

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Anticorps anti-phospholipides :

- Tests de dépistage globaux
- Anticorps anti-cardiolipine
- Anticorps anti- β 2GPI

Stéphanie ALBAREDE et Anne GUYARD (Afssaps)
Bach-Nga PHAM (Hôpital Beaujon – Clichy)

Opération de contrôle : **00AT11 octobre 2000 (échantillons 00G5 et 00G6)**
02AT11 octobre 2002 (échantillon 02G5)

Paramètres contrôlés : **00G5 – Anticorps anti-phospholipides**
00G6 – Anticorps anti-phospholipides
02G5 – Anticorps anti-phospholipides

Résumé des opérations

Les anticorps anti-phospholipides sont des auto-anticorps dont la cible antigénique est constituée de phospholipides (anioniques ou neutres), le plus souvent associés à des protéines plasmatiques ou endothéliales (appelées cofacteurs). Ces anticorps représentent une famille hétérogène d'auto-anticorps de spécificités différentes.

Les opérations de contrôle de 2000 (00AT11) et 2002 (02AT11) portaient sur la recherche des anticorps de spécificité anti-cardiolipine et anti- β_2 GPI. Elles ont concerné quelque 120 laboratoires. L'analyse des résultats a mis en évidence plusieurs problèmes :

- Utilisation de tests de détection globale d'anticorps anti-phospholipides pour rechercher des spécificités précises
- Hétérogénéité des réactifs utilisés pour la détection des anticorps anti-cardiolipine
- Absence de standardisation du titrage des anticorps anti-cardiolipine
- Problème d'interprétation pour les sérums donnant un résultat proche du seuil de positivité de la technique.

L'analyse de ces problèmes a été fournie aux participants sous forme de courrier lors des opérations de contrôle en 2000 et 2002. Ces données présentant un intérêt général, il a paru opportun de rendre ces informations accessibles à l'ensemble des biologistes.

Introduction

Les anticorps anti-phospholipides sont des auto-anticorps dont la cible antigénique est constituée de phospholipides (anioniques ou neutres), le plus souvent associés à des protéines plasmatiques ou endothéliales (appelées cofacteurs). Ces anticorps représentent une famille hétérogène d'auto-anticorps de spécificités différentes. Les plus connus sont les anticorps anti-cardiolipine, les anticorps anti- β_2 glycoprotéine I (β_2 GPI) et les anticoagulants lupiques (désignés par le terme LA pour lupus anticoagulant). Les anticorps anti-cardiolipine et les anticorps anti- β_2 GPI sont détectés dans le sérum des patients par des tests immunologiques, tandis que les LA sont détectés dans le plasma par des tests de coagulation.

Les anticorps anti-phospholipides sont les marqueurs biologiques permettant de faire le diagnostic de syndrome des anti-phospholipides, dont la définition est : association de manifestations thrombotiques ou de fausses couches répétées avec présence d'anticorps anti-phospholipides (LA et/ou anticorps anti-cardiolipine), dont la présence est confirmée sur deux déterminations séparées d'au moins huit semaines.

Le test Cardiolipine-ELISA a été le premier test ELISA mis au point pour détecter les anticorps dirigés contre les phospholipides, et plus précisément les phospholipides anioniques (cas de la cardiolipine). Les anticorps anti-phospholipides détectés par ce test ont donc été appelés anticorps anti-cardiolipine. Cependant, il est rapidement apparu que la cible des anticorps anti-phospholipides était le plus souvent des protéines associées aux phospholipides, plutôt que des phospholipides seuls. Ces protéines, appelées cofacteurs protéiques, sont multiples. La β_2 GPI est le principal cofacteur protéique reconnu par les anticorps anti-phospholipides détectés par le test Cardiolipine-ELISA, à savoir les anticorps anti-cardiolipine. La liaison de la β_2 GPI avec les phospholipides anioniques se fait au niveau du domaine V de la glycoprotéine. La β_2 GPI est amenée par les tampons (saturation + dilution) des tests ELISA et/ou les échantillons de sérum à tester.

L'importance du rôle de cofacteur protéique joué par la β 2GPI dans la détection des anticorps anti-cardiolipine a été soulignée par la « classification » de ces anticorps en anticorps anti-cardiolipine β 2GPI-dépendants (anticorps reconnaissant la β 2GPI associée à la cardiolipine) ou anticorps anti-cardiolipine β 2GPI-indépendants (anticorps reconnaissant la cardiolipine seule). Les anticorps anti-cardiolipine β 2GPI-dépendants sont associés aux maladies auto-immunes. Les anticorps anti-cardiolipine β 2GPI-indépendants sont associés aux infections, bien qu'ils puissent parfois être détectés chez les patients atteints de maladies auto-immunes. L'ensemble de ces données explique qu'un autre test que le test Cardiolipine-ELISA ait été secondairement développé, à savoir le test β 2GPI-ELISA.

Ce test β 2GPI-ELISA permet de détecter directement les anticorps anti- β 2GPI. La fixation de β 2GPI purifiée sur des plaques de polystyrène irradiées (obtention de groupements carbonyles chargés négativement) mimerait la configuration des complexes β 2GPI-phospholipides susceptibles d'être reconnus par les auto-anticorps.

Définition des échantillons

Les échantillons 00G5 et 00G6 de l'opération 00AT11 et l'échantillon 02G5 de l'opération 02AT11 étaient des sérums humains sous forme liquide.

Les experts suivants : Dr N. Abuaf - Hôpital Rothschild - Paris ; Dr Josiane Arvieux - CHU - Brest ; Dr Liliane Intrator - Hôpital Henri Mondor - Créteil ; Dr Marielle San Marco - Hôpital de la Conception - Marseille ; Pr J.L. Preud'homme - Hôpital de la Milétrie – Poitiers ont analysé ces trois échantillons. Leurs résultats sont répertoriés dans les tableaux I, II et III.

tableau I –Echantillon 00G5 : résultats des experts

	Echantillon 00G5	
	anticorps anti-cardiolipine	anticorps anti- β 2GPI
IgG	Positif : 5 experts	Positif : 5 experts
IgM	Négatif : 3 experts Positif : 2 experts	Positif : 5 experts

tableau II –Echantillon 00G6 : résultats des experts

	Echantillon 00G6	
	anticorps anti-cardiolipine	anticorps anti- β 2GPI
IgG	Négatif : 5 experts	Négatif : 5 experts
IgM	Négatif : 4 experts Douteux : 1 expert	Négatif : 4 experts Positif : 1 expert

tableau III –Echantillon 02G5 : résultats des experts

	Echantillon 02G5	
	anticorps anti-cardiolipine	anticorps anti- β 2GPI
IgG	Positif : 5 experts*	Positif : 3 experts** Négatif : 2 experts
IgM	Négatif : 5 experts	Négatif : 5 experts

* titres = 77 UGPL – 79 UGPL – 38 UGPL – 59 U – DO 0,260/0,150

** titres = 19,5U et 10U – 10U – DO 0,371/0,100

Méthode statistique et expression des résultats

La méthode statistique qui suit a été appliquée pour l'analyse des titres en anticorps anti-cardiolipine (IgG). Les paramètres statistiques : effectif, moyenne et coefficient de variation sont calculés à partir des données fournies par les laboratoires puis sont recalculés après une troncature à 3 écart-types. Dans le tableau de résultats figurent, pour les groupes supérieurs à 8 participants, les effectifs non tronqués (n), la moyenne tronquée (mTr) et le coefficient de variation tronqué (CVTr) calculé par la formule $[100 \times \text{écart-type tronqué} / \text{mTr}]$. Pour les groupes où n est inférieur à 8, seuls les effectifs non tronqués sont indiqués. La technique maison regroupant des procédés divers ne donne pas lieu à des calculs statistiques malgré un effectif de 9. Etant donné la dispersion des résultats inter-réactifs, la moyenne générale (c'est-à-dire tous réactifs confondus) et le coefficient de variation correspondant n'ont pas été calculés.

Présentation des opérations

L'Afssaps a réalisé pour la première fois en 2000, avec le concours de Bioforma, une opération de Contrôle portant sur les anticorps anti-phospholipides. Cette opération portait sur la recherche d'anticorps anti-cardiolipine et d'anticorps anti- β 2GPI. Pour simplifier la mise en place de cette première opération, seule une réponse qualitative (résultat positif ou négatif) avait été demandée aux participants. Ces derniers pouvaient différencier les isotypes IgG et IgM pour les deux spécificités. Etant donné que certains tests présents sur le marché étaient des tests globaux (tests ne permettant pas de différencier la spécificité des anticorps anti-phospholipides présents), le bordereau réponse contenait une zone distincte de saisie des résultats pour ces réactifs. En 2002, les laboratoires devaient réaliser, en plus de la recherche, un titrage des différents isotypes pour chaque spécificité (figure 1).

Le nombre de participants est passé de 116 à 126 en deux ans.

Figure 1 – Bordereau réponse de l'opération 02AT11

RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-PHOSPHOLIPIDES sur le sérum 02G5																	
▣ Détection globale :																	
		Réactif*				Résultat* 02G5				Seuil de positivité GPL ou MPL / ml				Titre 02G5 GPL ou MPL / ml			
Sans distinction d'isotype		Q	P			Q							,				,
IgG		Q	P			Q							,				,
IgM		Q	P			Q							,				,
▣ Recherche des anticorps anticardiolipine :																	
		Réactif*				Résultat* 02G5				Seuil de positivité GPL ou MPL / ml				Titre 02G5 GPL ou MPL / ml			
Sans distinction d'isotype		Q	P			Q							,				,
IgG		Q	P			Q							,				,
IgM		Q	P			Q							,				,
▣ Recherche des anticorps anti-beta2GP1 :																	
		Réactif*				Résultat* 02G5				Seuil de positivité U / ml				Titre 02G5 U / ml			
Sans distinction d'isotype		Q	P			Q							,				,
IgG		Q	P			Q							,				,
IgM		Q	P			Q							,				,

Tests de détection globale des anticorps anti-phospholipides

Echantillons 00G5, 00G6 et 02G5

D'après les résultats obtenus par les experts en tests spécifiques des anticorps anti-cardiolipine et anti- β 2GPI, les résultats attendus étaient positifs pour l'échantillon 00G5 et pour les tests globaux sans distinction d'isotype ou spécifiques de l'isotype IgG pour l'échantillon 02G5. Pour les autres résultats, les tests globaux n'étant pas utilisés par les experts, il n'y a pas de réponses attendues étant donné que ces réactifs permettent de détecter des spécificités autres que anti-cardiolipine et anti- β 2GPI (exemple : anti-phosphatidyl-éthanolamine)

Résultats des participants

Peu de laboratoires ont utilisé des réactifs à base de mélange de phospholipides, ne permettant pas d'identifier un type précis d'anticorps anti-phospholipides : 24 laboratoires en 2000 et 22 laboratoires en 2002. Trois types de réactifs ont été employés : réactifs ne faisant pas de distinction d'isotypes, réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgG et réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgM.

Concernant l'échantillon 02G5, il y a unanimité des réponses que le réactif fasse la distinction des isotypes ou non (tableau IV). Par contre, pour les échantillons 00G5 et 00G6, cette unanimité ne se retrouve qu'avec les réactifs sans distinction d'isotypes et les réactifs mettant en évidence des IgG. Les réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgM ont rendu des résultats très hétérogènes dans des proportions négatif/positif de 30/60.

tableau IV – Tests de détection globale : résultats des participants

Résultats	00G5			00G6			02G5		
	positif	négatif	douteux	positif	négatif	douteux	positif	négatif	douteux
SI*	3			2		1	4		
IgG	22				22			18	
IgM	14	5	1	13	6	1			14

*SI = sans distinction d'isotypes

Commentaires

Les tests de détection globale permettent, comme leur nom l'indique, de rechercher globalement des anticorps anti-phospholipides. Seules deux réactifs ont été utilisés. Le mélange antigénique à la base de du réactif Asserachrom APA de la société Stago est composé de cardiolipine, d'acide phosphatidique et de phosphatidylsérine. Celui du réactif Phospholisa de la société Biomedical Diagnostic est composé de cardiolipine, de phosphatidylsérine, de phosphatidylinositol et de phosphatidyléthanolamine. Ainsi, si l'intérêt de ces réactifs est de pouvoir théoriquement détecter la présence d'anticorps anti-phospholipides de plusieurs spécificités différentes, elles ont, par contre, l'inconvénient de ne pas pouvoir correctement étiqueter un type précis d'anticorps anti-phospholipides. Or, le critère biologique utilisé pour la définition du syndrome des anti-phospholipides est l'existence d'anticorps anti-cardiolipine. Par ailleurs, la signification clinique des autres anticorps, en dehors peut-être des anticorps anti-phosphatidyl-éthanolamine, reste à démontrer. Aussi l'utilisation de tests de détection globale doit-elle être réfléchi, d'autant que leur sensibilité peut être inférieure à celle des réactifs visant la détection d'anticorps d'une spécificité donnée. On constate par exemple que pour l'échantillon 02G5 nous avons 100% de réponses négatives pour l'isotype IgG alors que les 5 experts ont rendu un résultat positif en IgG anti-cardiolipine.

Anticorps anti-cardiolipine

Echantillons 00G5, 00G6 et 02G5

Les échantillons 00G5 et 02G5 ont été trouvés positifs et l'échantillon 00G6 négatif en IgG anti-cardiolipine par les 5 experts. Concernant l'échantillon 02G5, il y a également unanimité des experts pour l'isotype IgM : résultat négatif. En revanche, il n'y pas de réponse consensuelle pour les deux autres échantillons.

1. Résultats qualitatifs

Résultats des participants

Les réponses pour les anticorps anti-cardiolipine d'isotype IgG sont dans l'ensemble homogènes et correspondent aux réponses des experts qui ont été unanimes, c'est-à-dire résultat positif pour les échantillons 00G5 et 02G5 et résultat négatif pour l'échantillon 00G6 (tableau V).

Concernant l'isotype IgM, les résultats montrent 89% de réponses négatives pour l'échantillon 02G5 et correspondent au résultat unanime des experts (résultat négatif). Pour les échantillons 00G5 et 00G6, on retrouve la même dispersion de résultats (absence de consensus) que celle observée chez les experts. Cette dispersion n'est pas liée au réactif utilisé.

tableau V – Anticorps anti-cardiolipine : résultats des participants

Résultats	00G5		00G6		02G5	
	positif	négatif	positif	négatif	positif	négatif
SI*	4			4	4	
IgG	93	1	7	87	105	4
IgM	36	20	29	26	7	57

*SI = sans distinction d'isotypes

Commentaires

L'échantillon 00G5 contenait des IgG anti-cardiolipine, des IgG anti- β_2 GPI et des IgM anti- β_2 GPI. La particularité de ce sérum résidait dans la spécificité d'espèce des IgM anti- β_2 GPI c'est-à-dire des IgM reconnaissant la β_2 GPI humaine et non la β_2 GPI bovine. La β_2 GPI a un rôle important, en tant que cofacteur protéique lié à la cardiolipine, dans la détection des anticorps anti-cardiolipine. Les anticorps anti-cardiolipine reconnaissant la β_2 GPI associée à la cardiolipine sont dits anticorps anti-cardiolipine β_2 GPI-dépendants. Ils sont plutôt associés aux maladies auto-immunes. Les anticorps anti-cardiolipine reconnaissant la cardiolipine seule sont dits anticorps anti-cardiolipine β_2 GPI-indépendants ou anticorps anti-cardiolipine vrais. Ils sont plutôt associés aux infections, bien qu'ils puissent parfois être détectés chez les patients atteints de maladies auto-immunes.

Les anticorps anti-cardiolipine sont détectés à partir de tests immunologiques de type ELISA, utilisant de la cardiolipine bovine, immobilisée sur plaque irradiée. De la β_2 GPI d'origine animale est généralement, mais non obligatoirement, ajoutée dans un deuxième temps, lors de la saturation des sites libres de la plaque sensibilisée et/ou dans le tampon de dilution du sérum à tester. Outre la β_2 GPI d'origine animale présente ou non dans le test ELISA, il y a obligatoirement apport de β_2 GPI humaine, présente dans le sérum à tester. Ainsi, lorsque la β_2 GPI d'origine animale est présente dans le test ELISA, il y a compétition entre la β_2 GPI d'origine animale et la β_2 GPI humaine, pour interagir avec la cardiolipine, au détriment de la β_2 GPI humaine qui est en quantité nettement moindre que la β_2 GPI d'origine animale. Lorsque le test ELISA est dépourvu de β_2 GPI d'origine animale, la β_2 GPI humaine peut alors pleinement interagir avec la cardiolipine. Ces données expliquent qu'un sérum contenant des anticorps ne reconnaissant que la β_2 GPI humaine, associée à la cardiolipine, puisse donner des résultats différents en fonction des tests ELISA-aCL (tests anticorps anti-cardiolipine en technique ELISA). En effet, ces anticorps sont mis en évidence en cas d'utilisation d'un test ELISA sans ajout de β_2 GPI d'origine animale, la β_2 GPI humaine apportée par le sérum pouvant alors pleinement interagir avec la cardiolipine immobilisée. Au contraire, les anticorps spécifiques de la β_2 GPI humaine ne peuvent pas être mis en évidence (ou très peu) dans les tests ELISA-aCL avec ajout de β_2 GPI d'origine animale, par manque de liaison de la β_2 GPI humaine apportée par le sérum avec la cardiolipine immobilisée. C'est pourquoi, trois experts utilisant des tests ELISA-aCL avec ajout de β_2 GPI d'origine animale

ont rendu un résultat négatif quant à la recherche d'IgM anti-cardiolipine dans l'échantillon 00G5 et un expert, un résultat faiblement positif. A l'inverse, un expert utilisant un test ELISA-aCL sans ajout de β_2 GPI d'origine animale a rendu un résultat très positif en IgM anti-cardiolipine.

L'hétérogénéité des résultats de l'ensemble des participants concernant la recherche d'IgM anti-cardiolipine dans l'échantillon 00G5 est vraisemblablement liée à l'hétérogénéité des réactifs (différentes conditions de saturation des plaques ELISA et différents réactifs composants du tampon de dilution des sérums)(tableau VI). L'ensemble de ces données souligne à quel point il est important de connaître les différents composants à la base d'un réactif commercial, afin d'interpréter correctement les résultats.

Tableau VI : Réactifs utilisés par les participants et les experts au Contrôle National de Qualité en 2000 pour la détection d'anticorps anti-cardiolipine

Technique	Saturation	Tampon de dilution
Technique maison - Expert 1	SVF*	SVF
Technique maison - Expert 2	SVF	SVF
Technique maison - Expert 3	SVF	SVF
Technique maison - Expert 4	BSA**	Tween 0,05 %
BMD - Expert 5	SVF	SVF
BMD	SVF	SVF
Bioadvance	NR***	NR***
Biogenic	BSA	SVF
Bio-rad Kallestad	β_2 GPI humaine	BSA
Menarini	β_2 GPI	β_2 GPI
Pharmacia	SVF	BSA
Diagast		PBS

* SVF : Sérum de veau foetal

** BSA : Sérum albumine bovine

*** NR : Non renseigné

L'échantillon 00G6 était négatif pour la recherche d'IgM anti-cardiolipine (résultat douteux pour un expert). Il s'avère que 52 % des laboratoires l'ont trouvé positif. Une des explications pourrait être l'absence de puits dépourvu d'antigène, encore appelé « blanc sérum ». Par exemple, les résultats fournis par un de nos experts, utilisant un réactif commercial pour la recherche d'IgM anti-cardiolipine, étaient les suivants :

Δ DO (différence de densité optique) : DO sérum - DO « blanc réactif » = 0,463

soit un résultat positif à 21 unités.

Or, pour tout résultat positif, devrait être effectué un blanc sérum sur une barrette dépourvue d'antigène. Pour ce sérum, la DO blanc sérum était de : 0,288.

D'où Δ DO totale = 0,463-0,288 = 0,175, correspondant à un *résultat négatif*.

Ces données, soulignent bien l'importance du blanc sérum lorsque des tests ELISA sont utilisés pour la recherche d'anticorps anti-phospholipides, et de façon générale pour tous les tests ELISA.

2. Résultats quantitatifs

Résultats des participants

Les résultats quantitatifs n'ont été recueillis que pour l'opération 02AT11 (échantillon 02G5).

2.1 Dosage des anticorps anti-cardiolipine d'isotype IgG

Les moyennes des titres obtenus avec les différents réactifs varient du simple au triple avec une dispersion intra-technique non négligeable (tableau VII).

Les seuils indiqués par les participants sont variables selon le réactif utilisé car les seuils indiqués dans les notices sont spécifiques à chaque réactif : 11, 12, 15, 18 ou 23 GPL/ml. De plus, pour un même réactif, outre le seuil préconisé dans la notice, on relève plusieurs autres niveaux de seuil selon les laboratoires.

tableau VII – titre des anticorps anti-cardiolipine d'isotype IgG (GPL/ml) – échantillon 02G5

Réactif / Isotype IgG	n	mTr (GPL/ml)	CVTr (%)
Bioadvance ELISA Cardiolipide IgG (R58882)	9	30,44	38,7
BMD Cardiolisa IgG (H42621)	47	78,15	23,4
Sigma D. anticardiolipine IgG (T79562)	2		
Biogenic Coaliza anticardiolipine (R57062)	4		
Menarini Quantalite anticardiolipides IgG (HRP) (R54252)	10	43,97	17,9
Pharmacia Varelisa cardiolipin antibodies IgG (S72392)	11	41,07	21,7
Bio-rad Kallestad anticardiolipin microplate EIA (R48032)	2		
Bio-rad Microplate autoimmune anticardiolipin IgG/IgM (V97422)	14	28,07	34,2
The Binding Site Bindazyme/dosage des IgG (T75542)	1		
Technique "maison"	9		
<i>Total</i>	<i>109</i>		

2.2 Dosage des anticorps anti-cardiolipine d'isotype IgM

Les sept résultats positifs correspondent à des titres, pour la plupart, peu élevés mais supérieurs aux seuils précisés par les laboratoires et la notice. Ces résultats ne sont pas liés à un réactif donné.

Les seuils indiqués par les participants varient selon le réactif utilisé et se situent entre 6 et 15 MPL/ml d'après les notices. De même que pour les anticorps anti-cardiolipine IgG, plusieurs seuils ont été rendus pour un même réactif.

Commentaires

Les anticorps anti-cardiolipine doivent être titrés car il existe une forte corrélation entre la concentration élevée d'IgG anti-cardiolipine et le risque de survenue d'un syndrome des anti-phospholipides. En théorie, ce dosage bénéficie d'un standard international produit aux Etats-Unis, appelé « standard Harris », dont les valeurs sont exprimées en unités GPL pour l'isotype G et MPL pour l'isotype M. En pratique, il n'existe aucune standardisation réelle puisque plusieurs lots différents de « standards Harris » ont été produits, sans vraie concordance d'un lot à l'autre. Il est donc important de ne pas se laisser abuser par les termes « unités GPL ou MPL » et cela, même pour une même réactif commercial. Ce problème est parfaitement illustré par les résultats de ces opérations du Contrôle National de Qualité où on note une grande variabilité du titre d'IgG anti-cardiolipine rendu par les participants : moyennes des titres allant de 28,07 GPL/ml à 78,15 GPL/ml lorsqu'on compare les réactifs entre eux, avec des coefficients de variation allant de 17,93% à 38,66%. Des travaux tentant de proposer une véritable standardisation du dosage des anticorps anti-cardiolipine sur le plan européen sont en cours.

Anticorps anti- β 2GPI

Echantillons 00G5, 00G6 et 02G5

Les experts ont répondu unanimement sur l'échantillon 00G5 : présence d'IgM et d'IgG anti- β 2GPI. Ils sont également unanimes sur l'absence d'IgG anti- β 2GPI dans l'échantillon 00G6 et d'IgM dans l'échantillon 02G5. Il n'y a pas de consensus sur les IgM anti- β 2GPI dans l'échantillon 00G6 (4 négatifs pour 1 positif) et sur les IgG anti- β 2GPI dans l'échantillon 00G5 (2 négatifs pour 3 positifs).

1. Résultats qualitatifs

Résultats des participants

Trois types de réactifs ont été employés par les participants pour la recherche d'anticorps anti- β 2GPI : réactifs sans distinction d'isotypes, réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgG et réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgM.

Concernant les réactifs ne faisant pas de distinction d'isotypes, il y a une quasi unanimité des réponses : l'échantillon 00G5 a été trouvé positif, les échantillons 00G6 et 02G5 négatifs (tableau VIII).

Concernant les réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgG, les réponses pour les échantillons de l'opération 00ATI1 sont dans l'ensemble homogènes et correspondent aux réponses des experts qui ont été unanimes (00G5 résultat positif, 00G6 résultat négatif). Pour l'échantillon 02G5, 82% des résultats des participants sont négatifs (3 résultats positifs et deux résultats négatifs pour les experts).

Concernant les réactifs mettant en évidence la présence d'anticorps de type IgM, la majorité des réponses pour les échantillons 00G5 et 02G6 sont en accord avec les résultats des experts, avec respectivement 93,3% de réponses positives et 97,2% de réponses négatives. Pour l'échantillon 00G6, il y a 22 réponses négatives et 9 réponses positives. Un seul expert sur cinq a trouvé l'échantillon positif.

tableau VIII – Anticorps anti- β 2GPI : résultats des participants

Résultats	00G5		00G6		02G5	
	positif	négatif	positif	négatif	positif	négatif
SI*	5			5	1	7
IgG	45	4	2	42	11	52
IgM	30	2	9	22	1	36

*SI = sans distinction d'isotypes

2. Résultats qualitatifs (échantillon 02G5)

Résultats des participants

Les résultats quantitatifs n'ont été recueillis que pour l'opération 02ATI1

Concernant les anticorps anti- β 2GPI de type IgG, la majorité des résultats ont été rendus négatifs et ceci sans ambiguïté puisque la moyenne des titres des résultats négatifs est de 5,6 GPL/l pour des seuils à 10, 15 et 20. Les 11 résultats positifs ont tous des titres supérieurs au seuil indiqué mais très proches du seuil pour 5 d'entre eux.

Concernant les anticorps anti- β 2GPI de type IgM, tous les résultats sauf un sont négatifs avec des titres inférieurs aux seuils. Le résultat positif présente un titre à 10 MPL/l égal au seuil, les seuils étant situés entre 10 et 30.

3. Commentaires

Echantillon 00G6 : L'interprétation d'un sérum donnant un résultat autour du seuil de positivité de la technique pose toujours problème. Parmi les participants, force est de constater l'hétérogénéité des résultats en fonction des réactifs utilisés, mais aussi pour un même réactif. Une explication possible de l'hétérogénéité des résultats de la recherche d'IgM anti- β 2GPI dans l'échantillon 00G6 est la valeur du seuil au-delà duquel un résultat est rendu positif. En effet, il est important de rappeler les fluctuations de la valeur seuil, d'un réactif à un autre (1). Cela pourrait, en partie, expliquer pourquoi un même sérum peut donner un résultat négatif avec certains réactifs, positif avec d'autres.

Echantillon 02G5 : La détection directe des anticorps anti- β 2GPI requiert des tests ayant un compromis sensibilité/spécificité acceptable, vu l'existence du test Cardiolipine-ELISA qui détecte aussi les anticorps anti- β 2GPI (test indirect ayant une bonne sensibilité pour ces auto-anticorps). La sensibilité et la spécificité d'un test dépendent en fait de la valeur seuil, valeur au-delà de laquelle un résultat est considéré comme positif. Or, la valeur seuil du test β 2GPI-ELISA diffère selon le réactif utilisé, que le réactif soit un réactif « maison » ou un réactif commercialisé. Ce problème de valeur seuil explique certainement, en grande partie, les résultats discordants de l'opération 02AT11 du Contrôle National de Qualité concernant la détection des IgG anti- β 2GPI. En effet, pour l'échantillon 02G5, 52 laboratoires sur 63 (82,5 %) ont rendu un résultat négatif (dont trois laboratoires avec une technique maison), alors que 11 laboratoires sur 63 ont rendu un résultat positif, avec des titres proches du seuil pour certains. Ces réponses positives ont été obtenues avec des techniques « maison » dans 6 cas, deux réactifs commerciaux dans 4 cas et un réactif non identifié dans 1 cas. Il semble donc que les techniques « maison » aient une meilleure sensibilité que les réactifs commerciaux pour la détection des IgG anti- β 2GPI. Le choix par les laboratoires, élaborant leur propre technique, d'une valeur seuil plus basse que celle retenue par les fabricants est l'explication la plus plausible. Il est, en effet, pertinent pour un laboratoire hospitalier spécialisé d'opter pour un test β 2GPI-ELISA sensible, compte tenu du biais de recrutement de maladies auto-immunes de certains centres. A l'inverse, il est licite que les fabricants de réactifs aient opté pour un test β 2GPI-ELISA moins sensible mais plus spécifique pour répondre à une demande générale. Les deux attitudes ont leurs avantages et leurs inconvénients. Cependant, il serait peut-être souhaitable que chaque laboratoire recalcule sa valeur seuil en fonction de son recrutement propre, pour répondre au mieux à ces exigences de sensibilité/spécificité.

Conclusion

Les données de la première opération du Contrôle National de Qualité sur les anticorps anti-phospholipides en 2000 n'ont fait que souligner les problèmes de standardisation concernant les techniques ELISA pour rechercher ces auto-anticorps. Les résultats de 2002 ont confirmé cette absence de standardisation avec la mise en évidence d'une grande hétérogénéité de résultats quantitatifs. Il faut souligner que les résultats des experts n'étaient pas entièrement concordants, contrairement aux contrôles de qualité portant sur les anticorps anti-nucléaires pour lesquels les résultats des experts ont été unanimes lors des nombreuses opérations de contrôle effectuées entre 1999 et 2005.

Les recommandations internationales de groupes de travail sur le sujet (International Society on Thrombosis and Haemostasis) semblent ne pas avoir suffi à résoudre le problème d'hétérogénéité des réactifs utilisés. L'ensemble de ces données confirme l'importance de toujours interpréter les résultats d'anticorps anti-phospholipides dans un bilan d'auto-immunité global (Lupus anticoagulant, anticorps anti-nucléaires...) et dans un contexte clinique donné.

Bibliographie

1- Arvieux J., Sanmarco M. Cahier de Formation biologie médicale : Syndrome des anti-phospholipides. Paris : Bioforma ; 2001 ; 22 : 53-72.