboratoires et moucheté par 36,7%. On note que 2,5% rendent un aspect nucléolaire (Tableau X). Cette réponse n'est pas reliée à un réactif particulier.

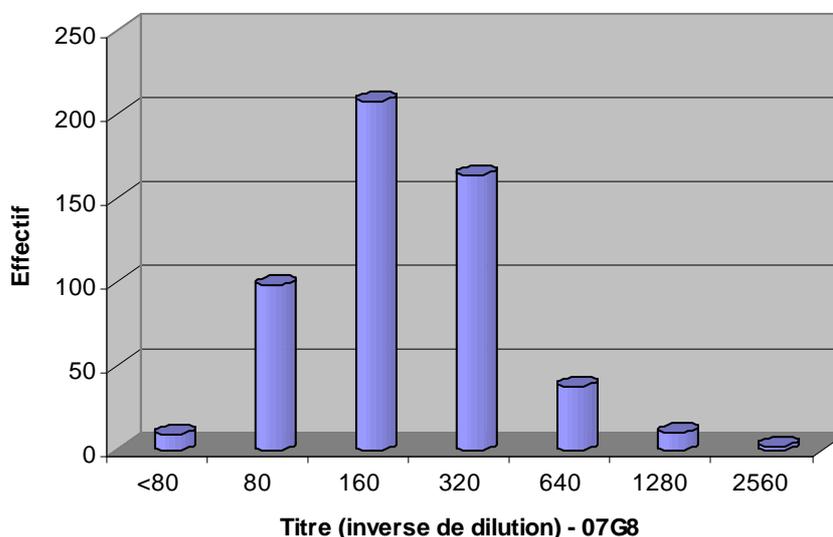
Tableau X : Aspect de la fluorescence – échantillon 07G8

Aspect de la fluorescence	Effectif
Homogène	315
Moucheté	192
Nucléolaire	13
Centromère	2
Cytoplasmique	1

Concernant les 529 résultats quantitatifs recueillis (figure 4), la médiane des titres en inverse de dilution est de 160. La répartition des réponses acceptables est la suivante :

- Titre à 1:160 : 39,3% de résultats
- Titre à 1: 320 : 31% de résultats
- Titre à 1: 640 : 7,2% de résultats
-

Figure 4 : Distribution des titres en inverse de dilution - Echantillon 07G8



1 – 3 Analyses des réponses

Concernant la mise en œuvre de l'immunofluorescence indirecte, 4% des participants utilisent encore un grossissement inadéquat pour la recherche d'anticorps anti-nucléaires (< 40 ou > 50) et 6% une dilution de dépistage inadaptée (< 1 :40 ou > 1 :100).

Concernant les résultats qualitatifs, le taux bas de bonnes réponses (88,7%) pourrait être en relation avec le titre en anticorps anti-nucléaires de l'échantillon 07G8 (1 : 320). En effet, les opérations précédentes ont montré un taux de bonnes réponses de plus de 99% lorsque le titre était supérieur à 1 : 640 (2000, 2003 et 2006) alors que ce taux de bonnes réponses était de 92,7% pour un titre compris entre 1 : 320 et 1 : 640 en 2001.

2 – Anticorps anti-ADN natif

Le nombre de laboratoires ayant effectué la recherche d'anticorps anti-ADN natif sur l'échantillon 07G8 est de 491.

2 – 1 Matériel et méthodes

Les réactifs utilisés par les participants sont répertoriés dans le tableau XI. La moindre utilisation de l'immunofluorescence se confirme. Elle ne représente plus que 39% des techniques employées contre 46% en 2005 et 42,3% en 2006. Parallèlement, la technique ELISA continue son ascension avec 39,9% d'utilisateurs contre 33% en 2005 et 36,7% en 2006. Quant aux autres techniques, le nombre d'utilisateurs

reste stable : 16,3% pour l'immunodot, 2,5% pour la cytométrie, 1,2% pour la RIA, 0,6% pour la chimiluminescence et 0,4% pour le latex.

2 – 2 Résultats

Les résultats sont dispersés comme le montre le tableau XI. Le taux de réponse négative est de 67,4% avec :

- 92 % de résultats négatifs en Immunofluorescence indirecte
- 29 % de résultats négatifs en ELISA
- 91 % de résultats négatifs en Immunodot
- 100 % de résultats négatifs en Chimiluminescence et cytométrie
- 83% % de résultats négatifs en RIA.

Le taux de réponse positive est de 31%, sachant que 86% de ces réponses positives ont été obtenues avec des techniques ELISA. Le taux plus élevé de résultats positifs en ELISA n'est pas lié à un réactif particulier.

2 – 3 Analyse des résultats

L'analyse du tableau XI met en évidence une divergence des résultats selon la méthode utilisée. Cependant, au sein même d'une technique, voir d'un réactif, il n'existe pas de consensus.

Tableau XI Anticorps anti-ADN natif – réactifs utilisés par les participants et résultats 07G8

Technique / Réactif Anticorps anti-ADN natif	Effectif	Echantillon 07G8		
		Négatif	Positif	Douteux
Toutes techniques confondues	491	331	152	8
Immunofluorescence indirecte	189	174	13	2
BIO-RAD Quantafluor ADN / Crithidia luciliae	63	58	5	
BIOADVANCE IFI : crithidia luciliae anti-nDNA	62	59	2	1
BMD Coffret de détection des anticorps anti DNA natifs	8	5	2	1
BMD Recherche des anticorps anti DNAn par IFI	22	22		
DIAMED Lame Crithidia Luciliae (gamme Zeus)	4	4		
DIAMED Tests Ds-DNA coffret complet (gamme Zeus)	1	1		
MENARINI DIAGNOSTICS Nova lite ADN db	3	1	2	
ORGENTEC Critidia luciliae 10 Lames	1	1		
ORGENTEC Critidia luciliae Coffret	4	2	2	
SERVIBIO Fluoro Ndna	3	3		
THE BINDING SITE Lames crithidia luciliae	2	2		
THE BINDING SITE Coffret DNA db crithidia luciliae	14	14		
Technique "maison" : IFI	2	2		
ELISA	193	56	131	6
BIO-RAD Kallestad anti - ds DNA microplate EIA	48	1	47	
BIOADVANCE Elisa anti-dsDNA	22	16	6	
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS DNA-LISA	14	1	13	
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS DNA/Nuc-LISA	2	1	1	1
DIASORIN Eti-ds DNA	7	2	5	
MENARINI Quanta lite ADN double brin	4	4		
ORGENTEC Anti-dsDNA IgG	4		4	
ORGENTEC Anti-dsDNA IgG (Alegria)	7		7	
ORGENTEC Anti-dsDNA Screen	1		1	
PHARMACIA EliA ds DNA Well	55	25	30	2
PHARMACIA Varelisa dsDNA antibodies EIA	4		4	
PHARMACIA Varelisa Recombi ANA profile	8	1	7	
THE BINDING SITE Farrzyme (anti-ADN double brin haute affinité)	2		2	
THE BINDING SITE Bindazyme (anti-DNA double brin)	5	3	2	3
Technique "maison" : ELISA	4	2	2	
Immunodot	79	72	7	
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA profil, dsDNA	7	7		
BIOADVANCE Euroassay profil SLE	1	1		
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 3	16	14	2	
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS DNA-Dot	55	50	5	
Cytométrie	12	12		
BIO-RAD BioPlex®2200 ANA Screen	2	2		
BMD Fidis connective 10	8	8		
INGEN AtheNA ANA II	2	2		
RIA	6	5	1	
DPC Anti-ADN (Farr)	4	3	1	
Trinity Biotech anti-ADN db	2	2		
Chimiluminescence	3	3		
DIASORIN LIAISON dsDNA (310310)	3	3		
Latex	2	2		
SERVIBIO Servitex anti n DNA	2	2		
Autre ou non précisé	7	7		

3 – Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

Le nombre de laboratoires ayant effectué la recherche d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles sur l'échantillon 07G8 est de 435.

3 – 1 Matériel et méthodes

Les tableaux XII à XV répertorient les réactifs utilisés par les laboratoires, un même laboratoire pouvant utiliser 4 réactifs différents pour ce contrôle. Dix laboratoires n'ont pas précisé le réactif employé ou ont rendu un code erroné. La majorité des tests sont effectués en technique ELISA (288 utilisateurs soit 54,8%) et en technique d'immunodot (219 utilisateurs soit 41,6%). On observe un abandon des réactifs relevant de l'immunodot au profit de l'ELISA par rapport à 2006, les taux observés étaient respectivement de 47,6% et 47%. Quelques laboratoires utilisent les techniques d'Ouchterlony (1%) et de cytométrie en flux (2,7%), ce qui correspond aux taux de l'année précédente. L'électrosynérèse n'a pas été utilisée pour cette opération de contrôle (Seul 0,4% des laboratoires l'avaient utilisée en 2006)

Tableau XII : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : réactifs ELISA – échantillon 07G8

Réactif ELISA	Effectif
BIOADVANCE Elisa anti ENA pool plus	10
BIOADVANCE Elisa anti ENA profil plus	25
BIOADVANCE Elisa anti JO-1	2
BIOADVANCE Elisa anti SCL I70	1
BIOADVANCE Elisa anti SS-A	2
BIOADVANCE Elisa anti-SS-B	2
BIOADVANCE Elisa anti-Sm	1
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil plus	15
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA -LISA	16
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA-LISA polyvalent	7
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA-LISA SCL 70-JO-1	2
BIO-RAD ANA 6 Profile	40
BIO-RAD Anti SCL 70 EIA	1
BIO-RAD Anti Sm EIA	1
BIO-RAD Anti SS-A EIA	5
BIO-RAD Anti SS-B EIA	4
BIO-RAD AntiSm/RNP EIA	3
BIO-RAD ENA Screen microplate EIA	12
DIASORIN Eti-ENA 6 screen	1
INGEN / AESKU AESKULISA ENA 6S	1
MENARINI Quanta lite ENA 6 Elisa	1
MERIDIAN Anti-JO-1	1
ORGENTEC ANA Screen (Alegria)	4
ORGENTEC ENA Combi	4
ORGENTEC ENA Screen	5
ORGENTEC ENA-6-Profile	2
ORGENTEC NUCLEO-9	3
PHADIA Varelisa ANA Profile	2
PHARMACIA CENP Well	1
PHARMACIA JO-1 Well	1
PHARMACIA La Well	10
PHARMACIA RNP70 Well	3
PHARMACIA Ro Well	20
PHARMACIA SCL 70 Well	6
PHARMACIA Sm Well	3
PHARMACIA Symphony Well	37
PHARMACIA U1RNP Well	4
PHARMACIA Varelisa Recombi ANA 8 Screen	1
PHARMACIA Varelisa Recombi ANA profile	10
PHARMACIA Varelisa Sm antibodies	2
PHARMACIA Varelisa SS-A antibodies	1
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires Profile	4
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires SCL 70	1
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires Sm	1
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires SS-A	1
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires SS-B	1
THE BINDING SITE Bindazyme ENA : dépistage	7
Technique "maison" : ELISA	1

Tableau XIII : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : réactifs Immunodot – échantillon 07G8

Réactif Immunodot	Effectif
ALL DIAG ENACHECK	9
BIOADVANCE Euroassay Profil SLE	3
BIOADVANCE Euroassay Profil, dsDNA	8
BIOADVANCE Euroassay Profil, M2	2
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 1	3
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 3	49
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil plus	15
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil, Protéine centromérique B	3
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA Dot 7	97
DIAMED Kit ENA profil (gamme Zeus)	1
DIASORIN Conectivitis Dot	1
DIASORIN Nucleosome + ENA Dot	4
DIASORIN ANA8 DOT (gamme D-tek)	4
DIASORIN ANA6 DOT (gamme D-tek)	1
DIASORIN ANA10 DOT (gamme D-tek)	3
DIASORIN ANA12 DOT (gamme D-tek)	4
INGEN / INNOGENETICS Inno-lia ANA update	7
INGEN / Alphadia DOT ENA Screen	3
INSTITUT J.BOY Kit ENA profile technique Dot	1
Technique "maison" : Immunodot	1

Tableau XIV : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : réactifs Ouchterlony – échantillon 07G8

Réactif Ouchterlony	Effectif
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Anticorps anti antigènes solubles	2
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Coffret auto IDSSA/SSB/SM/RNP	1
INGEN Antigène nucléaire soluble ENA (P 4083 2)	1
Technique "maison" : Ouchterlony	1

Tableau XV : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : réactifs Cytométrie – échantillon 07G8

Réactif Cytométrie	Effectif
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS FIDIS connective 10	10
BIORAD BioPlex®2200 ANA Screen	1
INGEN AtheNA ANA II	3

3 – 2 Résultats

Les résultats de l'identification des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles sont présentés par spécificité antigénique dans le tableau XVI.

Si l'on observe une quasi unanimité de résultats (négatifs) pour les spécificités anti-Sm, anti-(U1)RNP, anti-SS-B (La), anti-SCL 70 et anti-Jo1, les résultats concernant la spécificité anti-SS-A (Ro) montrent une absence totale d'homogénéité des réponses. Il y a une répartition 50/50 des réponses « positif » / « négatif ». Le même constat de dispersion des résultats s'observe sur les anticorps anti-histones qui, pour mémoire, ne sont pas des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.

Parmi les 166 laboratoires ayant rendu au moins une spécificité positive, trois laboratoires avaient trouvé un résultat de dépistage négatif en IFI sur cellules HEp2, et 8 n'avaient pas rendu de résultats pour ce dépistage.

Tableau XVI : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : résultats – échantillon 07G8

Spécificité	Echantillon 07G8		
	Négatif	Douteux	Positif
Anti-Ag nucléaires solubles	152	1	43
Anti-Sm	163		4
Anti-RNP	139		2
Anti-SS-A (Ro)	137	5	146
Anti-SS-B (La)	196		3
Anti-SCL 70	87		2
Anti-Jo1	23		1
Anti-histones	11	1	16
Anti-PCNA	4		
Anti-centromère	9		
Anti-ribosomes	3		
Anti-nucléosome			6

Les spécificités antigènes nucléaires solubles sont en gras dans le tableau.

La répartition des résultats positifs ou douteux pour le dépistage global « anticorps anti-antigènes nucléaires solubles » et la spécificité anti-SS-A (Ro) a été analysée par réactifs dans les tableaux XVII et XVIII.

Tableau XVII : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : résultats par réactifs – échantillon 07G8

Réactif	Technique	Echantillon 07G8 Anti-Ag nucléaires solubles			
		Effectif	négatif	Douteux	Positif
Tous réactifs confondus		196	152	1	43
BIOADVANCE Elisa anti ENA profil plus	ELISA	9	7		2
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 3	Immunodot	13	6		7
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA Dot 7	Immunodot	45	44		1
BIO-RAD ENA Screen microplate EIA	ELISA	10	7		3
PHARMACIA Symphony Well	ELISA	35	7	1	27
THE BINDING SITE Bindazyme ENA : dépistage	ELISA	5	2		3

Tableau XVIII : Anticorps anti-SS-A : résultats par réactifs – échantillon 07G8

Réactif	Echantillon 07G8 Spécificité anti-SS-A (Ro)			
	Effectif	négatif	Douteux	Positif
Tous réactifs confondus	431	137	7	287
Cytométrie	3			3
INGEN AtheNA ANA II	3			3
ELISA	100	17	3	80
BIOADVANCE Elisa anti ENA profil plus	17	8		9
BIOADVANCE Elisa anti SSA	2	1		1
BIO-RAD ENA Screen microplate EIA	2			2
BIO-RAD ANA 6 Profile	39	4	1	34
BIO-RAD Anti SSA EIA	6			6
DIASORIN Eti-ENA 6 screen	1			1
ORGENTEC NUCLEO-9	1			1
ORGENTEC ENA-6-Profile	2			2
PHARMACIA Varelisa SSA antibodies	1			1
PHARMACIA Symphony Well	3	1		2
PHARMACIA Ro Well	20		1	19
THE BINDING SITE Bindazyme ENA : dépistage	2	1	1	
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires Profile	4	2		2
Immunodot	134	71	2	61
ALL DIAG ENACHECK	8	5		3
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil plus	13	8	1	4
BIOADVANCE Euroassay Profil SLE	3	2		1
BIOADVANCE Euroassay Profil, M2	2			2
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 3	43	3		40
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil, Protéine centromérique B	2			2
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA Dot 7	56	50		6
DIASORIN ANA6 DOT (gamme D-tek)	3	1		2
INSTITUT J.BOY Kit ENA profile technique Dot	1			1
INGEN / Alphadia DOT ENA Screen	3	2	1	
Autre ou non précisé	2			2

4 – Commentaires

La dispersion des résultats anti-SS-A semble pouvoir expliquer la dispersion des réponses concernant le dépistage global des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (résultats positifs ou négatifs).

Conclusion

Le Contrôle National de Qualité 2007 illustre à lui seul l'ensemble des problèmes pouvant être rencontrés en Auto-immunité : résultats se situant autour du seuil de positivité de la technique, résultats faiblement positifs posant un problème d'interprétation en termes de valeur diagnostique, variabilité des résultats en fonction de la technique utilisée (variabilité inter techniques), variabilité des résultats en fonction des réactifs utilisés au sein d'une même technique (variabilité inter réactifs), et enfin, variabilité des résultats obtenus par différents laboratoires utilisant un même réactif (variabilité intra réactif).

L'échantillon distribué était un sérum de patiente atteinte de sclérodémie. Ce sérum contenait des anticorps anti-nucléaires à titre moyen, mais significatif (1 :320). Il s'avère que 11,2% des laboratoires ont rendu un résultat négatif, résultat erroné vraisemblablement lié à un manque de sensibilité de la technique de dépistage en immunofluorescence indirecte. Il faut souhaiter que les biologistes concernés, contactés par courrier par l'Afssaps, identifient les problèmes inhérents à leur technique, et mettent en place des mesures correctives.

Après dépistage des anticorps anti-nucléaires, il fallait chercher la présence d'anticorps anti-ADN natif et d'anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles.

- L'analyse des données concernant la recherche d'anticorps anti-ADN natif a montré une grande dispersion des résultats, avec variabilité inter techniques, variabilité inter réactifs et variabilité intra réactif. Il est possible de détecter des anticorps anti-ADN natif dans le sérum des patients atteints de sclérodermie. Le plus souvent, le titre de ces anticorps est alors faible. Ceci pourrait expliquer la variabilité inter techniques observée, les techniques d'immunofluorescence indirecte, d'ELISA, d'immunodot étant connues pour avoir des sensibilités différentes (voir Cahier Bioforma n°13 « Autoimmunité et autoanticorps ». La variabilité inter réactifs est quant à elle plus difficile à expliquer. Les résultats obtenus en technique ELISA illustrent ce problème (certains réactifs donnent un résultat négatif, tandis que d'autres donnent un résultat positif). Plus préoccupante est la variabilité intra réactif mise en évidence pour un réactif basé sur l'ELISA. Cette variabilité intra réactif pourrait être secondaire à deux problèmes : valeur proche du seuil de positivité de la technique (le coefficient de variation des techniques ELISA de l'ordre de 10% explique que le résultat soit rendu positif par certains, négatif par d'autres) et/ou modalités techniques insuffisamment respectées par les biologistes.

- La recherche des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles se heurte souvent à des problèmes, notamment en ce qui concerne l'anticorps anti-SS-A. Dans le cadre du Contrôle 2007, la dispersion des résultats obtenus a été notable avec 31,7% de résultats négatifs, et 66,6% de résultats positifs. Là aussi, une variabilité inter techniques et une variabilité inter réactifs avec la technique Immunodot ont été mises en évidence.

Au total, l'exercice 2007 du Contrôle National de Qualité en Auto-immunité a mis l'accent, s'il en était besoin, sur les problèmes que pouvait poser l'absence de standardisation des techniques en Auto-immunité. Ce Contrôle aura au moins eu le mérite de montrer qu'il était possible que deux laboratoires différents rendent des résultats discordants (variabilité inter techniques et/ou variabilité inter réactifs), sans qu'il faille nécessairement remettre en cause la qualité de travail de ces laboratoires. La conclusion demeure que des résultats en Auto-immunité doivent toujours être interprétés avec précaution, en fonction des données cliniques.