

# Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

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

Biochimie spécialisée / Immunopathologie **06AT11**

*Novembre 2006*

Edition : juin 2007

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

Expédition : 08 novembre 2006

Clôture : 04 décembre 2006

Edition des comptes-rendus individuels : 13 mars 2007

Paramètres contrôlés : **06G9 – Electrophorèse des protéines (fractions en %)**

**Recherche d'immunoglobuline monoclonale**

**06G8 – Anticorps anti-nucléaires**

Nombre de laboratoires concernés\* : 2333

Nombre de laboratoires participants\*\* : 2256

\* 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 06AT11 a concerné les laboratoires qui ont déclaré pratiquer l'électrophorèse des protéines et/ou la recherche d'immunoglobuline monoclonale et/ou la recherche d'anticorps anti-nucléaires.

L'échantillon 06G9, caractérisé par une hypergammaglobulinémie polyclonale, a été testé par 1967 laboratoires. Le taux de bonnes réponses complètes, à savoir « Hypergammaglobulinémie » à l'électrophorèse des protéines sériques et « Absence d'immunoglobuline monoclonale » à la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale, est de 76%. Cependant, il est à noter que la majorité des erreurs a été observée avec l'électrophorèse capillaire, mettant en évidence un besoin de formation complémentaire des utilisateurs de cette technique.

L'échantillon 06G8 contenait des anticorps anti-Sm, anti-RNP, et anti-SSa et a été testé par 579 laboratoires. Cet échantillon, identique à l'échantillon 00G7 distribué en 2000, présentait une positivité au 1 :1280 avec une fluorescence mouchetée sur cellules HEP2. La comparaison des résultats 2000 et 2006 a permis d'objectiver une amélioration des pratiques professionnelles concernant le dépistage en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP2 (choix du grossissement de l'objectif et de la dilution de dépistage) et parallèlement une amélioration des résultats quant au titrage des anticorps. Cependant, un effort doit être encore fourni pour l'identification des anticorps anti-ADN. Le taux de résultats faussement positifs de 5,3% est trop élevé compte tenu de la forte valeur diagnostique de ces anticorps dans le lupus systémique.

# 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.
  - ces calculs sont réalisés si l'effectif du groupe est suffisamment représentatif ( $N \geq 10$ ).
- Pour évaluer la qualité des résultats rendus par chaque laboratoire, l'écart entre la valeur rendue et la valeur cible est apprécié en fonction de limites acceptables (LA) :
- ces LA sont obtenues en appliquant à la valeur cible des pourcentages d'acceptabilité (tableau I) qui tiennent compte à la fois d'objectifs analytiques et d'exigences cliniques ;
  - ces LA ont été déterminées d'après les travaux du Groupe SFBC « Normes de validation du protocole de validation de techniques » publiés dans les Annales de Biologie Clinique (*Ann. Biol. Clin.*, 1999, 57 : 685 - 695).

**Tableau I - pourcentages d'acceptabilité**

Analyse	Pourcentages d'acceptabilité
<b>Protéinogramme (fractions en %)</b>	
Albumine	± 12%
α1-globulines	± 30%
α2-globulines	± 20%
β-globulines	± 20%
γ-globulines	± 20%

## 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. Cette médiane reste inchangée quel que soit son mode de calcul, à savoir exclusion des résultats rendus « supérieur à » ou inclusion de ces résultats, en les transformant en titre immédiatement supérieur.

## Echantillon 06G9

### Electrophorèse des protéines et/ou recherche d'immunoglobuline monoclonale

#### Définition de l'échantillon

L'échantillon 06G9 était un sérum liquide d'origine humaine caractérisé par une **hypergammaglobulinémie** polyclonale. L'immunofixation confirmait le caractère **polyclonal** de l'hypergammaglobulinémie (pas de bande monoclonale détectable). L'échantillon ne contenait pas d'immunoglobuline monoclonale.

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).

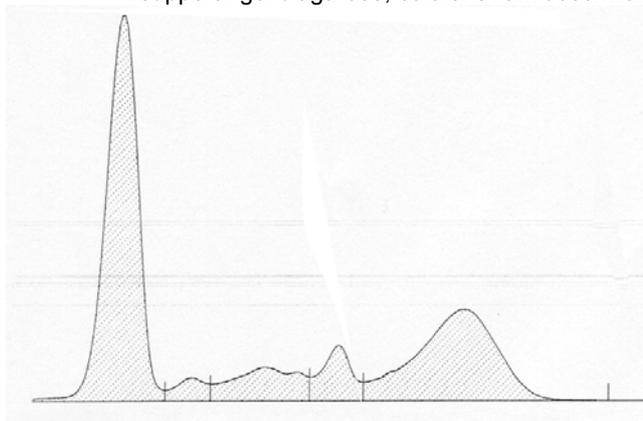
#### 1 – Electrophorèse des protéines

**Réponses attendues**, obtenues à partir des réponses des experts :

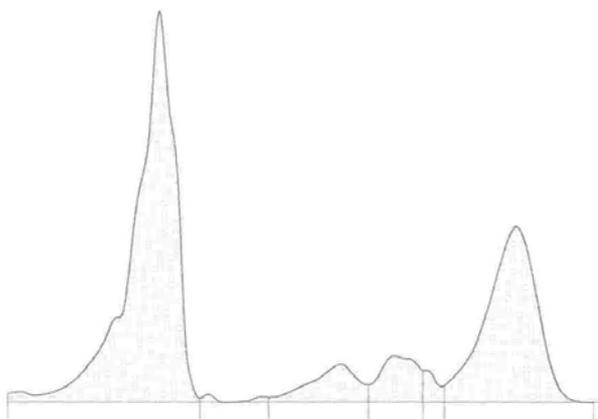
Analyse du tracé : « Augmentation de la fraction (-globulines) (figures 1a et 1b) ;

Commentaire : « Hypergammaglobulinémie ».

**Figure 1a** - tracé électrophorétique obtenu avec l'échantillon 06G9  
support : gel d'agarose, colorant : amidoschwarz (noir amide)



**Figure 1b** - tracé électrophorétique obtenu avec l'échantillon 06G9  
Electrophorèse capillaire

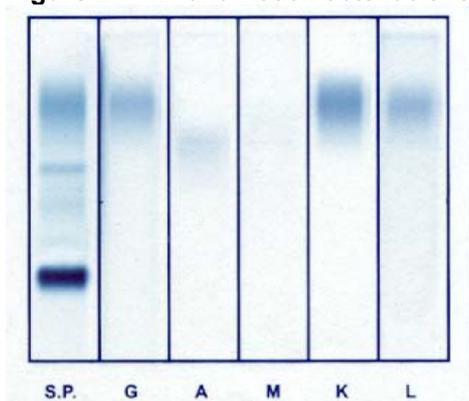


#### 2 – Recherche et quantification de l'immunoglobuline monoclonale

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

L'immunofixation confirme le caractère polyclonal des immunoglobulines (pas de bande monoclonale détectable).

**Figure 2 - Immunofixation obtenue avec l'échantillon 06G9**



## Résultats des participants

Le nombre de laboratoires ayant effectué au moins une des analyses sur l'échantillon 06G9 est de 1967. La répartition selon les analyses est la suivante :

- 1340 laboratoires ont effectué l'électrophorèse des protéines et la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale,
- 597 laboratoires ont effectué uniquement l'électrophorèse des protéines,
- 30 laboratoires ont effectué uniquement la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale.

### 1 – Electrophorèse des protéines

Le nombre de laboratoires ayant répondu pour cette analyse est de 1937.

Ce nombre est en constante diminution depuis quelques années : 2191 laboratoires avaient répondu pour cette analyse en 2004 ; 1993 laboratoires en 2005.

#### 1 – 1 - Méthodes et réactifs

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

Le support le plus utilisé est le gel d'agarose : 82,3% d'utilisateurs (contre 85% en 2005). L'acétate de cellulose n'est plus utilisé que par 3,1% de laboratoires (contre 4,7% en 2005).

L'électrophorèse capillaire poursuit sa progression : 277 laboratoires en sont équipés, soit 14,3% contre 10% (200 laboratoires) en 2005 et 4,6% (101 laboratoires) en 2004.

En ce qui concerne le choix du colorant, sur gel d'agarose, le noir amide (amidoschwarz) est le plus souvent utilisé : 1352 laboratoires ont fait ce choix, soit 69,8%. Puis, viennent le bleu acide utilisé par 240 laboratoires (12,4%) et le rouge ponceau utilisé par 2 laboratoires (0,1%). Sur gel d'acétate de cellulose, seul le rouge ponceau est utilisé ; 61 laboratoires ont fait ce choix (3,1%).

**Tableau II** – Electrophorèse des protéines (%) – Echantillon 06G9 – Méthodes et réactifs utilisés

<b>Méthodes</b> - Réactifs	Nombre d'utilisateurs	%
<b>Support Acetate de cellulose - rouge ponceau [cell-Pon]</b>	<b>61</b>	<b>3,1</b>
- Elitech (Helena), Titan III Protéines	61	
<b>Support Agarose - amidoschwarz (noir amide, amido black) [aga-Schw]</b>	<b>1352</b>	<b>69,8</b>
- Sebia, Hydragel (HR) Protein(e) HYDRASYS	896	
- Sebia, Hydragel Protein(e) K20	290	
- Sebia, Hydragel $\beta$ 1- $\beta$ 2 HYDRASYS	141	
- Elitech (Helena), kit REP $\beta$ 1- $\beta$ 2 Applicateurs	8	
- Beckman Coulter, Paragon SPE	6	
- Biomidi, Midigel Protéines	6	
- Helena BioSciences, kit REP SPE Applicateurs	3	
- Elitech (Helena), Titan Gel Protéines (HR)	2	
<b>Support Agarose - bleu acide [aga-Bleu]</b>	<b>240</b>	<b>12,4</b>
- Elitech (Helena), kit (Titan) Protéine 2000	105	
- Elitech (Helena), SAS-1 Serum Protein	58	
- Elitech (Helena), SAS-MX Serum Protein	52	
- Elitech (Helena), SAS-MX Serum Protein SB	23	
<b>Support Agarose - rouge ponceau [aga-Pon]</b>	<b>2</b>	<b>0,1</b>
- Elitech (Helena), kit REP rouge ponceau	2	
<b>Electrophorèse capillaire [capillaire]</b>	<b>277</b>	<b>14,3</b>
- Sebia, Capillarys	247	
- Beckman Coulter, Paragon CZE 2000 (SPE kit)	30	
<b>Non précisés</b>	<b>5</b>	<b>0,3</b>
<b>Total</b>	<b>1937</b>	<b>100,0</b>

## 1- 2 - Résultats quantitatifs

Dans l'ensemble, les résultats sont relativement homogènes (tableau III).

**Tableau III** : Electrophorèse des protéines (%) – Echantillon 06G9 - Résultats par groupe technique (N ≥ 10)

Réactifs - Appareil	N	Albumine		α1-globulines		α2-globulines		β-globulines		γ-globulines	
		m	CV (%)	m	CV (%)	m	CV (%)	m	CV (%)	m	CV (%)
<b>TOUTES TECHNIQUES CONFONDUES</b>	<b>1937</b>	<b>53,8</b>	<b>5,0</b>	<b>2,5</b>	<b>42,2</b>	<b>5,5</b>	<b>17,8</b>	<b>7,9</b>	<b>10,3</b>	<b>30,0</b>	<b>6,6</b>
<b>BECKMAN-COULTER, Paragon CZE 2000 [capillaire]</b>	<b>30</b>	<b>53,0</b>	<b>0,8</b>	<b>3,5</b>	<b>7,9</b>	<b>10,1</b>	<b>4,9</b>	<b>6,7</b>	<b>6,8</b>	<b>26,8</b>	<b>2,8</b>
<b>ELITECH (HELENA) Titan III Protéines [cell-Pon]</b>	<b>61</b>	<b>51,7</b>	<b>5,5</b>	<b>1,8</b>	<b>58,5</b>	<b>7,0</b>	<b>18,3</b>	<b>7,4</b>	<b>9,3</b>	<b>32,3</b>	<b>5,5</b>
- appareil HELENA Junior 24	30	50,5	4,8	1,9	74,3	7,4	17,9	7,5	6,6	33,2	6,3
<b>ELITECH (HELENA), SAS-1 Serum Protein [aga-Bleu]</b>	<b>58</b>	<b>50,4</b>	<b>2,6</b>	<b>3,5</b>	<b>16,4</b>	<b>4,4</b>	<b>9,1</b>	<b>8,0</b>	<b>8,2</b>	<b>33,7</b>	<b>2,9</b>
- appareil HELENA SAS-1 (automate)	34	50,2	2,8	3,5	22,2	4,3	9,2	8,2	8,7	33,9	3,5
- appareil HELENA Platinum (logiciel)	22	50,7	2,0	3,4	13,6	4,4	11,1	7,8	6,7	33,5	3,1
<b>ELITECH (HELENA), SAS-MX Serum Protein [aga-Bleu]</b>	<b>52</b>	<b>51,7</b>	<b>5,3</b>	<b>3,4</b>	<b>21,1</b>	<b>4,9</b>	<b>11,8</b>	<b>7,5</b>	<b>9,9</b>	<b>32,3</b>	<b>5,9</b>
- appareil HELENA Junior 24	26	51,0	4,1	3,5	18,2	5,0	8,9	7,7	7,4	32,8	4,5
<b>ELITECH (HELENA) SAS-MX Serum Protein SB [aga-Bleu]</b>	<b>23</b>	<b>51,3</b>	<b>4,4</b>	<b>3,4</b>	<b>13,7</b>	<b>4,9</b>	<b>8,4</b>	<b>7,7</b>	<b>5,7</b>	<b>32,4</b>	<b>6,5</b>
<b>ELITECH (HELENA) kit (Titan) Protéine 2000 [aga-Bleu]</b>	<b>105</b>	<b>50,6</b>	<b>4,9</b>	<b>3,0</b>	<b>15,6</b>	<b>5,4</b>	<b>10,8</b>	<b>8,0</b>	<b>13,8</b>	<b>33,2</b>	<b>4,9</b>
- appareil HELENA Polyslit (automate)	49	51,1	4,7	2,9	14,0	5,3	10,7	8,2	12,8	33,2	4,7
- appareil HELENA Optiscan	14	49,0	6,4	3,0	10,8	5,4	11,2	8,6	13,0	34,3	6,2
- appareil HELENA Platinum (logiciel)	13	50,4	3,7	3,2	23,0	5,5	10,3	8,2	20,1	33,3	5,6
- appareil HELENA Polyscan	10	51,4	5,6	2,8	31,4	5,4	18,6	8,1	8,1	32,6	4,3
<b>SEBIA Capillarys [capillaire]</b>	<b>247</b>	<b>53,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>31,7</b>	<b>6,9</b>	<b>6,9</b>	<b>7,7</b>	<b>4,0</b>	<b>30,6</b>	<b>1,5</b>
<b>SEBIA Hydragel (HR) Protein(e) Hydrasys [aga-Schw]</b>	<b>896</b>	<b>54,4</b>	<b>5,3</b>	<b>3,1</b>	<b>13,3</b>	<b>5,0</b>	<b>10,5</b>	<b>8,2</b>	<b>9,7</b>	<b>29,4</b>	<b>6,2</b>
- appareil SEBIA Hydrasys (automate)	528	54,4	5,5	3,1	13,7	5,0	10,5	8,2	10,4	29,4	6,2
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [sans standardisation]	121	56,7	3,6	3,0	13,4	4,8	11,1	7,8	9,6	27,9	4,3
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [avec standardisation]	110	52,3	3,2	3,3	10,9	5,1	8,8	8,5	7,9	30,6	4,1
- appareil SEBIA Phoresis (logiciel)	44	54,0	5,1	3,2	14,0	5,0	10,3	8,0	12,7	29,5	6,2
- appareil SEBIA Préférence	34	54,6	3,5	3,1	12,5	4,9	9,6	8,1	8,2	29,3	4,4
- appareil SEBIA DVSE	23	54,8	3,0	3,3	11,9	5,1	9,8	8,4	11,6	29,3	4,2
- appareil SEBIA Préférence-Ecran	12	54,3	4,0	3,2	10,4	5,1	15,0	7,8	16,6	29,8	5,7
<b>SEBIA Hydragel β1-β2 Hydrasys [aga-Schw]</b>	<b>141</b>	<b>53,9</b>	<b>5,5</b>	<b>2,0</b>	<b>38,3</b>	<b>5,9</b>	<b>15,4</b>	<b>7,6</b>	<b>11,5</b>	<b>29,8</b>	<b>6,4</b>
- appareil SEBIA Hydrasys (automate)	82	53,6	4,7	2,3	26,8	6,0	16,9	7,6	10,4	29,9	5,7
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [avec standardisation]	22	51,9	3,2	2,0	44,6	6,3	17,0	8,4	16,4	30,6	5,4
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [sans standardisation]	11	58,5	2,1	1,3	63,7	6,0	12,0	6,9	7,2	27,3	1,1
- appareil SEBIA DVSE	10	53,7	7,2	1,9	37,2	6,5	24,4	7,6	18,2	30,5	7,9
<b>SEBIA Hydragel Protein(e) K20 [aga-Schw]</b>	<b>290</b>	<b>54,7</b>	<b>5,1</b>	<b>1,5</b>	<b>59,3</b>	<b>6,6</b>	<b>17,9</b>	<b>7,8</b>	<b>9,9</b>	<b>29,5</b>	<b>6,7</b>
- appareil SEBIA DVSE	64	54,9	4,6	1,5	56,5	6,7	18,3	7,7	9,1	29,5	6,1
- appareil SEBIA Préférence	53	54,4	5,1	1,4	63,7	6,5	14,8	7,6	7,6	29,8	6,5
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [sans standardisation]	41	56,9	4,2	1,6	70,1	6,3	18,6	7,4	10,4	28,3	5,5
- appareil SEBIA DVS	28	54,2	4,6	1,5	60,3	7,0	16,2	8,0	7,5	29,7	6,5
- appareil SEBIA Préférence-Ecran	25	53,5	6,0	0,9	58,7	7,6	9,0	8,2	9,6	30,2	7,2
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [avec standardisation]	18	53,3	3,1	1,6	51,4	6,8	17,3	8,0	9,8	30,2	4,7
- appareil SEBIA Profil	13	54,3	8,8	1,5	47,5	7,0	25,2	7,5	11,6	29,2	8,4
- appareil SEBIA Phoresis (logiciel)	11	56,8	5,8	1,5	51,7	6,2	17,0	7,8	14,2	27,9	8,8
- appareil HELENA Junior 24	11	51,7	5,5	2,1	27,0	6,3	14,9	8,7	3,7	31,5	5,7

### 1.2.1 Albumine (%)

Dans l'ensemble, les valeurs moyennes sont proches les unes des autres pour les différents couples réactif/appareil d'un même fabricant. Cependant, pour l'ensemble des techniques utilisées, on peut observer que les résultats d'albumine vont de 50,4% (Elitech [Helena] SAS-1) à 54,7% (Sebia Hydragel K20). On peut remarquer également à l'intérieur des groupes techniques Sebia Hydragel, un écart de 4 à 7% entre les moyennes observées sur lecteur Hyrys avec et sans standardisation.

La dispersion des résultats, pour l'ensemble des techniques, est faible (CV = 5,0%). Les CV les plus bas sont obtenus avec les techniques d'électrophorèse capillaire : 0,8% avec le système Beckman Paragon CZE et 1,2% avec le système Sebia Capillarys. Les techniques en gel affichent, pour la majorité d'entre

elles, des CV voisins de 5% voire inférieurs. Pour cette fraction, on peut noter que les CV vont de 0,8 à 5,5%.

### **1.2.2 $\alpha$ 1-globulines (%)**

Les valeurs moyennes sont proches les unes des autres pour les différents couples réactif/appareil d'un même fabricant. Cependant, on peut noter que sur l'ensemble des résultats, les valeurs extrêmes d' $\alpha$ 1-globulines vont, selon les techniques, de 1,0% (Sebia, Capillarys) à 3,5% (Beckman, Paragon CZE) pour une moyenne générale à 2,5%.

Les CV sont, par contre, élevés (CV général de 42%), et ce, de façon plus marquée pour les techniques pour lesquelles la valeur moyenne pour cette fraction avoisine 1 à 2%. Le CV le plus bas est obtenu avec la technique d'électrophorèse capillaire Beckman Paragon CZE (CV de 7,9%). Des performances correctes sont observées avec quelques techniques en gel : Elitech (Helena) SAS-MX Serum Protein SB et Sebia Hydragel qui affichent des CV < 15%. A noter que la dispersion des résultats est très variable d'une technique à l'autre, comme l'attestent les CV qui vont de 7,9 à 59,3%.

### **1.2.3 $\alpha$ 2-globulines (%)**

Là encore, les valeurs moyennes sont proches les unes des autres pour les différents couples réactif/appareil d'un même fabricant. Cependant, on peut observer que, sur l'ensemble des résultats, les valeurs extrêmes d' $\alpha$ 2-globulines vont, selon les techniques, de 4,4% (Elitech [Helena] SAS-1) à environ 10% (Beckman, Paragon CZE) pour une moyenne générale à 5,5%.

Pour les techniques en gel, les CV sont légèrement moins élevés pour les techniques Helena (CV de l'ordre de 12%) que pour les techniques Sebia (CV de l'ordre de 15%). Pour les techniques d'électrophorèse capillaire, le système Beckman Paragon CZE montre un CV de 4,9%, alors que le système Sebia Capillarys affiche quant à lui un CV de 6,9%. Là encore, on peut noter que la dispersion des résultats est très variable d'une technique à l'autre, comme l'attestent les CV qui vont de 4,9 à 18,3%.

### **1.2.4 $\beta$ -globulines (%)**

Les valeurs moyennes des différents groupes techniques sont proches les unes des autres, à l'exception du système d'électrophorèse capillaire Beckman Paragon CZE qui affiche une moyenne de 6,7% pour une moyenne générale voisine de 8%.

Quant aux CV, on peut noter que les techniques en gel Helena et Sebia affichent des performances voisines (CV de l'ordre de 10%). Les techniques d'électrophorèse capillaire, quant à elles, affichent les CV les plus bas : Beckman Paragon CZE (CV de 6,8%) et Sebia Capillarys (CV de 4%). Sans les citer, on peut observer que quelques techniques en gel montrent des CV < 10%. Pour cette fraction, les CV affichés par les techniques vont de 4,0 à 13,8%.

### **1.2.5 $\gamma$ -globulines (%)**

Pour cette fraction, ce sont les moyennes qui distinguent les techniques en gel Helena des techniques en gel Sebia, environ 32 à 34% pour les premières, 29 à 30% pour les secondes pour une moyenne générale de 30%. Quant aux techniques d'électrophorèse capillaire (Sebia Capillarys, Beckman Paragon CZE), elles affichent, respectivement, une moyenne de 31% et de 27% pour cette fraction.

Les CV ne diffèrent pas selon les fournisseurs de techniques sur gel. Pour cette fraction, les techniques d'électrophorèse capillaire montrent des résultats très groupés : CV de 1,5% pour le système Sebia Capillarys et de 2,8% pour le système Beckman Paragon CZE pour un CV général de 6,6%. On peut noter que les CV vont de 1,5 à 6,7%.

### **1.2.6 Commentaires**

On observe des CV élevés, toutes techniques confondues, pour les fractions  $\alpha$ 1-globulines et  $\alpha$ 2-globulines, à 42,2% et 17,8% respectivement (tableau III). Pour ces deux fractions, et plus particulièrement pour la fraction  $\alpha$ 1-globulines, la dispersion des résultats est grande, comme en témoignent les étendues de CV, égales à 51,4% (59,3% - 7,9%) pour les  $\alpha$ 1-globulines et à 13,4% (18,3% - 4,9%) pour les  $\alpha$ 2-globulines.

Il semblerait que cette dispersion des résultats soit liée à des problèmes d'intégration (séparation des fractions). La diminution des  $\alpha$ 1-globulines pourrait avoir gêné l'intégration des différentes fractions électrophorétiques.

En effet, des valeurs basses des  $\alpha$ 1-globulines et  $\alpha$ 2-globulines entraînent une diminution des contrastes entre les pics de chaque zone et les creux entre les zones. De ce fait, lors de l'intégration automatique des tracés, certains intégrateurs ne « voient » pas suffisamment de contraste entre les zones et peuvent en compter une là où il y en a deux, ou bien positionner les limites entre deux zones de façon imprécise et ainsi compter des  $\alpha$ 1-globulines dans les  $\alpha$ 2-globulines ou inversement.

La figure 3 ci-dessous montre les résultats de l'intégration des fractions, pour chaque laboratoire représenté par un point dont les coordonnées sont la valeur obtenue pour la fraction  $\alpha$ 1-globulines en abscisse et celle de la fraction  $\alpha$ 2-globulines en ordonnée. Cette figure met en évidence deux populations de points : la première population (en haut à gauche sur la figure) correspond à des valeurs augmentées pour les  $\alpha$ 2-globulines et diminuées pour les  $\alpha$ 1-globulines ; la deuxième population (en bas à droite sur la figure) à des valeurs diminuées pour les  $\alpha$ 2-globulines et augmentées pour les  $\alpha$ 1-globulines. La compensation de la fraction  $\alpha$ 1-globulines par la fraction  $\alpha$ 2-globulines, et inversement, serait ainsi la conséquence du placement du curseur d'intégration au profit de l'une des fractions par rapport à l'autre.

L'intégration (séparation) des fractions  $\alpha$ 2-globulines et  $\beta$ -globulines (figure 4), ainsi que l'intégration (séparation) des fractions  $\beta$ -globulines et  $\gamma$ -globulines (figure 5) semblent avoir posé moins de problèmes aux laboratoires. Sur ces figures, on note que les résultats des fractions  $\beta$  et  $\gamma$ -globulines sont relativement groupés.

Figure 3 : alpha1-globulines vs alpha2-globulines

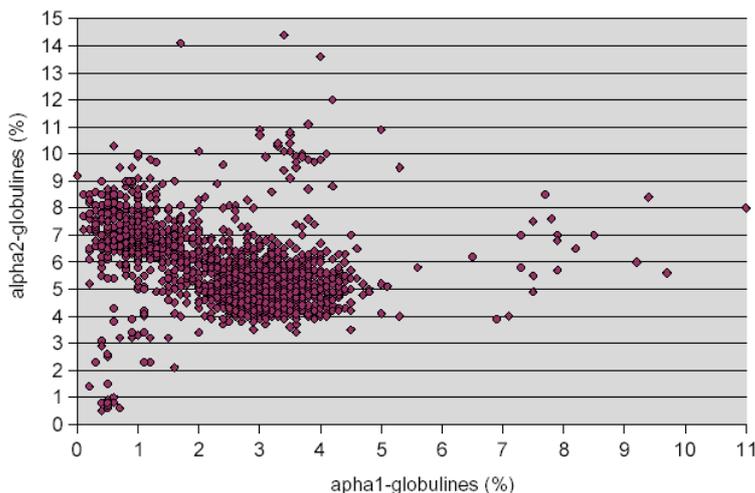


Figure 4 : alpha2-globulines vs bêta-globulines

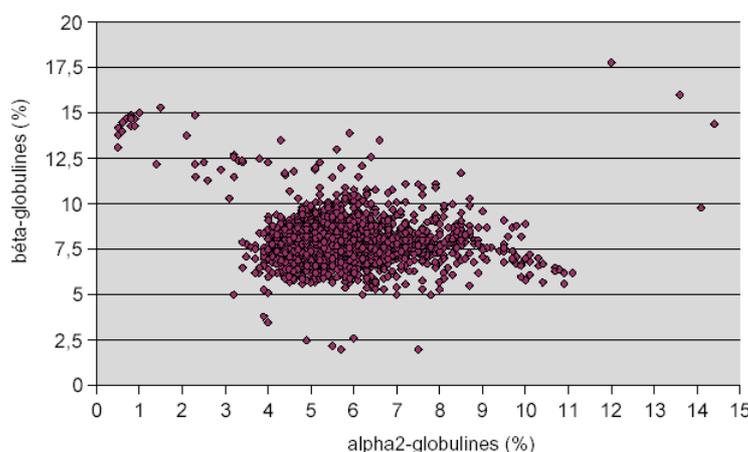
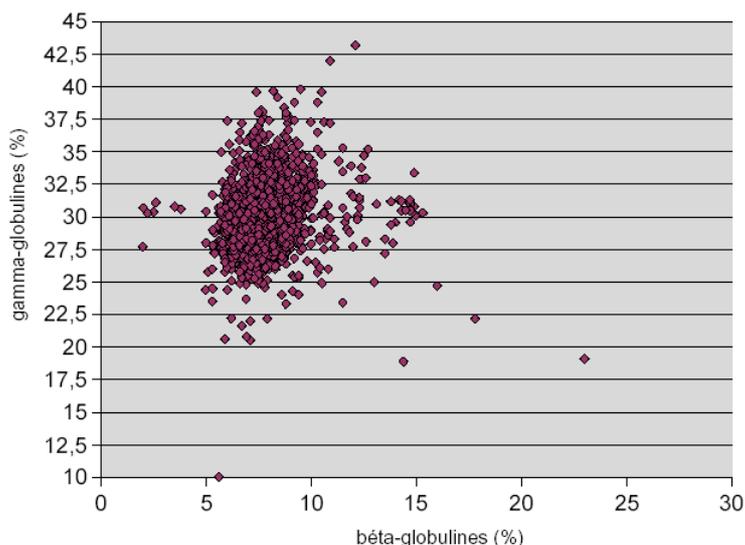


Figure 5 : bêta-globulines vs gamma-globulines



### 1- 3 - Interprétation du tracé

L'examen du gel et du tracé (figures 1a et 1b) permettait d'observer une **augmentation de la fraction des  $\gamma$ -globulines** d'allure polyclonale.

La réponse attendue (analyse du tracé et commentaire associé) était donc : « **augmentation de la fraction des  $\gamma$ -globulines** » assortie du commentaire « **Hypergammaglobulinémie** ». Cette réponse complète a été rapportée par 1153 laboratoires, soit **59,5%** des participants.

Le nombre de laboratoires ayant donné une bonne analyse du tracé et/ou le commentaire attendu, est de 1693 soit **87,4%** des participants. Le tableau IV en donne la répartition.

**Tableau IV** : Electrophorèse des protéines - Réponses concernant l'analyse du tracé et/ou le commentaire – Echantillon 06G9

Analyse du tracé	Commentaire	Nombre de laboratoires (%)
« Augmentation de la fraction des $\gamma$ -globulines »	« Hypergammaglobulinémie »	
+	+	<b>1153 (59,5%)</b>
+	-	<b>318 (16,4%)</b>
-	+	<b>222 (11,5%)</b>
-	-	<b>244 (12,6%)</b>

(-) : autres réponses que celle attendue ou absence de réponse

### 1- 4 – Analyse des résultats

Rappelons, que concernant les items proposés pour l'analyse du tracé et le commentaire, un seul choix était possible dans chacune des rubriques. Aussi,

- La réponse attendue concernant l'analyse du tracé, à savoir « **Augmentation de la fraction des  $\gamma$ -globulines** » a été associée, par 318 laboratoires, à divers commentaires répartis comme suit :
  - « Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale » : 102 laboratoires
  - « Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire » : 78 laboratoires
  - « Résultats en faveur d'un syndrome infectieux » : 63 laboratoires
  - « Résultats à contrôler dans un mois » : 25 laboratoires
  - « Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher un syndrome inflammatoire » : 18 laboratoires

- autres commentaire sur l'analyse du tracé : 11 laboratoires
- non renseigné : 21 laboratoires.

• le commentaire « **Hypergammaglobulinémie** » a été associé à plusieurs réponses par 222 laboratoires, réparties comme suit :

- « Bande large dans la zone des  $\gamma$ -globulines » : 146 laboratoires
- « Diminution de la fraction  $\alpha$ 1-globulines » : 36 laboratoires
- « Diminution de la fraction  $\alpha$ 2- globulines » : 11 laboratoires
- « Restriction d'hétérogénéité des  $\gamma$ -globulines » : 6 laboratoires
- « Pas de commentaire particulier » : 4 laboratoires
- autres réponses : 19 laboratoires.

• 244 laboratoires n'ont rendu aucune des réponses attendues (tableau IV) :

- les couples de réponses les plus fréquemment rapportés par ces laboratoires sont répertoriés dans le tableau V. Pour des raisons de clarté, seuls les couples de réponses rapportées par au moins 5 laboratoires ont été pris en compte. Pour information, on notera que 41 couples de réponses différents, rapportés par moins de 5 laboratoires et représentant un total de 57 laboratoires (23,4%), n'ont pas été analysés.

**Tableau V** : couples de réponses des laboratoires qui n'ont rendu aucune des réponses attendues (rapportés par au moins 5 laboratoires)

	Analyse du tracé	Commentaire	Nombre de laboratoires (%)
Erreur de type I	Pic étroit dans la zone des $\gamma$ -globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	35 (14,3%)
	Bande large dans la zone des $\gamma$ -globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	27 (11,1%)
	Restriction d'hétérogénéité des $\gamma$ -globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	13 (5,3%)
	Bande large dans la zone des $\gamma$ -globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	11 (4,5%)
	Bande large dans la zone des $\gamma$ -globulines	Résultats en faveur d'un syndrome infectieux.	6 (2,6%)
Erreur de type II	Diminution de la fraction $\alpha$ 1-globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	14 (5,7%)
	Diminution de la fraction $\alpha$ 1-globulines	Résultats à contrôler dans un mois.	10 (4,1%)
	Diminution de la fraction $\alpha$ 2-globulines.	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	6 (2,6%)
	Diminution de la fraction $\alpha$ 1-globulines	non renseigné	5 (2,0%)
Erreur de type III	Diminution de la fraction $\alpha$ 1-globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher un déficit immunitaire.	5 (2,0%)
	Bloc bêta-gamma.	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	15 (6,1%)
	Non renseigné	Non renseigné	40 (16,4%)

Erreur de type I, II ou III : voir paragraphe 1- 4 – Commentaires

- Les techniques utilisées par ces laboratoires et les couples de réponses associés les plus fréquemment rapportés (au moins 5 réponses) sont analysés dans le tableau VI.

**Tableau VI** : Techniques utilisées et couples de réponses associés des 244 laboratoires

Techniques	Nombre de laboratoires (%)	Couples de réponses Analyse du tracé + Commentaire (rapportées par au moins 5 labos)	Nombre de laboratoires (%)
Sebia, Capillarys	66 (27,0%)	non renseigné + non renseigné	21 (8,6%)
		Pic étroit dans la zone des $\gamma$ -globulines + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	20 (8,2%)
		Bande large dans la zone des $\gamma$ -globulines + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	14 (5,7%)
Sebia, Hydrigel HYDRASYS	58 (23,8%)	non renseigné + non renseigné	6 (2,4%)
		Bande large dans la zone des $\gamma$ -globulines + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	6 (2,4%)
		Diminution de la fraction $\alpha$ 2-globulines + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	6 (2,4%)
Sebia, Hydrigel Protein(e) K20	46 (18,9%)	Bloc beta-gamma + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	11 (4,5%)
		Diminution de la fraction $\alpha$ 1-globulines + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	7 (2,9%)
		Diminution de la fraction $\alpha$ 1-globulines + Résultats à contrôler dans un mois.	5 (2,0%)
Sebia, Hydrigel $\beta$ 1- $\beta$ 2 HYDRASYS	22 (9,0%)		
Elitech (Helena), Titan III Protéines	15 (6,1%)	Pic étroit dans la zone des $\gamma$ -globulines + Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	6 (2,4%)
Beckman, Paragon CZE 2000	12 (4,9%)	non renseigné + non renseigné	5 (2,0%)
Elitech (Helena), Kit (Titan) Protéines	9 (3,7%)		
Elitech (Helena), SAS-MX	6 (2,5%)		
Elitech (Helena), SAS-1	4 (1,6%)		
Elitech (Helena), SAS-MX SB	2 (0,8%)		
Beckman, Paragon SPE	2 (0,8%)		
Elitech (Helena), kit REP $\beta$ 1- $\beta$ 2	1 (0,4%)		
Non précisée	1 (0,4%)		
<b>Total</b>	<b>244 (100,0%)</b>		

#### 1- 4 – Commentaires

Le tableau V permet de relever trois « types » d'erreur I, II ou III concernant l'analyse du tracé :

- Erreur de type I portant sur la zone des  $\gamma$ -globulines : l'observation attentive du tracé, ainsi que celle du support, montrent une courbe de répartition très régulière, sans anomalie, sans épaulement, sans discontinuité, et dont la largeur occupe toute la zone des  $\gamma$ -globulines. Dans ces conditions, il est exclu de conclure à la présence d'une anomalie qualitative (pic étroit, restriction d'hétérogénéité ou bande large). En cas de doute, il était licite de demander une immunofixation pour confirmer l'absence d'une immunoglobuline monoclonale. Dans ce sens, le commentaire « Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale » était acceptable.

- Erreur de type II concernant l'analyse globale du tracé électrophorétique : en pratique courante, l'observation des fractions  $\alpha$ 1-globulines et  $\alpha$ 2-globulines ne peut être validée que si on tient compte des autres fractions. Dans le cas présent, il fallait signaler en priorité l'hypergammaglobulinémie. Les réponses concernant la diminution des  $\alpha$ 1-globulines et  $\alpha$ 2-globulines n'étaient pas fausses mais n'avaient qu'un intérêt relatif par rapport à l'hypergammaglobulinémie.

- Erreur de type III portant sur les zones  $\beta$  et  $\gamma$ -globulines : on peut évoquer une insuffisance hépatocellulaire devant une baisse des  $\alpha$ 1-globulines et des  $\alpha$ 2-globulines. Cependant, l'affirmation d'un bloc  $\beta\gamma$  ne peut être faite que lorsque le creux qui sépare normalement les  $\beta$ -globulines des  $\gamma$ -globulines disparaît. Ce qui n'est pas le cas avec l'échantillon : ce creux est net et sans équivoque.

Parmi les 244 laboratoires n'ayant rendu aucune des réponses attendues, le tableau VI permet de relever que l'erreur de type I a plutôt été rapportée par les techniques suivantes : la technique d'électrophorèse capillaire Sebia Capillarys et les techniques en gel Elitech (Helena) Titan III protéines et Sebia Hydragel Hydrasys, tandis que l'erreur de type III a plutôt été rapportée par la technique en gel Sebia Hydragel Protein(e) K20.

## 2 – Détection et caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale

Le nombre de laboratoires ayant effectué à cette analyse est de 1370, nombre en diminution par rapport à 2005 (1431). Certains laboratoires ont précisé que cette recherche n'avait pas été réalisée au vu du tracé électrophorétique. Ainsi, la diminution du nombre de participants ne préjuge pas du nombre de laboratoires réalisant cette analyse en pratique courante.

### 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 VII.

L'analyse des réponses montre que :

- 1177 laboratoires utilisent uniquement un réactif d'immunofixation.
- 165 laboratoires utilisent uniquement un réactif relevant d'une technique autre que l'immunofixation
- 28 laboratoires utilisent deux techniques dont l'immunofixation.

La technique d'immunofixation reste donc la technique majoritairement employée par les laboratoires (88%). Cependant, on note une diminution de son utilisation (tableau VIII). En effet, 98% des laboratoires pratiquaient l'immunofixation en 2003. Cette évolution s'est faite au profit de l'électrophorèse capillaire qui approche les 13% d'utilisateurs (177) pour l'opération 06AT11 alors qu'en 2003 seulement 1% des laboratoires (14) l'employaient.

**Tableau VII** : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : réactifs – Sérum 06G9

Réactif	Effectif
<b>IMMUNOFIXATION</b>	<b>1205</b>
BECKMAN Paragon IFE (réf : 444930 / 446390)	15
ELITECH / HELENA Kit Titan gel IFE 2000 (réf : 21016)	59
ELITECH / HELENA SAS-MX Immunofix (réf : 100300)	22
ELITECH / HELENA SAS-I Immunofix (réf : 200300)	30
ELITECH / HELENA SAS-3 Immunofix (réf : 300300)	10
SEBIA Hydragel IF K20/ double IF K20 (réf : 3031/3036/3222)	167
SEBIA Hydragel Bence Jones K20 (réf : 3038)	1
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasys] (réf : 4301/4302/4304/4308/4309/4381/4382)	584
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasys] (réf : 4801/4802/4804/4808/4809/4881/4882)	268
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 Bence Jones (MD) [Hydrasys] (réf : 4321/4322/4324/4383)	1
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 Bence Jones (MS) [Hydrasys] (réf : 4821/4822/4824/4883)	1
SEBIA Hydragel 6/12 IF Penta (MD) [Hydrasys] (réf : 4341/4342/4384)	13
SEBIA Hydragel 6/12 IF Penta (MS) [Hydrasys] (réf : 4841/4842/4884)	1
SEBIA Hydragel IF Penta K20 (réf : 3037)	10
SEBIA Hydragel 3/6 CSF (MS) [Hydrasys] (réf : 4850/4851)	3
SEBIA Hydragel 2 IF/BJ (HR) (MS) [Hydrasys] (réf : 4803)	13
SEBIA Hydragel 18 A1AT isofocusing [Hydrasys] (réf: 4356)	1
Non précisé ou code erroné	6
<b>ELECTROPHORESE CAPILLAIRE</b>	<b>177</b>
BECKMAN Réactif d'immunofixation par soustraction pour l'électrophorèse capillaire	17
SEBIA Capillarys Immunotyping (réf : 2100)	160
<b>IMMUNOELECTROPHORESE</b>	<b>11</b>
BECKMAN Paragon IEP (réf : 655703)	3
SEBIA Hydragel IEP sans antiserum [K20] (réf : 4036/4226)	5
Technique « maison » : immunoélectrophorèse	3
<b>AUTRES</b>	<b>5</b>
THE BINDING SITE Freelite kappa libre (BN prospec, BNII) (Réf : LK016.P, LK016.T)	1
ELITECH / HELENA KIT REP/SPIFE IFE (ref: 22000-20000-20001)	1
Non précisé ou code erroné	3

**Tableau VIII** : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : évolution des techniques utilisées sur 4 années.

	2003		2004		2005		2006	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Nombre de participants	1340		1423		1431		1370	
Immunofixation	1310	97,8	1375	96,6	1292	90,3	1205	88,0
Électrophorèse capillaire	14	1,0	22	1,5	138	9,6	177	12,9
Immunoélectrophorèse	24	1,8	35	2,5	22	1,5	11	0,8
Autres	3		2		2		5	

## 2 – 2 – Résultats

La réponse attendue « absence d'immunoglobuline monoclonale » a été rendue par 95,5% des participants (tableau IX). Parmi les 62 autres réponses, 53 concluent à la présence d'immunoglobuline monoclonale de diverses caractérisations avec une prédominance du type IgG Kappa (81%). Sur ces 53 réponses ayant conclu à la présence d'immunoglobuline monoclonale, 30 ont été rendues en électrophorèse capillaire (17% des utilisateurs de cette technique) (tableau X). Les 9 autres laboratoires ont répondu résultat « ininterprétable » : 8 laboratoires ont utilisé une technique d'électrophorèse capillaire. Sur l'ensemble des réponses (1370), plusieurs laboratoires ont précisé avoir eu des difficultés à interpréter le tracé avec la technique d'électrophorèse capillaire.

**Tableau IX** : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : résultats – Sérum 06G9

Résultat 06G9	Effectif
<b>Absence d'immunoglobuline monoclonale</b>	<b>1308 (95,5%)</b>
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa	43
Ininterprétable	9
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Lambda	2
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgA Lambda	2
Prélèvement transmis pour tests en présence de sérums anti-IgD et anti-IgE	2
Présence de protéine de Bence Jones Lambda	1
Présence de protéine de Bence Jones Kappa	1
Double anomalie monoclonale	1
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa + protéine de Bence Jones Kappa	1



**Tableau X** : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : résultats erronés par réactif (62 laboratoires) – Sérum 06G9

	Nombre d'utilisateurs du réactif	Présence d'Ig monoclonale de type IgG Kappa*	Présence d'Ig monoclonale de type IgG Kappa + protéine de Bence Jones Kappa	Présence de protéine de Bence Jones Kappa ou lambda*	Présence d'Ig monoclonale de type IgG Lambda	Présence d'Ig monoclonale de type IgA Lambda	Prélèvement transmis pour tests en présence de sérums anti-IgD et anti-IgE	Double anomalie monoclonale	Nombre de résultats erronés	Ininterprétable*
BECKMAN Paragon IFE (QXA1)	15	1							1	1
BECKMAN Electrophorèse capillaire (QEA2)	17	2							2	2
ELITECH / HELENA Kit Titan gel IFE 2000 (QXH5)	59	3				1			4	
ELITECH / HELENA SAS-I Immunofix (QXH7)	30					1			1	
SEBIA Capillarys Immunotyping (QESC)	160	26	1				1		28	7
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasys] (QXS8)	584	6		1	1		1		9	
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasys] (QXS9)	268	3			1				4	
SEBIA Hydragel 6/12 IF Penta (MD) ) [Hydrasys] (QXSC)	13	1							1	
SEBIA Hydragel IF K20/ double IF K20 (QXS6)	167	2		1					3	
SEBIA Hydragel IF Penta K20 (QXSE)	10							1	1	
THE BINDING SITE Freelite kappa libre (BN prospec, BNII) (QEJ5)	1			1					1	

\* Pour chacun de ces trois types de réponses, une réponse a été donnée à l'aide de deux réactifs :

- Présence d'Ig monoclonale de type IgG Kappa : QXS8 + QXSC
- Présence de protéine de Bence Jones Kappa : QXS8 + QEJ5
- Ininterprétable : QXA1 + QEA2

### 3 – Couples de réponses Electrophorèse / Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Le nombre de laboratoires ayant fourni à la fois une conclusion à l'électrophorèse et un résultat pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale est de 1303. La combinaison attendue était « Hypergammaglobulinémie » + « Absence d'immunoglobuline monoclonale ». Elle a été rendue par 76% des laboratoires. L'ensemble des combinaisons rendues par les participants est détaillé dans le tableau XI.

Tableau XI : Couple des réponses Electrophorèse / Recherche d'Ig monoclonale – Sérum 06G9

Conclusion de l'électrophorèse	Résultat de la recherche d'Ig Monoclonale	Effectif
<b><i>Hypergammaglobulinémie.</i></b>	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	990
	Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa ou lambda	5
	Double anomalie monoclonale	1
	Ininterprétable	1
Résultats en faveur d'un syndrome infectieux.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	44
Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher un syndrome inflammatoire.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	15
Electrophorèse des protéines d'aspect normal.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	4
Résultats à contrôler dans un mois.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	30
	Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa	2
Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	76
	Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa ou Lambda ou de type IgA lambda	35
	Prélèvement transmis pour tests en présence de sérums anti-IgD et anti-IgE	2
	Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa + protéine de Bence Jones Kappa	1
	Présence de protéine de Bence Jones Kappa	1
	Ininterprétable	4
Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une insuffisance hépato-cellulaire.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	81
	Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa	1
Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher une dyslipidémie.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	3
Résultats nécessitant des examens complémentaires pour rechercher un déficit immunitaire.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	2
Résultats en faveur d'une carence nutritionnelle.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	4
Résultats en faveur d'un syndrome néphrotique.	<b><i>Absence d'immunoglobuline monoclonale</i></b>	1

***Les réponses attendues sont signalées en gras et italique***

## Conclusion

L'échantillon distribué pour l'opération 06AT11 du Contrôle National de Qualité en Immunopathologie était un sérum présentant une hypergammaglobulinémie. L'hypergammaglobulinémie est une « situation » biologique fréquemment rencontrée. Reflet d'une stimulation polyclonale du système immunitaire, elle est mise en évidence chez les patients atteints d'infections chroniques, de maladies inflammatoires, de maladies

systémiques, etc... Le diagnostic d'hypergammaglobulinémie repose sur l'électrophorèse des protéines sériques, où on note une augmentation polyclonale de la fraction des  $\gamma$ -globulines. L'hypergammaglobulinémie ne doit pas être confondue avec la présence d'une immunoglobuline monoclonale, mise en évidence à l'électrophorèse par l'existence d'un pic étroit.

La majorité des participants (76%) a rendu les réponses attendues, à savoir « Hypergammaglobulinémie » à l'électrophorèse des protéines sériques et « Absence d'immunoglobuline monoclonale » à la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale. Cependant, 53 laboratoires sur 1370 ont confondu l'hypergammaglobulinémie avec une immunoglobuline monoclonale. Ces 53 mauvaises réponses ont été obtenues dans 56,6% des cas avec une technique d'électrophorèse capillaire. Sachant que 16,9% des utilisateurs d'électrophorèse capillaire (soit 30 laboratoires sur 177) ont donné une mauvaise réponse, contre 1,9% des utilisateurs d'immunofixation (soit 24 laboratoires sur 1205), il est licite de penser que le pourcentage élevé de mauvaises réponses liées à l'électrophorèse capillaire est secondaire à une formation insuffisante des utilisateurs sur ces appareils.

Les conséquences d'une mauvaise interprétation de l'analyse, aboutissant à la conclusion erronée de « présence d'une immunoglobuline monoclonale », à une concentration d'environ 20 g/l » méritent d'être soulignées : mauvaise orientation du patient vers une consultation spécialisée pour recherche d'hémopathie lymphoïde B, examens complémentaires tant radiologiques que biologiques non nécessaires, et surtout anxiété du patient. Il est donc à souhaiter que les résultats du Contrôle National de Qualité 2006 en Immunopathologie soient étudiés par les participants avec toute l'attention qu'ils méritent et atteignent leur but éducatif dans la formation continue des professionnels de santé.

# Echantillon 06G8

## 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 06G8. Ils ont répondu de façon unanime :

- pour le dépistage des anticorps anti-nucléaires en IFI sur cellules HEp2 : fluorescence positive d'aspect moucheté, présence d'anticorps anti-nucléaires à titre supérieur ou égal à 640 (médiane = 1280)
- pour l'identification :
  - Absence d'anticorps anti-ADN natif
  - Présence d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles ;Spécificité : anticorps anti-Sm, anti-RNP et anti-SS-A.

### Résultats des participants

#### 1 – Dépistage des anticorps anti-nucléaires

Parmi les 579 laboratoires ayant effectué cette analyse, 576 ont utilisé l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp2 dont 4 ont également employé une autre technique. Les 3 autres laboratoires ont utilisé une autre technique sans avoir recours à l'IFI sur cellules HEp2.

##### 1 – 1 Matériel et méthodes

##### 1 – 1 – 1 Immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2.

Grossissement de l'objectif : sept laboratoires n'ont pas renseigné cet item. Les grossissements x40 et x50 sont utilisés par 96% des participants (tableau XII). Ce taux est légèrement supérieur à celui de la dernière opération (95%) qui a eu lieu en 2005 (05AT11).

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

Grossissement de l'objectif	Effectif
16	1
20	3
25	7
<b>40</b>	<b>486</b>
<b>50</b>	<b>64</b>
60	4
63	1
100	6

Dilution de dépistage : 18 laboratoires n'ont pas renseigné cet item. Les dilutions de dépistage 1:80 et 1:100 sont utilisées par 84,8% des participants contre 80,5% en 2005 (tableau XIII). Pour les dilutions de dépistage 1:40 et 1:50, le pourcentage de laboratoires les utilisant (9,4%) continue de diminuer par rapport aux opérations précédentes (14,6% en 2005, 17,1% en 2003).

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

Titre de dépistage en inverse de dilution	Effectif
1	1
20	3
30	1
40	51
50	2
<b>80</b>	<b>419</b>
<b>100</b>	<b>57</b>
128	1
160	19
320	3
640	3
800	1

**Réactifs** : les réactifs utilisés par les participants sont répertoriés dans le tableau XIV. Les utilisateurs de cellules HEp2000 représentent 21,3% des participants (23,9% en 2005 et 25,7% en 2003). Le nombre de laboratoires employant une technique « maison » (4) reste faible et stable (5 en 2005).

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

Réactif d'IFI sur cellules HEp2	Effectif
BIOADVANCE IF-HEp2 / Foie de primate	24
BIOADVANCE IF-HEp20-10 / Foie de primate	7
BIOADVANCE IFI : HEp2 anti ANA	64
BIOADVANCE IFI : HEp20-10 anti ANA	75
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ANA Test	2
<b>BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Coffret Hep 2000</b>	20
<b>BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Coffret HEp 2000 (ANA-Ro)</b>	58
<b>BIOMEDICAL DIAGNOSTICS HEp 2000 (lames et conjugué)</b>	19
BIO-RAD Quantafluor Lame HEp2	181
DIAMED ANA Hep-2 cells IFA (Gamme DIAMEDIX)	1
DIAMED Kit Tests AAN HEp2 coffret complet (Gamme ZEUS)	10
DIAMED Lame HEp2 (Gamme ZEUS)	6
DIASORIN Anafluor	1
<b>IMMUNOCONCEPT ANA-Ro fluorescent HEp2000</b>	26
INGEN / ZEUS ANA HEp2 IFI (ref 24012B)	4
INGEN ANA HEp2 IFI	1
INSTITUT J.BOY HEp2.ANA	4
INSTITUT J.BOY LAMES HEp2	2
MENARINI DIAGNOSTICS Nova- lite ANA HEp2	19
ORGENTEC Cellules HEp2 Coffret	11
ORGENTEC Cellules HEp2 lames	2
SERVIBIO ServIF Hep	13
Technique "maison"	4
THE BINDING SITE Coffret ANA cellules HEp2 - technologie AIM	1
THE BINDING SITE Kit ANA cellules HEp2	12
THE BINDING SITE Lames HEp2	3
Non précisé ou code erroné	6

**Les réactifs utilisant des cellules Hep 2000 sont signalés en gras**

#### **1 – 1 –2 Autres techniques**

Les réactifs utilisés par les 7 laboratoires utilisant une technique autre que l'IFI sur HEp2 sont répertoriés dans le tableau XV.

**Tableau XV** : Autres techniques que l'IFI sur cellules HEp2 – réactifs utilisés par les participants

Réactif utilisant une technique autre que l'IFI sur cellules HEp2	Effectif
ALL DIAG ENACHECK	1
IFI / foie de rat	1
IFI / rein de souris	1
INVERNESS Visualine LED-DNP	1
PHARMACIA Symphony Well	2
Non précisé	1

## 1 – 2 Résultats

### 1 – 2 – 1 Immunofluorescence indirecte sur cellule HEp2.

Concernant les résultats qualitatifs, on observe 568 résultats positifs et 4 résultats négatifs, soit 99,3% de bonnes réponses. Les résultats négatifs ne sont pas liés à un réactif en particulier. Ces laboratoires ont utilisé une dilution de dépistage adaptée. Un des laboratoires a utilisé un grossissement non adéquat (x100). Les laboratoires ont majoritairement rendu un aspect moucheté de la fluorescence (97,3%) (tableau XVI).

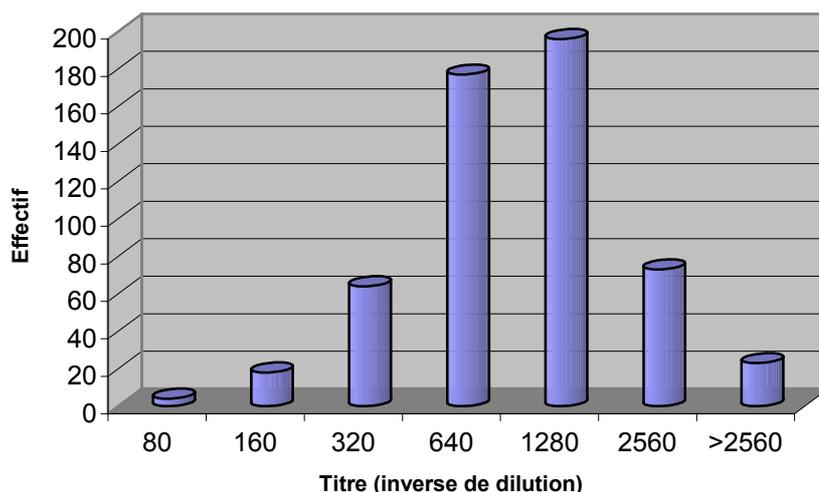
**Tableau XVI** : Aspect de la fluorescence – échantillon 06G8

Aspect de la fluorescence	Effectif
Moucheté	546
Nucléolaire	6
Homogène	4
Dots nucléaires	3
Centromère	2

Concernant les 555 résultats quantitatifs recueillis (figure 6), la médiane des titres en inverse de dilution est de 1280. La répartition des titres acceptables est :

- Titre à 1:640 : 31,9% de résultats
- Titre à 1:1280 : 35,3% de résultats
- Titre à 1:2560 : 13,2% de résultats

**Figure 6** : Distribution des titres en inverse de dilution - Echantillon 06G8



### 1 – 2 – 2 Autres techniques

On observe 6 résultats positifs et un résultat négatif.

## **1 – 3 Analyses des réponses**

### **1 – 3 – 1 Immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2.**

Concernant la mise en œuvre de l'immunofluorescence indirecte, seuls 3,8% des participants ont employé un grossissement inadéquat pour la recherche d'anticorps anti-nucléaires (< 40 ou > 50). Ils étaient 5% en 2005. Par contre, 5,7% des laboratoires utilisent encore une dilution de dépistage inadaptée (< 1 :40 ou > 1 :100). Il n'y a donc pas d'amélioration depuis 2005 (5,3%).

Concernant les résultats de l'analyse de l'échantillon 06G8, ils sont à comparer à ceux obtenus en 2000 sur l'échantillon 00G7. En effet, les échantillons 06G8 et 00G7 sont identiques. En réponse qualitative, le taux excellent de bonnes réponses (>99%) est identique pour les deux échantillons et s'explique par un titre élevé en anticorps anti-nucléaires. On note une amélioration sur l'interprétation de l'aspect de la fluorescence. Alors qu'en 2000, 96% des réponses étaient en accord avec la réponse attendue « aspect moucheté », ce taux atteint 97,3% en 2006.

Concernant le titre en anticorps anti-nucléaires, on note une nette amélioration des résultats avec des titres plus élevés qui se rapprochent de ceux des experts. Les résultats supérieurs ou égaux à 1 : 1280 représentaient seulement 39,1% des réponses en 2000. Ils représentent 52,6% des réponses en 2006. On assiste en parallèle à une diminution des titres moyens (1:320 et 1:640) : 54,1% en 2000 et 43,4% en 2006. Ces résultats peuvent être en partie expliqués par une amélioration dans le choix de la méthode de travail : en 2000, 6,5% des laboratoires utilisaient une dilution de dépistage inadaptée contre 5,7% en 2006, et 6,9% un grossissement inadéquat contre 3,8%.

### **1 – 3 – 2 Autres techniques**

Les trois laboratoires ayant utilisé une autre technique seule (pas d'IFI sur cellule HEp2 réalisée) emploient des réactifs utilisés habituellement par les autres laboratoires dans la phase d'identification des anticorps anti-nucléaires (Pharmacia Symphony Well, All Diag Enacheck et Inverness Visualine LED-DNP). Rappelons que dans la nomenclature des actes de biologie médicale, seule l'IFI sur cellule HEp2 est cotée pour le dépistage des anticorps anti-nucléaires

## **2 – Anticorps anti-ADN natif**

Le nombre de laboratoires ayant effectué la recherche d'anticorps anti-ADN natif sur l'échantillon 06G8 est de 452. Parmi eux, 7 laboratoires n'ont pas fait le dépistage anticorps anti-nucléaires au préalable.

### **2 – 1 Matériel et méthodes**

Les réactifs utilisés font appel à diverses techniques (tableau XVII). La plus employée reste l'immunofluorescence indirecte avec 42,3% d'utilisateurs même si on observe une tendance à la baisse (46% en 2005). Puis, viennent l'ELISA avec 36,7% (33% en 2005) d'utilisateurs et l'immunodot avec 17% (15,8% en 2005). Les techniques RIA et celles d'agglutination de particules de latex restent peu représentées, avec respectivement 1,1 et 0,9% d'utilisateurs. Enfin, la cytométrie en flux apparue au contrôle 05AT11 stagne à 1,8% d'utilisateurs. Notons l'apparition de la chimiluminescence pour les anticorps anti-DNA natif.

**Tableau XVII** : Anticorps anti-ADN natif : réactifs et résultats – échantillon 06G8

réactifs Anticorps anti-ADN natif	Echantillon 06G8		
	Effectif	Résultats négatifs	Résultats positifs
<b>Immunofluorescence indirecte</b>	<b>187</b>	<b>178</b>	<b>8</b>
BIOADVANCE IFI : crithidia luciliae anti-nDNA	58	58	
BMD Recherche des anticorps anti DNAn par IFI	23	22	1
BMD Coffret de détection des anticorps anti DNA natifs	15	15	
BIO-RAD Quantafluor ADN / Crithidia luciliae	62	60	1
DIAMED Tests Ds-DNA coffret complet (gamme Zeus)	1	1	
DIAMED Lame Crithidia Luciliae (gamme Zeus)	5	5	
MENARINI DIAGNOSTICS Nova lite ADN db	6	4	2
ORGENTEC Critidia luciliae Coffret	5	2	3
ORGENTEC Critidia luciliae 10 Lames	1	1	
SERVIBIO Fluoro Ndna	2	2	
THE BINDING SITE Coffret DNA db crithidia luciliae	4	4	
THE BINDING SITE Lames crithidia luciliae	3	2	1
Technique "maison" : IFI	2	2	
<b>ELISA</b>	<b>162</b>	<b>157</b>	<b>3</b>
BIOADVANCE Elisa anti-dsDNA	15	15	
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS DNA-LISA	12	12	
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS DNA/Nuc-LISA	2	2	
BIO-RAD Kallestad anti - ds DNA microplate EIA	42	41	
DIASORIN Eti-ds DNA	8	7	1
MENARINI Quanta lite ADN double brin	2	2	
ORGENTEC Anti-dsDNA IgG	4	4	
ORGENTEC Anti-dsDNA IgG (Alegria)	3	3	
ORGENTEC Anti-ssDNA IgG	1	1	
PHARMACIA Varelisa dsDNA antibodies EIA	6	6	
PHARMACIA Varelisa Recombi ANA profile	5	5	
PHARMACIA EliA ds DNA Well	48	46	1
THE BINDING SITE Bindazyme (anti-DNA double brin)	9	9	
THE BINDING SITE Farrzyme (anti-ADN double brin haute affinité)	1	1	
Technique "maison" : ELISA	4	3	1
<b>Immunodot</b>	<b>75</b>	<b>70</b>	<b>5</b>
BIOADVANCE Euroassay profil SLE	2	2	
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA profil, dsDNA	7	3	4
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 3	16	16	
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS DNA-Dot	50	49	1
<b>RIA</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
Trinity Biotech anti-ADN db	2	1	1
DPC Anti-ADN (Farr)	3	3	
<b>Cytométrie</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>6</b>
BMD Fidis connective 10	7	2	5
BIO-RAD BioPlex®2200 ANA Screen	1		1
<b>Latex</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
DIAGNOSPHERE BIOCONTROL Visualine ADNn	2	2	
SERVIBIO Servitex anti n DNA	2	2	
<b>Chimiluminescence</b>	<b>1</b>		
DIASORIN LIAISON dsDNA (310310)	1		
<b>Non précisé ou Code erroné</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>1</b>

## 2 – 2 Résultats

Le taux de bonnes réponses est de 94,6% (424 réponses négatives). 4 laboratoires n'ont pas rendu de résultats qualitatifs.

### **2 – 3 Analyse des résultats**

En 2000, le taux de bonnes réponses était plus élevé : 96,3%. Si on exclut les résultats de cytométrie pour l'analyse de 2006, technique qui n'était pas utilisée en 2000, on retrouve le même taux de bonnes réponses en 2006 qu'en 2000.

## **3 – Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles**

413 laboratoires ont fait une recherche d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (test de dépistage global ou d'identification de la spécificité). Parmi ces laboratoires, 8 ont rendu les spécificités testées mais sans donner la réponse positive ou négative et n'entrent donc pas dans le détail des résultats.

### **3 – 1 Matériel et méthodes**

Le tableau XVIII répertorie les réactifs utilisés par les laboratoires, un même laboratoire pouvant utiliser 4 réactifs différents pour ce contrôle. La majorité des tests sont effectués en technique d'immunodot (47,6% d'utilisateurs) et en technique ELISA (47% d'utilisateurs). Quelques laboratoires utilisent les techniques d'Ouchterlony (1%), de cytométrie en flux (2%) et d'électrosynérèse (0,4%).

**Tableau XVIII** : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : réactifs – échantillon 06G8

réactifs anticorps anti-antigènes nucléaires solubles	Effectif
<b>Elisa</b>	<b>234</b>
BIOADVANCE Elisa anti ENA profil plus	26
BIOADVANCE Elisa anti ENA pool plus	7
BIOADVANCE Elisa anti JO-1	1
BIOADVANCE Elisa anti Scl70	1
BIOADVANCE Elisa anti SSA	1
BMD ENA-LISA polyvalent	5
BMD ENA -LISA	29
BMD ENA-LISA Scl70-JO-1	1
BIO-RAD ENA Screen microplate EIA	10
BIO-RAD ANA 6 Profile	38
BIO-RAD Anti SSB EIA	1
BIO-RAD Anti SSA EIA	3
BIO-RAD AntiSm/RNP EIA	1
BIO-RAD Anti Sm EIA	2
DIASORIN ETI-ANA / ENA 8 profile	1
INGEN / AESKU AESKULISA ENA 6S	1
ORGENTEC NUCLEO-9	2
ORGENTEC ENA Combi	7
ORGENTEC ENA-6-Profile	1
ORGENTEC ENA Screen (Alegria)	1
MENARINI Quanta lite anti Sm Elisa	1
MENARINI Quanta lite anti RNP Elisa	1
MENARINI Quanta lite anti SSA Elisa	1
PHADIA Varelisa ANA Profile	5
PHARMACIA Varelisa Recombi ANA profile	11
PHARMACIA Symphony Well	19
PHARMACIA Sm Well	15
PHARMACIA La Well	7
PHARMACIA Ro Well	14
PHARMACIA U1RNP Well	11
PHARMACIA RNP70 Well	5
PHARMACIA Varelisa Recombi ANA 8 Screen	1
THE BINDING SITE Bindazyme ENA : dépistage	2
THE BINDING SITE Anti-Nucléaires Profile	2
<b>Immunodot</b>	<b>237</b>
ALL DIAG ENACHECK	10
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil plus	24
BIOADVANCE Euroassay Profil SLE	3
BIOADVANCE Euroassay Profil, dsDNA	11
BIOADVANCE Euroassay Profil, M2	2
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 1	4
BIOADVANCE Euroline ANA Profil 3	43
BIOADVANCE EUROLINE ANA Profil 1	1
BIOADVANCE Euroassay anti-ENA Profil, Protéine centromérique B	2
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ENA Dot 7	110
DIASORIN Conectivitis Dot	1
DIASORIN Nucleosome + ENA Dot	2
DIASORIN ANA8 DOT (gamme D-teck)	3
DIASORIN ANA 9 dot (GAMME D-teck)	2
DIASORIN LUPUS Dot	1
DIASORIN ANA6 DOT (gamme D-teck)	2
DIASORIN ANA12 DOT (gamme D-teck)	1
INSTITUT J.BOY Kit ENA profile technique Dot	1
INGEN / INNOGENETICS Inno-lia ANA update	9
INGEN / Alphadia DOT ENA Screen	4
ORGENTEC ANA 9 Line Immunoblot	1
<b>Ouchterlony</b>	<b>5</b>
BMD Anticorps anti antigènes solubles	2
INGEN Antigène nucléaire soluble ENA	1
Technique "maison"	2
<b>Cytométrie</b>	<b>10</b>
BMD FIDIS connective 10	8
BIORAD BioPlex®2200 ANA Screen	1
INGEN AtheNA ANA II	1
<b>Electrosynérèse</b>	<b>2</b>
Technique "maison"	2
<b>Non précisé ou Code erroné</b>	<b>10</b>

### 3 – 2 Résultats

Les résultats sont présentés par spécificité dans le tableau XIX. Pour les anticorps présents, on observe des taux de bonnes réponses élevés : 99% pour les anticorps anti-Sm, 98% pour les anticorps anti-SSA et 95% pour les anticorps anti-RNP. Pour l'absence d'anticorps anti-SSB, le taux de bonnes réponses est de 98%.

**Tableau XIX** : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : nombre de mauvaises réponses par spécificité

Spécificité testée	réponse attendue	nombre de bonnes réponses	nombre de mauvaises réponses
Anti-Ag nucléaires solubles	positif	57	3
Anti-Sm	positif	385	3
Anti-RNP	positif	283	14
Anti-SSA (Ro)	positif	379	8
Anti-SSB (La)	négatif	177	3
Anti-Scl 70	négatif	52	1
Anti-Jo1	négatif	10	0
Anti-histones	négatif	3	0
Anti-centromère	négatif	1	1

#### 4 – Commentaires

On observe un taux de bonnes réponses qui s'est amélioré pour les anticorps anti-SSB : en effet le taux de résultats faussement positifs est de 1,7 % en 2006 contre 24,8% en 2000 (tableau XX)

**Tableau XX** : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : comparaison 2000-2006 du taux de bonnes réponses

Spécificité testée	Réponse attendue	Taux de bonnes réponses	
		00G7	06G8
Anti-Sm	Positif	97,7	99,2
Anti-RNP	Positif	97,3	95,3
Anti-SSA (Ro)	Positif	99,7	97,9
Anti-SSB (La)	Négatif	<b>75,2</b>	<b>98,3</b>
Anti-Scl 70	Négatif	98,1	98,1

Un certain nombre de laboratoires ont précisé ne pas avoir rendu la spécificité RNP car leur réactif ne permet qu'un dépistage global Sm/RNP, certains demandant de pouvoir coder ce mélange de spécificités. Rappelons que les anticorps anti-Sm et anti-RNP doivent être différenciés étant donné la valeur diagnostique de l'anticorps anti-Sm pour le lupus systémique. Ainsi, il n'y a pas de code permettant de rendre un résultat global Sm/RNP pour le contrôle national de qualité.

## Conclusion

Le but de l'opération de contrôle d'auto-immunité du Contrôle National de Qualité en 2006 était d'évaluer l'évolution de la pratique des laboratoires concernant la recherche et l'identification des anticorps anti-nucléaires, en comparant les résultats obtenus en 2006 à ceux obtenus en 2000, sachant que l'échantillon distribué en 2006 était le même que celui distribué en 2000.

L'analyse des données démontre clairement l'impact positif du Contrôle National de Qualité anticorps anti-nucléaires, mis en place depuis 1998, sur les méthodes utilisées par les laboratoires. En effet, l'augmentation croissante, d'année en année, du nombre de laboratoires mettant en œuvre une méthode appropriée de dépistage des anticorps anti-nucléaires en immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 est notable. Le taux de bonnes réponses globales, visible essentiellement sur le titre des anticorps des anti-nucléaires, s'en trouve être amélioré.

Une seule ombre au tableau persiste : l'identification erronée d'anticorps anti-ADN natif dans cet échantillon. Le taux de réponses faussement positives est de 5,3% soit 24 réponses sur 452 (il était de 3,7% soit 20 réponses sur 537 en 2000). Connaissant la forte valeur diagnostique des anticorps anti-ADN natif pour le lupus systémique, il est regrettable que le nombre de mauvaises réponses soit encore élevé.