

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Electrophorèse des protéines
Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Biochimie spécialisée /
Immunopathologie

03ATI1

Décembre 2004

Stéphanie ALBAREDE, Anne GUYARD et Jean-Marc HATTCHOUEL (Afssaps)
 Alain DAUNIZEAU (CH - Lens)
 Bach-Nga PHAM (Hôpital Beaujon - Clichy)

Expédition : 02 avril 2003

Clôture : 28 avril 2003

Edition des compte-rendus individuels : 24 juillet 2003

Paramètres contrôlés : **03G9 – Electrophorèse des protéines**
Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Nombre de laboratoires concernés* : 2498

Nombre de laboratoires participants** : 2383

* 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 03ATI1 a concerné les laboratoires qui pratiquent l'électrophorèse des protéines ou la recherche d'immunoglobuline monoclonale. Selon leur activité, les laboratoires avaient la possibilité de rendre les résultats de l'électrophorèse seule avec une interprétation du tracé et/ou la recherche d'immunoglobuline monoclonale. L'échantillon 03G9 contenait une immunoglobuline monoclonale IgM Lambda, mise en évidence par l'existence d'une restriction d'hétérogénéité ou d'un pic étroit dans la zone des gamma-globulines à l'électrophorèse des protéines sériques. En ce qui concerne l'électrophorèse, le gel d'agarose associé au noir amide est le plus fréquemment employé (71 % des laboratoires) ; quant à la recherche d'immunoglobuline monoclonale, l'immunofixation est utilisée par 98 % des laboratoires.

Echantillon 03G9

Electrophorèse des protéines et recherche d'immunoglobuline monoclonale

Définition de l'échantillon

L'échantillon 03G9 était un sérum liquide qui contenait une immunoglobuline monoclonale, mise en évidence par l'existence d'une restriction d'hétérogénéité ou d'un pic étroit dans la zone des gamma-globulines à l'électrophorèse des protéines sériques, selon la résolution de la technique utilisée. L'immunoglobuline monoclonale était de type IgM Lambda, à une concentration d'environ 2 g/l (dosage densitométrique). Les commentaires des différents experts figurent aux paragraphes 1 et 2 ci-dessous.

1 – Electrophorèse des protéines

Dr B.N. PHAM (Clichy), Dr A. CHEVAILLIER (Angers), Dr JM GOMBERT, Dr L. INTRATOR (Créteil).

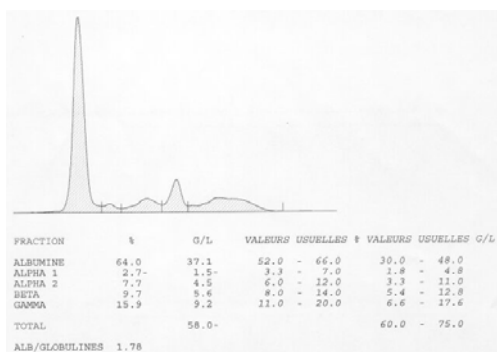
Expert n°1 : « le tracé électrophorétique montre un pic étroit dans la zone des gamma-globulines »

Expert n°2 : « le tracé électrophorétique montre en position gamma rapide un pic de modeste importance »

Expert n°3 : « le tracé électrophorétique montre un pic »

Expert n°4 : « présence d'un petit pic bêta-2 gamma rapide et de plusieurs micro-pics gamma »

figure 1 - tracé électrophorétique obtenu avec l'échantillon 03G9
support : gel d'agarose, colorant : amido-schwarz (noir amide)



2 – Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Dr B.N. PHAM (Clichy), Dr H. BERNON (Lyon), Dr A. CHEVALLIER (Angers), Dr J. DE GRAEVE (Toulouse),
Dr JM GOMBERT, Dr L. INTRATOR (Créteil).

Expert n°1 : « L'étude immunoélectrophorétique du sérum met en évidence la présence d'une immunoglobuline monoclonale de type IgM lambda. »

Expert n°2 : « L'étude en immunofixation confirme la présence d'une immunoglobuline monoclonale de classe M et de type lambda. Les immunoglobulines de classe G, A sont dans les limites de la normale. »

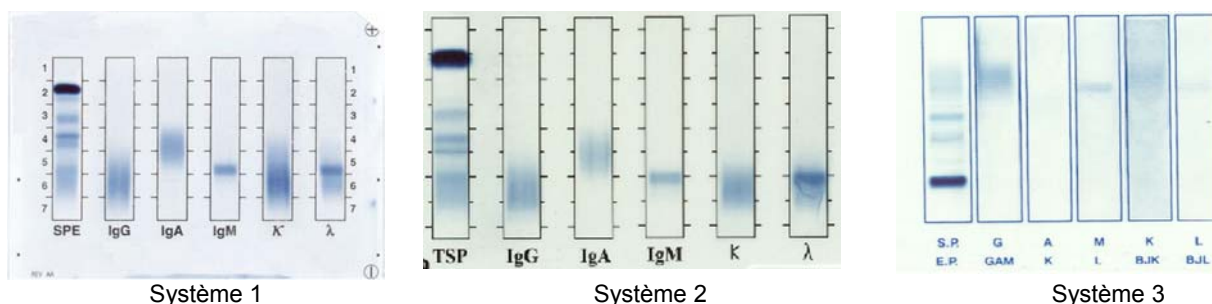
Expert n°3 : « L'étude immunoélectrophorétique, effectuée à l'aide de divers anti-sérums..., complétée par la technique d'immunofixation (Beckman), permet de préciser qu'il s'agit d'une IgM monoclonale de type lambda »

Expert n°4 : « L'immunoélectrophorèse ...permet de mettre en évidence une IgM lambda monoclonale de faible abondance sans qu'il soit possible de mettre en évidence une diminution des IgG polyclonales »

Expert n°5 : « Présence d'une anomalie monoclonale de mobilité gamma moyenne de nature IgM lambda sans chaînes légères libres associées.»

Expert n°6 : « Nous avons testé le sérum de contrôle que vous nous avez adressé, par électrophorèse capillaire (PARAGON CZE 2000 Beckman) et par immunosoustraction sur le même appareil, qui révèle la présence d'IgM lambda monoclonale en faible quantité »

figure 2 - immunofixations réalisées sur l'échantillon 03G9



Méthode statistique et expression des résultats

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

- élimination des valeurs aberrantes ;
- calcul de la valeur cible, c'est-à-dire moyenne 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.
- le coefficient de variation (CV) obtenu après cette double troncature est considéré comme représentatif de la dispersion des résultats ;
- les limites acceptables sont obtenues en appliquant à la valeur cible des pourcentages d'acceptabilité qui tiennent compte à la fois d'objectifs analytiques et d'exigences cliniques. Ces limites sont déterminées d'après les travaux du Groupe SFBC « Normes de validation du protocole de validation de techniques »

publiés dans les Annales de Biologie Clinique (*Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques*. A. Vassault, D. Grafmeyer, J. de Graeve, R. Cohen, A. Beaudonnet, J. Bienvenu, *Ann. Biol. Clin.*, 1999, 57 : 685 - 695).

Fractions	Pourcentages d'acceptabilité
Albumine	± 12%
α1-globulines	± 30%
α2-globulines	± 20%
β-globulines	± 20%
γ-globulines	± 20%

Résultats des participants

1 – Électrophorèse des protéines

Le nombre de laboratoires ayant répondu pour cette analyse est de 2294.

1 – 1 - Méthodes et réactifs

Le support le plus utilisé est le gel d'agarose : 81,2% d'utilisateurs. L'acétate de cellulose n'attire plus que 15,4% d'utilisateurs. Quant à l'électrophorèse capillaire, elle se développe lentement : 54 laboratoires en sont équipés (soit 2,3%) (tableau I).

En ce qui concerne le choix du colorant, le gel d'agarose est le plus souvent associé au noir amide (Amidoschwarz) : 1626 laboratoires ont fait ce choix, soit 70,9%. Avec ce type de support, 219 laboratoires (9,5%) utilisent le bleu acide et 19 (0,8%) le rouge ponceau. Pour l'acétate de cellulose, seul le rouge ponceau est utilisé.

tableau I – électrophorèse des protéines (%) – principes et réactifs utilisés – sérum 03G9

Principes Réactifs	Nombre d'utilisateurs	%
Electrophorèse sur Acétate de cellulose / rouge ponceau	353	15,4 %
HELENA Titan III Protéines	197	
SEBIA Sebiagel	77	
BIOMIDI Midifilm & Midiplaque Protéines	74	
SEBIA EPU Protéines	4	
OLYMPUS Hit System	1	
Electrophorèse sur Agarose / amidoschwarz (noir amide)	1626	70,9 %
SEBIA Hydragel (Hydratest) (HR) Protein(e) Hydrasys	764	
SEBIA Hydragel Protein(e) K20 (amidoschwarz)	610	
HELENA Titan Gel protéines (HR)	131	
SEBIA Hydragel β1-β2 Hydrasys	48	
BECKMAN-COULTER Paragon SPE	23	
HELENA REP β1-β2 (noir amide)	15	
HELENA REP (noir amide)	14	
BIOMIDI Protéines	13	
BIOCADE Biocagel	8	
Electrophorèse sur Agarose / bleu acide	219	9,5 %
HELENA Titan Gel SPE-IFE (bleu acide)	136	
HELENA SAS-MX SP-10 (bleu acide)	78	
HELENA SAS-MX SP-10 β1-β2 (bleu acide)	3	
HELENA SAS-1 (bleu acide)	2	
Electrophorèse sur Agarose / rouge ponceau	19	0,8 %
HELENA REP (rouge ponceau)	17	
HELENA REP β1-β2 (rouge ponceau)	2	
Electrophorèse capillaire	54	2,3 %
SEBIA Capillarys β1-β2/β1-β2+	36	
BECKMAN COULTER Paragon CZE 2000 (SPE kit)	18	
Non précisés	23	1,0 %
Total	2294	100,0 %

1 – 2 - Résultats quantitatifs (tableau II).

Sur le gel et le tracé, il fallait voir une bande discrète mais anormale dans la zone des gamma-globulines **sans modification notable des différentes fractions** (%) : albumine, α 1-globulines, α 2-globulines, β -globulines et γ -globulines.

Dans l'ensemble, les résultats sont assez homogènes.

En matière de justesse, la différence la plus notable est observée sur les α 1-globulines, estimées à des valeurs nettement plus élevées par les techniques d'électrophorèse capillaire que par les techniques en gel. Le pourcentage d' α 1-globulines pour l'ensemble des résultats est de 2,31%. Pour les techniques d'électrophorèse capillaire, ce pourcentage est de 4,52% avec le système Capillarys (Sebia) et de 5,51% avec le système Paragon CZE 2000 (Beckman Coulter).

Pour les autres fractions, les différences sont faibles. Par exemple, on peut noter pour les gamma-globulines des valeurs un peu plus élevées pour les techniques distribuées par la société Helena (proches de 16%) que pour celles de Sebia (proches de 14%). Pour l'albumine, les techniques Hydragel Sebia sur appareil Helena Junior 24 et Helena Titan III sur Process 24 rendent des valeurs légèrement inférieures à la moyenne générale. Cette baisse de la valeur de l'albumine se répercute sur les valeurs des bêta-globulines qui sont, elles, un peu plus élevées que la moyenne.

En terme de précision, on retiendra les CV(%) très bas de la technique d'électrophorèse capillaire Paragon CZE 2000 (Beckman-Coulter). Pour les techniques en gel, les meilleurs CV(%) sont généralement obtenus avec le support agarose couplé à l'amidoschwarz.

tableau II - électrophorèse des protéines (%) - résultats par réactifs et appareils (N ≥ 15) – sérum 03G9

Réactifs Appareil	N	Albumine		α 1-globulines		α 2-globulines		β -globulines		γ -globulines	
		Valeur cible	CV (%)	Valeur cible	CV (%)	Valeur cible	CV (%)	Valeur cible	CV (%)	Valeur cible	CV (%)
ENSEMBLE DES RESULTATS	2294	60,97	5,6	2,31	22,0	10,05	11,8	11,63	10,9	14,99	11,6
BECKMAN-COULTER Paragon CZE 2000 (SPE kit)	18	58,73	1,6	5,51	5,3	10,78	4,9	9,89	4,3	15,23	1,6
BECKMAN-COULTER Paragon SPE	23	60,50	5,9	2,93	22,2	8,29	18,6	12,09	16,7	15,51	10,8
BIOMIDI Midifilm & Midiplaque Protéines	74	60,69	6,2	2,70	19,2	8,17	14,9	11,68	12,3	16,63	12,4
- dont appareil SEBIA Profil	22	60,09	6,2	2,90	18,0	8,07	9,8	11,95	13,0	16,85	10,2
- dont appareil SEBIA Préférence	18	62,12	3,5	2,73	18,9	7,92	12,5	11,50	9,8	15,74	12,6
HELENA REP (rouge ponceau)	17	59,93	5,3	2,49	28,4	8,99	15,2	12,07	11,9	16,51	7,7
HELENA REP β1-β2 (amidoschwarz)	15	58,88	6,2	2,54	20,6	9,04	15,2	12,99	12,1	16,65	14,1
HELENA SAS-MX SP-10 (bleu acide)	78	59,61	6,1	2,57	26,5	9,64	12,9	12,09	12,1	16,19	12,6
- dont appareil HELENA Junior 24	47	58,98	6,3	2,71	24,0	9,54	13,6	12,37	11,3	16,47	12,8
- dont appareil HELENA Process 24	17	60,18	5,0	2,26	27,2	9,79	12,8	11,99	9,5	15,66	9,8
HELENA Titan Gel Protéines (HR)	131	59,54	5,8	2,21	26,4	10,64	9,7	12,20	10,8	15,39	9,7
- dont appareil HELENA Polyslit (automate)	48	59,88	6,4	1,95	22,6	10,78	10,4	12,57	8,7	14,91	11,2
- dont appareil HELENA Junior 24	34	58,89	4,6	2,53	29,8	10,49	10,1	12,03	10,2	16,10	9,5
HELENA Titan Gel SPE-IFE (bleu acide)	136	60,77	5,9	2,22	24,1	10,16	12,2	11,37	13,4	15,53	11,8
- dont appareil HELENA Polyslit (automate)	46	60,67	7,5	2,09	24,9	10,16	12,6	11,58	15,3	15,38	13,4
- dont appareil HELENA Junior 24	30	59,29	6,8	2,47	24,0	10,58	11,1	11,28	10,9	16,22	13,1
- dont appareil HELENA Polyscan	19	60,77	5,4	2,11	22,9	10,56	10,2	11,52	13,7	15,04	9,8
HELENA Titan III Protéines	197	58,28	6,2	2,26	31,6	9,86	15,3	13,02	9,8	16,39	11,0
- dont appareil HELENA Junior 24	114	58,15	6,1	2,19	28,5	9,90	14,6	13,07	10,2	16,55	10,1
- dont appareil HELENA Process 24	36	56,78	5,4	2,36	30,9	10,34	14,7	13,44	7,9	16,95	6,5
SEBIA Capillarys β1-β2/β1-β2+	36	57,59	2,8	4,52	17,9	10,60	5,0	11,31	3,6	15,92	2,7
SEBIA Hydrigel (Hydratest) (HR) Protein(e) Hydrasys	764	62,40	4,4	2,22	12,7	10,15	7,1	10,93	7,9	14,34	9,5
- dont appareil SEBIA Hydrasys (automate)	588	62,54	4,3	2,21	11,9	10,13	7,2	10,87	7,8	14,31	9,5
- dont appareil SEBIA Hyrys 2 Hit	72	63,40	2,8	2,15	12,4	9,90	5,8	10,76	5,3	13,91	7,4
- dont appareil SEBIA Préférence	38	59,79	3,8	2,28	11,4	10,71	4,9	11,86	7,1	15,36	7,9
- dont appareil SEBIA Préférence-Ecran	19	61,96	3,5	2,27	13,9	10,34	5,1	11,18	6,4	14,58	12,7
- dont appareil SEBIA Phoresis (logiciel)	15	63,94	4,6	2,11	12,0	9,86	8,9	10,30	5,6	13,63	10,2
SEBIA Hydrigel β1-β2 Hydrasys	48	62,12	4,8	2,01	13,5	10,15	7,7	11,68	7,7	14,12	9,7
- dont appareil SEBIA Hydrasys (automate)	28	62,66	3,5	1,94	13,7	10,00	6,5	11,55	6,4	14,26	9,4
SEBIA Hydrigel Protein(e) K20 (amidoschwarz)	610	60,90	4,7	2,23	15,8	10,46	7,3	11,90	7,4	14,49	10,0
- dont appareil SEBIA Préférence	146	60,75	3,7	2,19	13,9	10,56	6,4	12,01	6,4	14,55	8,9
- dont appareil SEBIA DVSE	134	61,36	3,8	2,23	13,8	10,36	6,1	11,82	6,1	14,17	8,8
- dont appareil SEBIA Hyrys 2 Hit	87	62,45	3,7	2,11	13,0	10,06	5,9	11,43	5,6	13,96	9,9
- dont appareil SEBIA DVS	61	58,99	4,5	2,29	14,5	10,72	5,9	12,18	7,0	15,64	9,2
- dont appareil SEBIA Préférence-Ecran	51	61,14	4,1	2,19	16,1	10,45	7,1	11,90	6,2	14,23	8,3
- dont appareil SEBIA Profil	45	60,96	5,3	2,23	19,9	10,46	8,3	11,81	7,2	14,58	10,2
- dont appareil HELENA Junior 24	32	56,78	4,9	2,58	16,1	11,49	5,0	13,11	6,7	15,77	9,0
SEBIA Sebiagel	77	61,83	6,3	2,55	16,0	7,86	16,3	11,72	13,2	15,88	11,3
- dont appareil SEBIA Profil	19	62,49	7,0	2,53	14,6	7,61	20,8	11,55	12,3	15,72	15,0
- dont appareil SEBIA Préférence	17	62,79	4,8	2,42	14,0	7,54	17,2	11,59	10,2	15,68	10,6

1 – 3 - Interprétation du tracé

Sur le gel et le tracé, il fallait voir une bande discrète mais anormale dans la zone des gamma-globulines. La réponse comportait une analyse du tracé et un commentaire associé.

La réponse attendue était « **Restriction d'hétérogénéité dans la zone des gamma-globulines** » ou « **Pic étroit dans la zone des gamma-globuline** », assortie dans les deux cas du commentaire « **Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale** ».

Le nombre de laboratoires ayant donné une bonne réponse, complète ou partielle, est de 1404 soit 61% des laboratoires participants. Le tableau III en donne la répartition.

tableau III - électrophorèse des protéines - bonnes réponses : analyse du tracé et commentaire – sérum 03G9

Analyse du tracé	Commentaire	Nombre de laboratoires
Restriction d'hétérogénéité dans la zone des gamma-globulines ou Pic étroit dans la zone des gamma-globulines	Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale	N (%)
+	+	1174 (51,2%)
-	+	194 (8,5%)
+	-	36 (1,6%)

Concernant les laboratoires qui ont conclu que l'électrophorèse avait un « aspect normal », le tableau IV donne la répartition des laboratoires en fonction du colorant utilisé.

tableau IV - électrophorèse des protéines – analyse des résultats faussement négatifs des participants (aspect normal à l'électrophorèse) en fonction du colorant utilisé – sérum 03G9

Colorant	Nb d'utilisateurs	% de résultats « faux négatifs »
rouge ponceau	372	61,4 %
bleu acide	219	29,0 %
amidochwarz (noir amide)	1626	22,0 %
électrophorèse capillaire	54	1,9 %

On peut noter que les laboratoires qui ont utilisé le **rouge ponceau** ont dans la majorité des cas (61,4%) conclut « électrophorèse d'aspect normal », contre 29% pour le bleu acide et 22% pour le noir amide et 2% pour l'électrophorèse capillaire.

2 – Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Le nombre de laboratoires ayant participé à cette analyse est de 1340. La participation a donc augmenté de 12,3% en un semestre, vraisemblablement suite au questionnaire de 2002. En effet, entre cette opération 03ATI1 et l'opération 02ATI1 (octobre 2002), l'Afssaps a adressé un questionnaire à l'ensemble des laboratoires français pour mettre à jour la base de données « activité des laboratoires » qui permet de cibler les laboratoires auxquels doivent être envoyés les différents échantillons de contrôles.

1 – 1 - Méthodes et réactifs

La répartition des méthodes utilisées par les participants est précisée dans le tableau V. L'immunofixation est utilisée seule ou associée à une autre technique par 97,7 % des participants.

Les réactifs utilisés quelle que soit la méthode choisie sont répertoriés dans le tableau VI.

tableau V - recherche d'immunoglobuline monoclonale : techniques utilisées par laboratoire – sérum 03G9

Immunofixation : nombre de réactifs utilisés	Immunoélectrophorèse, immunoblot, électrophorèse capillaire ou autre : nombre de réactifs utilisés	Nombre de laboratoires
1	0	1241
2	0	59
0	1	28
1	1	10
0	2	2*

*Ces laboratoires ont utilisé deux techniques « maison » : une immunoélectrophorèse et un immunoblot.

tableau VI - recherche d'immunoglobuline monoclonale : techniques et réactifs utilisés – sérum 03G9

Techniques Réactifs	Nombre de laboratoires
Immunofixation	
SEBIA Hydragel 1, 2 et 4 IF / Hydratest 1,2et4 IF	691
SEBIA Hydragel IF K20 / double IF K20	378
HELENA Kit Titan gel IFE 2000	82
HELENA Titan gel haute résolution immunofix	47
SEBIA Hydragel 2/4 Bence Jones	45
HELENA Titan gel SPE-IFE	40
HELENA Kit REP/SPIFE IFE 6-4-2	25
BECKMAN Paragon IFE	22
SEBIA Hydragel Bence Jones K20	22
BIOCADE Kit Biocagel IF	5
BIOMIDI Immunofixation sur Midigel IFE	2
Electrophorèse Capillaire	
BECKMAN Réactif d'IF pour l'EP capillaire	14
Immunoélectrophorèse	
SEBIA Hydragel IEP	12
Technique « maison » : immunoélectrophorèse	7
HELENA Titan gel pour immunoélectrophorèse	4
HELENA plaques d'immunoélectrophorèse	1
Immunoblot	
Technique « maison » : immunoblot	3

1 – 2 - Résultats

La réponse attendue « Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgM Lambda » a été rendue par 91% des participants. La répartition des réponses figure au tableau VII.

tableau VII - recherche d'immunoglobuline monoclonale : répartition des réponses – sérum 03G9

Réponses	Nombre de laboratoires
Présence d'Ig monoclonale de type IgM Lambda	1219
Présence d'Ig monoclonale de type IgM Lambda + protéine de Bence Jones	89
Absence d'Ig monoclonale	27
Présence d'Ig monoclonale de type IgM Kappa	3
Présence d'Ig monoclonale de type IgA Lambda	1
Présence d'Ig monoclonale de type IgA Kappa	1

Analyse globale des 27 réponses « Absence d'Ig monoclonale »

Tous ces laboratoires ont effectué l'électrophorèse des protéines.

Parmi eux, un laboratoire n'a pas rendu de conclusion pour cet examen mais a signalé une hypoalbuminémie.

Les 26 autres laboratoires ont donné une conclusion pour l'électrophorèse des protéines dont la répartition est la suivante :

- une conclusion « résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale » associée au commentaire « pic étroit dans la zone des gamma-globulines ». Il n'y a pas de commentaire sur le bordereau-réponse quant à la discordance des résultats de l'électrophorèse avec celui du test d'immunofixation.
- une conclusion « résultats à contrôler dans un mois » associée au commentaire « diminution de la fraction beta2-globulines ».
- 24 conclusions « Electrophorèse des protéines d'aspect normal ». Parmi ces réponses, 18 sont associées à la réponse « pas de commentaire particulier », 3 au commentaire « hypoalbuminémie », 1 au commentaire « bande large dans la zone des gamma-globulines » et 1 au commentaire « pic étroit large dans la zone des alpha1-globulines ». Enfin, une réponse est associée à 2 commentaires : « hypoalbuminémie » et « diminution de la fraction alpha2-globulines ».

Un courrier adressé à ces 27 laboratoires a tenté de rechercher l'origine de l'erreur.

Parmi les 18 réponses reçues, 6 laboratoires confirment leur résultat mais on ne retrouve ni lot commun de réactif ni un anti-sérum commun. Douze laboratoires ne maintiennent pas leur réponse initiale : erreur de codage (2 laboratoires), mauvaise lecture du gel d'immunofixation (6 laboratoires), rendu de résultat au vu de l'électrophorèse « normale » sans avoir réalisé d'immunofixation (2 laboratoires), pas d'explication (2 laboratoires).

Commentaires

1 – Electrophorèse des protéines

Les deux principaux systèmes actuellement utilisés sont Sebia (1539 utilisateurs sur 2294, soit 67%) et Helena (595 utilisateurs sur 2294, soit 26%), sachant que les systèmes d'électrophorèse capillaire équipent à ce jour 54 laboratoires, soit 2,3 % des utilisateurs.

Sur le plan des performances analytiques, les résultats d'ensemble sont bons : les valeurs moyennes obtenues pour chaque fraction sont comparables à celles obtenues lors du dernier contrôle en 1999. Une exception : les moyennes observées pour les α -1 globulines sont 2 à 3 fois plus élevées en électrophorèse capillaire qu'en gel, d'où un CV global de 22% pour cette fraction (CV global de 16,4% en 1999). Concernant les techniques d'électrophorèse capillaire, on constate que les différentes fractions sont évaluées (en %) avec des précisions supérieures à celles des techniques sur gel. Les logiciels qui recalculent les fractions classiques à partir des données mesurées semblent bien au point.

Pour cette opération de contrôle, nous n'avons fait aucune analyse statistique pour les résultats exprimés en g/l, qu'il serait bon d'abandonner pour plusieurs raisons :

- les colorants utilisés pour la révélation des fractions ne se fixent pas de façon identique sur chaque type de protéines, à plus forte raison en présence d'immunoglobuline monoclonale ou de protéine de Bence Jones.
- l'erreur faite sur la mesure de chaque fraction s'ajoute à celle faite sur le dosage des protéines totales, erreur qui peut devenir importante en présence, là encore, d'une immunoglobuline monoclonale pouvant augmenter la viscosité du sérum et perturber le prélèvement de l'échantillon.

Le sérum 03G9 contenait une immunoglobuline monoclonale en faible quantité (2 g/l), suffisante cependant pour observer soit une restriction d'hétérogénéité, soit un pic étroit dans la zone des γ -globulines. Or, 866 laboratoires sur 2294 (37,8%) n'ont signalé aucune anomalie à l'électrophorèse en rapport avec la présence d'immunoglobuline monoclonale. Ces laboratoires sont certainement confrontés à un **défaut de sensibilité de leur technique**. Ce défaut peut être lié au choix de la technique elle-même, à un problème de séparation, de coloration ou encore d'intégration.

Au sujet de la coloration, **on ne peut que recommander l'abandon de l'usage du rouge ponceau** (61,4% de résultats faussement négatifs quand le rouge ponceau a été utilisé, contre 29% pour le bleu acide et 22% pour l'amidoschwarz).

Enfin, il peut aussi s'agir d'une observation insuffisante des tracés après intégration. En effet, il est nécessaire de vérifier visuellement chaque gel et son tracé après intégration, de façon à ne pas "rater" une bande très fine d'où le rendu d'un résultat faussement négatif. A l'inverse, il ne faut pas conclure abusivement à la présence d'un pic lié à un artefact quelconque, et non vu comme tel par l'intégrateur. Les bonnes techniques doivent permettre d'observer des pics monoclonaux à partir de 200 à 300 mg/l d'immunoglobuline.

2 – Recherche d'immunoglobuline monoclonale

L'analyse des 1338 réponses obtenues concernant le typage de l'immunoglobuline monoclonale, a permis de soulever trois types de problèmes : problème de résultat faussement négatif, problème d'incohérence de résultats entre l'électrophorèse et l'immunofixation et enfin, problème de l'utilisation systématique des immunosérums anti-chaînes légères libres.

Problème de résultat faussement négatif : si 91% des laboratoires ont donné la bonne réponse, 27 sur 1338 (2%) ont néanmoins conclu à l'absence d'immunoglobuline monoclonale dans l'échantillon analysé. Les raisons invoquées, lorsque les biologistes avertis par courrier ont répondu, ont été une erreur de codage, une « mauvaise lecture » du gel, ou encore le rendu d'un résultat, bien que n'ayant pas effectué d'immunofixation, au vu de l'électrophorèse.

Problème d'incohérence de résultats entre l'électrophorèse et l'immunofixation : 135 laboratoires sur 1338 (10%) ont rendu un commentaire à l'électrophorèse sans aucun rapport avec la présence d'immunoglobuline monoclonale, bien que l'ayant mise en évidence en immunofixation.

L'électrophorèse est la première étape obligatoire du diagnostic biologique d'immunoglobuline monoclonale. Son caractère hautement informatif découle du fait que la présence d'immunoglobuline monoclonale donne lieu à un pic étroit à l'électrophorèse. Aussi doit-on veiller à signaler, sur un compte rendu d'électrophorèse, toute anomalie pouvant être en rapport avec la présence d'immunoglobuline monoclonale.

L'absence de pic étroit, voire l'absence de restriction d'hétérogénéité des immunoglobulines à l'électrophorèse, malgré la présence d'immunoglobuline monoclonale à l'immunofixation doit alerter le biologiste quant à la sensibilité de la technique électrophorétique qu'il utilise.

Problème de l'utilisation systématique des immunosérums anti-chaînes légères libres : 1217 laboratoires ont conclu à la présence d'une immunoglobuline monoclonale entière uniquement, alors que 89 laboratoires ont conclu à la présence de protéine de Bence Jones (chaînes légères libres monoclonales), associée à l'immunoglobuline monoclonale entière. Cette conclusion aurait été portée suite à la présence, en immunofixation, d'une bande étroite de précipitation obtenue avec un immunosérum anti-Lambda libre (dont l'usage n'est pas préconisé en première intention). L'hypothèse la plus vraisemblable est celle d'un « artéfact » en rapport avec une légère dénaturation du sérum, ayant peut-être entraîné la libération de chaînes Lambda à partir de l'immunoglobuline monoclonale entière. Bien qu'aucun argument scientifique ne puisse complètement exclure la présence de protéine de Bence Jones Lambda, les éléments cliniques de départ vont aussi dans le sens d'un artéfact technique. Lors du bilan initial effectué au moment de l'hospitalisation du patient, il n'existait pas de protéine de Bence Jones sérique ni urinaire.

La principale question que soulève réellement ce problème est de savoir pourquoi les biologistes utilisent systématiquement des immunosérums anti-chaînes légères libres lorsqu'il existe, à l'évidence, une immunoglobuline monoclonale entière sans fraction supplémentaire à étudier.

3 – Conclusion

Les enseignements à tirer de l'opération «Electrophorèse des protéines et/ou recherche d'Immunoglobuline monoclonale» du Contrôle National de Qualité réalisée en 2003 sont multiples. On retiendra deux messages principaux. Concernant l'électrophorèse, la sensibilité des techniques d'électrophorèse doit être évaluée par chaque biologiste au sein de son laboratoire. Concernant la recherche d'immunoglobuline monoclonale, le conseil principal serait de ne pas utiliser systématiquement les immunosérums anti-chaînes légères libres.

Article

Une analyse de cette opération est présentée dans les Annales de Biologie Clinique (ABC) : « Immunoglobuline monoclonale : Contrôle National de Qualité et démarche diagnostique ». Stéphanie Albarède, Jean-Marc Hattchouel, Anne Guyard, Alicia Nicolas, Elisabeth Burg, Alain Daunizeau, Bach Nga Pham. Ann Biol Clin, 2005, 63 : 107-112.