

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Electrophorèse des protéines
Recherche d'immunoglobuline monoclonale
Dosage des Immunoglobulines G, A et M

Stéphanie ALBAREDE, Anne GUYARD et Jean-Marc HATTCHOUEL (Afssaps)
Alain DAUNIZEAU (Lens)
Jacques DE GRAEVE (Toulouse)
Bach-Nga PHAM (Clichy)

Expédition : 7 avril 2004

Clôture : 3 mai 2004

Edition des compte-rendus individuels : 6 août 2004

Paramètres contrôlés : **04G9 – Dosage des protéines totales et de l'albumine**

Electrophorèse des protéines

Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Dosage des IgG, IgA, IgM

Quantification de l'immunoglobuline monoclonale

Nombre de laboratoires concernés* : 2898

Nombre de laboratoires participants** : 2776

* 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 04AT11 a concerné les laboratoires qui ont déclaré pratiquer l'électrophorèse des protéines et/ou la recherche d'immunoglobuline monoclonale et/ou le dosage des immunoglobulines (G, A et M). Ce contrôle a évolué depuis 2001 de façon à proposer un bilan de patient complet pour être au plus proche de la routine de laboratoire. En effet, le bordereau réponse permettait de rendre les résultats des analyses suivantes :

- Dosage des protéines totales et de l'albumine,
- Electrophorèse des protéines avec résultats quantitatifs et commentaires qualitatifs,
- Dosage des immunoglobulines (G, A et M)
- Recherche et caractérisation d'immunoglobuline monoclonale
- Quantification de l'immunoglobuline monoclonale

L'échantillon 04G9 contenait une immunoglobuline monoclonale IgM Lambda (5g/l), mise en évidence par l'existence 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 avec coloration au noir amide est le plus fréquemment employé (73% des laboratoires). Les résultats montrent une diminution des utilisateurs du rouge Ponceau, colorant qui en 2003 s'était avéré moins sensible pour la détection d'une immunoglobuline monoclonale en faible concentration (voir annales 03AT11). Concernant la recherche et l'identification d'une immunoglobuline monoclonale, l'immunofixation est utilisée par 96 % des laboratoires. Par rapport à 2003, on observe une meilleure cohérence entre les conclusions rendues à l'électrophorèse et celles obtenues pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale.

Echantillon 04G9

Electrophorèse des protéines et recherche d'immunoglobuline monoclonale

Définition de l'échantillon

L'échantillon 04G9 était un sérum liquide d'origine humaine qui contenait une immunoglobuline monoclonale, mise en évidence par l'existence d'un pic étroit dans la zone des gamma-globulines à l'électrophorèse des protéines sériques. L'immunoglobuline monoclonale était de type IgM Lambda, à une concentration d'environ 5 g/l (mesure densitométrique).

Les réponses des experts figurent aux paragraphes 1 et 2 ci-dessous.

Dr J. BIENVENU (C.H. Lyon sud - Lyon), Dr A. CHEVAILLIER (CHU - Angers), Dr J. DE GRAEVE (C.H.U Ranguel - Toulouse), Dr A. DAUNIZEAU (C.H. Dr Schaffner - Lens), Dr JM GOMBERT (Hôpital de la Milétrie - Poitier), Dr L. INTRATOR (Hôpital Henri Mondor - Créteil), Dr B.N. PHAM (Hôpital Beaujon - Clichy).

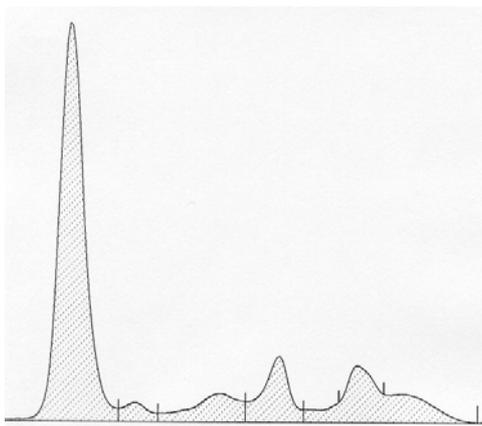
1 – Electrophorèse des protéines

Commentaires unanimes:

« Pic étroit dans la zone des gamma-globulines »

« Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale »

figure 1 - tracé électrophorétique obtenu avec l'échantillon 04G9
support : gel d'agarose, colorant : amidoschwarz (noir amide)



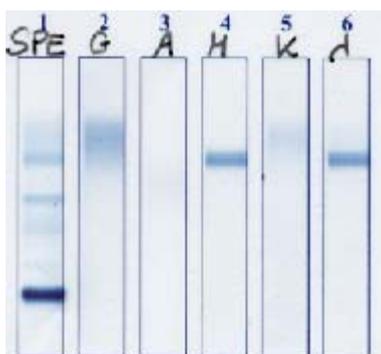
FRACTION	%
ALBUMINE	63.1
ALPHA 1	2.5-
ALPHA 2	7.2
BETA	9.2
GAMMA	17.9

2 – Recherche et quantification de l'immunoglobuline monoclonale

Résultats unanimes :

- Présence d'une immunoglobuline monoclonale de type IgM lambda
- Quantification de l'immunoglobuline monoclonale : environ 5g/l.

figure 2 - immunofixation obtenue avec l'échantillon 04G9



Méthode statistique et expression des résultats

Pour les résultats quantitatifs (protéines totales, albumine, fractions protéiques en %, IgG, IgA, IgM, quantification de l'immunoglobuline monoclonale), 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 (m), 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 (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 ($N \geq 15$).
- Pour apprécier 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 (*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*).

Tableau I - pourcentages d'acceptabilité

Analyses	Pourcentages d'acceptabilité
Dosage des protéines	
Protéines totales (g/l)	± 9%
Albumine (g/l)	± 12%
Protéinogramme (fractions en %)	
Albumine	± 12%
α1-globulines	± 30%
α2-globulines	± 20%
β-globulines	± 20%
γ-globulines	± 20%
Dosage des immunoglobulines	
IgG	± 20%
IgA	± 20%
IgM	(*)

(*) Notion de "limite acceptable" non valable pour le dosage des IgM, vu la présence d'une immunoglobuline monoclonale de type IgM dans l'échantillon testé.

Résultats des participants

1 – Dosage des protéines

1 - 1 Protéines totales

2557 réponses ont été enregistrées (tableau II). La moyenne générale s'établit à 54,99 g/l, assortie d'un CV à 3,3%.

Tableau II : dosage des protéines totales – Sérum 04G9

Protéines totales (g/l) sérum 04G9					
Réactifs	N	m	s	CV (%)	Médiane
Ensemble des résultats	2557	54,99	1,795	3,3	55,00
Abbott, Alcyon	17	54,83	1,590	2,9	55,50
ABX Pentra Total Protein CP	40	54,40	2,747	5,0	54,00
Bayer, Advia	25	54,94	1,465	2,7	55,00
Bayer, Express	21	55,73	3,316	6,0	56,00
Beckman Coulter, Synchron	166	54,16	1,107	2,0	54,00
Bio Direct, Protéines totales	20	55,62	2,130	3,8	56,00
Biocode-Hycel, Protéines totales	58	54,22	2,743	5,1	54,70
Biolabo, Protéines totales	15	57,25	3,090	5,4	59,00
bioMérieux, Protéines-Ki	389	55,29	2,708	4,9	55,00
Biotech (LabBo), Protéines totales	15	54,31	2,874	5,3	55,00
Dade Behring, Dimension	219	55,31	1,294	2,3	55,10
Diasys, Protéines totales FS	23	55,07	2,158	3,9	55,00
J2L-Elitech, Protéines totales	33	55,44	2,791	5,0	55,90
Konelab, Protéines totales	188	53,82	1,472	2,7	54,00
Olympus, Protéines totales	112	54,91	1,142	2,1	55,00
Ortho-CD, Vitros	346	55,65	1,658	3,0	56,00
Randox, Protéines totales	28	55,23	1,947	3,5	55,00
Réfractométrie	71	59,23	1,918	3,2	60,00
Roche, Cobas Integra	245	54,69	1,131	2,1	54,70
Roche, Hitachi/Modular	359	55,18	1,136	2,1	55,00

1 - 2 Albumine

2165 réponses enregistrées (tableau III), dont 101 (4,7%) ne correspondent pas à un dosage mais à une mesure par densitométrie (ex : Sebia).

Tableau III : Dosage de l'albumine – Sérum 04G9

Albumine (g/l) sérum 04G9					
Réactifs	N	m	s	CV (%)	Médiane
Ensemble des résultats	2165	32,71	1,977	6,0	32,60
ABX, Albumine (VBC)	20	33,85	2,886	8,5	34,30
Beckman Coulter, Array/Immage (néphélémétrie)	106	30,94	1,197	3,9	30,90
Beckman Coulter, Synchron	73	30,63	0,891	2,9	31,00
Bio Direct, Albumine BCG	19	35,22	2,620	7,4	36,00
Biocode-Hycel, Albumine	40	35,34	1,781	5,0	35,45
bioMérieux, Albumine-Kit	198	35,32	2,153	6,1	35,50
Dade Behring, app. BN (néphélémétrie)	105	32,12	1,171	3,6	32,00
Dade Behring, Dimension	110	31,80	0,833	2,6	32,00
Dade Behring, Turbiquant (Turbitimer)	148	33,91	2,260	6,7	33,95
Dako, Albumine automates (turbidimétrie)	42	33,79	1,784	5,3	33,95
Diasys, Albumine FS	21	34,02	1,444	4,2	34,00
J2L-Elitech, Albumine BCG	26	35,53	2,033	5,7	35,55
Konelab, Albumine (turbidimétrie)	101	32,53	1,838	5,7	32,40
Konelab, Albumine BCG	20	32,81	1,031	3,1	33,00
Konelab, Albumine BCP	24	33,18	1,217	3,7	33,00
Olympus, Albumine	60	31,93	1,168	3,7	32,00
Ortho-CD, Vitros	199	32,16	1,355	4,2	32,00
Roche, Cobas Integra, VBC (colorimétrie)	45	32,96	1,051	3,2	33,00
Roche, Cobas Integra, turbidimétrie	167	32,76	1,137	3,5	32,50
Roche, Hitachi/Modular, VBC (colorimétrie)	115	32,07	0,971	3,0	32,00
Roche, Hitachi/modular, turbidimétrie	137	30,58	1,500	4,9	30,50
Sebia, Hydragel (HR) Protein(e) Hydrasys	47	35,00	2,112	6,0	35,25
Sebia, Hydragel Protein(e) K20 (amido black)	35	34,61	1,778	5,1	34,70

1 - 3 Analyse des résultats

Concernant les protéines totales, les résultats sont bons dans l'ensemble mais appellent cependant un commentaire. On observe une moyenne de 60,0 g/l avec les techniques par réfractométrie, pour une moyenne générale de 55,0 g/l, soit un biais (écart à la valeur cible) de + 9%. Le risque pour ces laboratoires de fournir des résultats inacceptables est évident. Ces techniques doivent être abandonnées.

Concernant le dosage de l'albumine, les résultats sont globalement satisfaisants.

2 – Electrophorèse des protéines

Le nombre de laboratoires ayant répondu pour cette analyse est de 2191 (2294 en 2003).

2- 1 - Méthodes et réactifs

Le support le plus utilisé est le gel d'agarose : 84,7% d'utilisateurs (81,2% en 2003). L'acétate de cellulose n'attire plus que 9,8% d'utilisateurs (15,4% en 2003). L'électrophorèse capillaire poursuit sa progression : 101 laboratoires sont équipés, soit 4,6% (ils étaient 54 en 2003 soit 2,3%) (tableau IV).

En ce qui concerne le choix du colorant, le noir amide (Amidoschwarz) sur gel d'agarose est le plus souvent utilisé : 1598 laboratoires ont fait ce choix, soit 73,0%. Avec ce type de support, 243 laboratoires (11,1%) utilisent le bleu acide et 13 (0,6%) le rouge ponceau. Avec l'acétate de cellulose, seul le rouge ponceau est utilisé (9,8%).

Tableau IV – Electrophorèse des protéines (%) – Sérum 04G9 – Principes et réactifs utilisés

Principes - Réactifs	Nombre d'utilisateurs	%
Support Acetate de cellulose - rouge ponceau	214	9,8
- HELENA Titan III Protéines	137	
- SEBIA Sebiagel	41	
- BIOMIDI Midifilm & Midiplaque Protéines	32	
- SEBIA EPU Protéines	1	
Support Agarose - amidoschwarz (noir amide)	1599	73,0
- BECKMAN COULTER Paragon SPE	13	
- HELENA Titan Gel Protéines (HR)	89	
- SEBIA Hydragel Protein(e) K20 (amidoschwarz)	511	
- HELENA REP (amido black)	8	
- HELENA REP β 1- β 2 (amido black)	8	
- BIOMIDI Protéines	15	
- SEBIA Hydragel β 1- β 2 HYDRASYS	82	
- SEBIA Hydragel (Hydratest) (HR) Protein(e) HYDRASYS	869	
- BIOCADE Biocagel Protéines	3	
Support Agarose - bleu acide	243	11,1
- HELENA Titan Gel SPE-IFE (bleu acide)	126	
- HELENA SAS-MX SP-10 (bleu acide)	85	
- HELENA SAS-MX SP-10 β 1- β 2 (bleu acide)	20	
- HELENA SAS-1 (bleu acide)	7	
Support Agarose - rouge ponceau	13	0,6
- HELENA REP (rouge ponceau)	12	
- HELENA REP β 1- β 2 (rouge ponceau)	1	
Electrophorèse capillaire	101	4,6
- BECKMAN COULTER Paragon CZE 2000 (SPE kit)	25	
- SEBIA Capillarys β 1- β 2/ β 1- β 2+	76	
Non précisés	21	1,0
Total	2191	100,0

2 – 2 - Résultats quantitatifs

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

Tableau V : Electrophorèse des protéines (%) – Sérum 04G9 - Résultats par groupe technique (N ≥ 15)

Réactifs - Appareil	N	Albumine		α 1-globulines		α 2-globulines		β -globulines		γ -globulines	
		m	CV (%)	m	CV (%)	m	CV (%)	m	CV (%)	m	CV (%)
TOUTES TECHNIQUES CONFONDUES	2191	61,78	5,0	2,38	16,4	9,52	8,5	8,95	10,8	17,32	10,1
BECKMAN-COULTER Paragon CZE 2000 (SPE kit)	25	57,99	1,0	5,48	7,4	9,65	3,5	8,40	4,0	18,65	2,3
BIOMIDI Midifilm & Midiplaque Protéines	32	61,00	4,3	2,66	14,2	7,32	10,6	8,59	5,6	19,63	9,5
BIOMIDI Protéines	15	62,32	4,4	2,68	11,1	8,53	9,3	8,70	19,4	18,34	6,0
HELENA SAS-MX SP-10 (bleu acide)	84	59,88	4,0	2,85	16,9	9,14	11,4	9,40	10,0	18,82	7,6
- appareil HELENA Junior 24	45	59,61	4,1	3,03	14,8	9,20	8,2	9,21	7,6	19,06	7,1
HELENA SAS-MX SP-10 β 1- β 2 (bleu acide)	20	58,57	6,0	2,68	17,3	9,46	13,5	10,08	13,3	19,84	9,3
HELENA Titan Gel Protéines (HR)	89	59,24	4,5	2,50	23,8	10,02	9,8	9,89	13,4	18,67	7,3
- appareil HELENA Polyslit (automate)	32	59,48	5,4	2,19	21,1	10,04	10,7	10,10	9,3	18,24	8,1
- appareil HELENA Junior 24	17	58,56	4,1	2,62	15,8	10,04	10,2	10,21	11,6	18,94	6,3
HELENA Titan Gel SPE-IFE (bleu acide)	126	60,17	4,9	2,53	18,9	9,80	10,0	9,01	15,3	18,48	8,5
- appareil HELENA Polyslit (automate)	39	59,13	4,3	2,49	18,4	9,95	8,4	9,90	9,5	18,45	7,2
- appareil HELENA Junior 24	26	60,80	3,4	2,47	17,3	10,06	11,4	8,36	15,4	18,12	7,6
- appareil HELENA Polyscan	19	60,73	5,5	2,61	27,8	9,60	7,7	8,89	14,1	18,94	13,8
- appareil HELENA Optiscan	17	60,98	5,1	2,50	18,4	9,72	13,9	8,86	15,9	18,39	9,1
HELENA Titan III Protéines	137	58,05	4,4	2,43	24,6	9,73	11,9	10,07	7,9	19,62	7,8
- appareil HELENA Junior 24	78	57,62	4,1	2,51	25,8	9,96	12,5	10,35	5,9	19,75	8,5
- appareil HELENA Process 24	20	58,35	4,5	2,33	21,3	9,73	11,0	9,95	10,5	19,67	9,1
SEBIA Capillarys β 1- β 2/ β 1- β 2 +	74	58,12	2,4	3,35	13,4	9,41	5,1	9,36	10,2	19,66	2,4
SEBIA Hydragel (Hydratest) (HR) Protein(e) Hydrasys	869	63,20	3,8	2,28	10,7	9,71	6,8	8,37	7,6	16,45	7,5
- appareil SEBIA Hydrasys (automate)	582	63,20	3,8	2,28	10,9	9,73	7,0	8,35	7,4	16,46	7,4
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit	139	63,94	2,9	2,25	9,9	9,55	5,2	8,22	7,1	16,18	6,4
- appareil SEBIA Préférence	40	61,36	3,6	2,38	8,9	10,28	6,4	8,72	6,6	17,09	5,6
- appareil SEBIA Préférence-Ecran	28	62,06	4,3	2,36	10,2	9,80	6,7	8,79	6,9	16,61	6,9
- appareil SEBIA Phoresis (logiciel)	27	64,75	4,6	2,24	10,0	9,27	6,2	7,90	7,3	15,72	9,7
- appareil SEBIA DVSE	17	62,43	3,6	2,38	7,3	9,45	2,4	8,75	7,5	16,28	10,4
SEBIA Hydragel β 1- β 2 Hydrasys	82	63,43	3,4	2,01	10,8	9,00	5,9	9,16	6,9	16,63	8,0
- appareil SEBIA Hydrasys (automate)	43	63,58	3,8	2,02	11,4	9,07	7,0	9,11	6,6	16,48	8,4
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit	20	63,56	2,8	1,97	10,0	8,95	5,6	9,19	5,3	16,81	9,4
SEBIA Hydragel Protein(e) K20 (amidoschwarz)	511	62,32	4,4	2,36	14,2	9,22	7,5	9,36	7,8	16,77	9,1
- appareil SEBIA Préférence	116	62,37	3,4	2,32	13,3	9,28	6,0	9,39	6,0	16,79	7,4
- appareil SEBIA DVSE	107	62,16	4,9	2,40	12,2	9,28	7,9	9,39	7,7	16,91	10,5
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit	76	64,22	3,3	2,25	13,7	8,82	6,1	8,89	6,2	15,76	7,0
- appareil SEBIA DVS	52	60,78	4,3	2,44	13,0	9,34	7,4	9,74	7,7	17,94	8,1
- appareil SEBIA Préférence-Ecran	46	62,26	3,7	2,36	13,7	9,24	6,6	9,54	7,4	16,66	7,5
- appareil SEBIA Profil	31	62,39	3,1	2,50	18,2	9,18	8,8	9,56	9,2	16,55	7,7
- appareil HELENA Junior 24	27	57,24	5,6	2,64	12,0	10,48	7,7	10,38	9,3	18,87	9,8
SEBIA Sebiagel	41	61,84	4,8	2,66	18,2	7,78	14,5	8,77	11,0	19,11	10,5

2.2.1 Albumine (%)

Les valeurs moyennes sont proches les unes des autres pour les différents couples réactif/appareil d'un même fabricant, de l'ordre de 60% pour Helena et de 63% pour Sebia. Une exception cependant : la technique Sebia Hydragel K20 intégrée avec un système Helena Junior fournit une moyenne à 57,2%.

On remarque également que les moyennes des techniques sur gel Helena sont proches de celles obtenues par l'électrophorèse capillaire : 57,99% pour le Paragon CZE 2000 (Beckman-Coulter) et 58,12% pour le Capillarys (Sebia).

D'une façon générale, pour l'ensemble des techniques, la dispersion des résultats est faible (CV = 5%). Les CV les plus bas sont obtenus avec les techniques d'électrophorèse capillaire : 1% avec le Paragon CZE 2000 (Beckman-Coulter) et 2,4% avec le Capillarys (Sebia).

2.2.2 α 1-globulines (%)

Les valeurs moyennes des différents groupes techniques sont proches les unes des autres sauf celles de l'électrophorèse capillaire : 5,48% pour le Paragon CZE 2000 (Beckman-Coulter) et 3,35% pour le Capillarys (Sebia) pour une moyenne générale de 2,38%.

Cependant, par rapport à l'année dernière, ces résultats sont nettement plus proches de ceux des techniques en gel.

Si les moyennes sont proches, en revanche les CV sont élevés (CV général de 16,4%), et ce, de façon plus marquée pour les techniques Helena (CV entre 15% et 25%) que pour les techniques Sebia (CV de 10% à 12% environ). Les CV les plus bas sont obtenus avec la technique Beckman Coulter Paragon CZE 2000 (7,4%) et avec une technique en gel Sebia Hydrasys et lecteur Sebia DVSE (7,3%)

2.2.3 α 2-globulines (%)

Les valeurs moyennes des différents groupes techniques sont proches les unes des autres, à l'exception des techniques Biomidi Midifilm & Midiplaque Protéines et Sebia Sebiagel qui montrent des valeurs un peu plus basses que les autres techniques.

Les CV sont également légèrement moins élevés pour les techniques Sebia que pour les techniques Helena. Les CV les plus bas sont obtenus avec les mêmes techniques que dans le cas des α 1-globulines.

2.2.4 β -globulines (%)

Il y a peu de différences entre les valeurs moyennes. Pour les CV, les remarques faites pour les α 1-globulines et les α 2-globulines sont également valables, bien que les différences soient moins nettes.

2.2.5 γ -globulines (%)

Pour cette fraction, ce sont les moyennes qui distinguent les techniques Helena des techniques Sebia, environ 19% pour les premières, 16,5% pour les secondes. On note une exception, la moyenne des résultats obtenus avec le Capillarys (Sebia) est de 19,7%.

Les CV ne permettent plus de distinguer les fournisseurs de techniques sur gel. Pour cette fraction les techniques d'électrophorèse capillaire montrent des résultats très groupés : CV de 2,3% pour le Paragon CZE 2000 (Beckman Coulter), de 2,4% pour le Capillarys (Sebia) pour un CV général de 10,1%.

2 – 3 - Interprétation du tracé

La réponse attendue, qui comportait une analyse du tracé et un commentaire associé, était :

"Pic étroit dans la zone des gamma-globulines", assortie du commentaire "Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale".

L'examen attentif du gel et du tracé permettait d'observer la présence d'une bande étroite dans la zone des gamma-globulines (figure 1).

Le nombre de laboratoires ayant donné une bonne réponse, complète ou partielle, est de 2020 soit 92,2% des participants. Le tableau VI en donne la répartition.

Tableau VI : Electrophorèse des protéines / Bonnes réponses : analyse du tracé et commentaire – Sérum 04G9

Analyse du tracé « Pic étroit dans la zone des gamma-globulines »	Commentaire « Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale »	Nombre de laboratoires	
		N	(%)
+	+	1770	(80,8%)
-	+	233	(10,6%)
+	-	17	(0,8%)

Pour 56 laboratoires, l'électrophorèse des protéines présente un aspect normal. Parmi eux, 44 indiquent que leur tracé n'entraîne pas de commentaire particulier.

L'analyse de ces résultats (tableau VII) fait apparaître que les laboratoires qui utilisent une coloration au rouge Ponceau ont beaucoup plus de risque que ceux utilisant un autre colorant de ne pas voir une immunoglobuline monoclonale présente en faible concentration.

Tableau VII : Electrophorèse des protéines / Conclusions « électrophorèse des protéines d'aspect normal » – Sérum 04G9

Technique	Nombre d'utilisateurs	Nombre de conclusion « Electrophorèse des protéines d'aspect normal »	%
Acétate de cellulose - Rouge Ponceau	214	26	12,1
Agarose - Rouge Ponceau	13	1	7,7
Agarose - Amidochwarz	1599	24	1,5
Agarose - Bleu acide	243	4	1,6

2 – 4 – Analyse des résultats

Fractions électrophorétiques :

Quelques laboratoires ont fourni des valeurs en pourcentage pour les différentes fractions dont le total n'est pas égal à 100% ($\pm 0,3\%$). Pour certains ($n = 14$), le total des fractions correspond de toute évidence à la protidémie en g/l (erreur de transcription vraisemblable). Pour d'autres ($n = 40$), le total des fractions varie entre 81% et 109%. Le calcul simple (une addition !) de ce total constitue un élément de contrôle de qualité élémentaire.

Huit utilisateurs du système Capillarys (Sebia) donnent des valeurs proches de 21% pour les β -globulines et de 7,3% pour les γ -globulines alors que les moyennes générales sont trouvées à 8,95% et 17,32% respectivement, et que les moyennes du groupe Capillarys (Sebia) sont égales à 9,36% et 19,66%. Cela provient sans doute d'un défaut de positionnement du point fixant la fin de la zone des β -globulines et le début de celle des γ -globulines.

Utilisation des colorants :

Lors du contrôle précédent en 2003 (03AT11), nous avons déjà souligné le manque de sensibilité, pour la détection d'une immunoglobuline monoclonale présente en faible concentration, des techniques utilisant le rouge ponceau. Cette remarque se confirme pour cette opération. On ne peut que se féliciter de la diminution du pourcentage d'utilisateurs de ce colorant : 10,4% en 2004 contre 16,2% en 2003.

Comparaison Albumine dosée / Albumine calculée :

- Valeurs moyennes :

Sur la base des chiffres moyens enregistrés, après avoir calculé une moyenne en g/l en multipliant la protidémie moyenne (55,0 g/l) par la moyenne obtenue pour la fraction albumine par électrophorèse (61,8%), on n'observe pas de différence notable entre le dosage de l'albumine et sa détermination par électrophorèse (tableau VIII).

Tableau VIII : Comparaison Albumine dosée / Albumine calculée – Sérum 04G9

Albumine	N	Moyenne (g/l)	CV(%)
Dosage	2165	32,71	6,0
Électrophorèse	2191	33,98	5,0

- Résultats individuels :

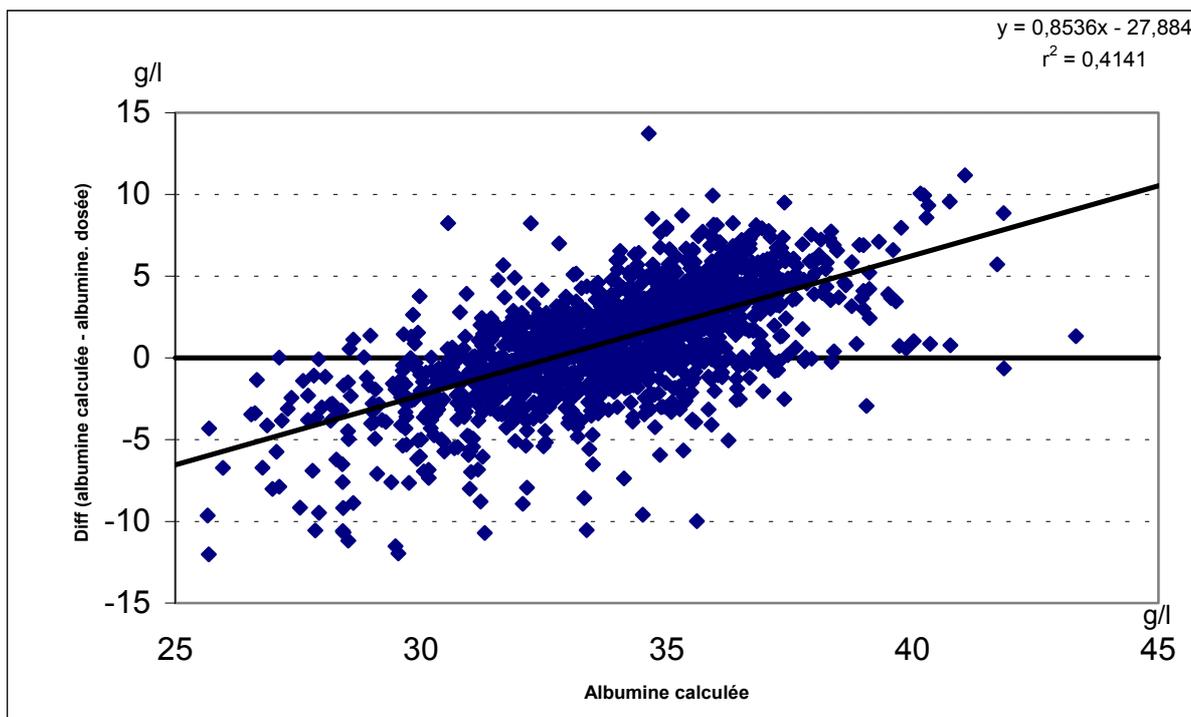
La comparaison entre chaque résultat du dosage de l'albumine (albumine dosée) et de la mesure de cette fraction par électrophorèse (albumine calculée) amène les conclusions suivantes (figure 3) :

- d'une part, ces deux méthodes ne sont pas suffisamment corrélées : $r^2 = 0,414$
droite de corrélation : $y = 0,854x - 27,88$

- d'autre part, il résulte de l'équation de cette droite que les différences entre les deux méthodes montrent que pour les valeurs basses, l'électrophorèse donne des résultats de 20 à 30% inférieurs à ceux issus des dosages. Inversement, pour les valeurs les plus élevées les différences font état de résultats de 15 à 20% plus élevés pour l'électrophorèse par rapport aux dosages.

Au total, les résultats entre albumine dosée et albumine calculée par mesure densitométrique (électrophorèse) ne sont pas totalement superposables. Nous rappelons ici que le dosage de l'albumine doit être effectué par une méthode spécifique (colorimétrie, immunologique) et non par une mesure par densitométrie (électrophorèse).

Figure 3 : Comparaison albumine dosée / albumine calculée – Sérum 04G9



3 – Dosage des immunoglobulines G, A, M

3 – 1 - Résultats

Les résultats figurent dans les tableaux IX, X et XI.

Notons que 192 laboratoires ont réalisé ce dosage sans avoir effectué au préalable l'électrophorèse des protéines.

Tableau IX : Dosage des IgG – Sérum 04G9

IgG (g/l) sérum 04G9					
Réactifs	N	m	s	CV (%)	Médiane
Ensemble des résultats	1172	7,14	0,515	7,2	7,20
Beckman Coulter Array/Immage	151	7,21	0,303	4,2	7,20
Beckman Coulter, Synchron	18	6,99	0,092	1,3	7,00
Binding Site, Minineph	25	6,70	0,366	5,5	6,70
Dade Behring, Dimension	43	7,07	0,581	8,2	7,20
Dade Behring, LC-NOR Partigen (immunodiffusion radiale)	24	7,75	1,309	16,9	7,90
Dade Behring, N antisérum (app. BN)	164	7,29	0,271	3,7	7,30
Dade Behring, Turbiquant	213	6,52	0,471	7,2	6,50
Dako, IgG automates (turbidimétrie)	49	7,77	0,655	8,4	7,90
Fumouze/Orion Diagnostica, Turbox	38	8,77	1,012	11,5	8,70
Konelab, IgG (turbidimétrie)	40	8,48	0,609	7,2	8,65
Olympus, AU System	26	7,11	0,173	2,4	7,10
Roche, Cobas Integra	164	7,02	0,232	3,3	7,00
Roche, Hitachi/Modular	135	7,45	0,357	4,8	7,50

Tableau X : Dosage des IgA – Sérum 04G9

IgA (g/l) sérum 04G9					
Réactifs	N	m	s	CV (%)	Médiane
Ensemble des résultats	1173	1,28	0,112	8,7	1,30
Beckman Coulter Array/Immage	153	1,32	0,064	4,8	1,30
Beckman Coulter, Synchron	16	1,67	0,048	2,9	1,70
Binding Site, Minineph	25	1,19	0,064	5,4	1,20
Dade Behring, Dimension	46	1,20	0,102	8,5	1,20
Dade Behring, LC-NOR Partigen (immunodiffusion radiale)	24	1,36	0,173	12,7	1,30
Dade Behring, N antisérum (app. BN)	162	1,28	0,064	5,0	1,30
Dade Behring, Turbiquant	215	1,24	0,109	8,8	1,20
Dako, IgA automates (turbidimétrie)	49	1,24	0,106	8,6	1,20
Fumouze/Orion Diagnostica, Turbox	40	1,65	0,280	17,0	1,60
Konelab, IgA (turbidimétrie)	40	1,31	0,068	5,2	1,30
Olympus, AU System (turbidimétrie)	26	1,21	0,068	5,6	1,20
Roche, Cobas Integra	163	1,24	0,049	4,0	1,20
Roche, Hitachi/Modular	136	1,35	0,075	5,5	1,40

Tableau XI : Dosage des IgM – Sérum 04G9

IgM (g/l) sérum 04G9					
Réactifs	N	m	s	CV (%)	Médiane
Ensemble des résultats	1158	5,20	1,128	21,7	5,65
Beckman Coulter Array/Immage	152	5,80	0,232	4,0	5,80
Beckman Coulter, Synchron	16	4,33	0,479	11,1	4,25
Binding Site, Minineph	24	6,97	0,502	7,2	6,95
Dade Behring, Dimension	44	5,73	0,527	9,2	5,75
Dade Behring, LC-NOR Partigen (immunodiffusion radiale)	24	5,22	2,144	41,1	5,45
Dade Behring, N antisérum (app. BN)	159	6,06	0,329	5,4	6,00
Dade Behring, Turbiquant	209	3,89	0,325	8,3	3,90
Dako, IgM automates (turbidimétrie)	48	5,68	0,745	13,1	5,75
Fumouze/Orion Diagnostica, Turbox	38	6,99	0,915	13,1	7,20
Konelab, IgM (turbidimétrie)	40	6,59	0,556	8,4	6,65
Olympus, AU System	26	6,18	0,262	4,2	6,15
Roche, Cobas Integra	161	3,72	0,160	4,3	3,70
Roche, Hitachi/Modular	134	6,00	0,265	4,4	6,00

3 – 2 – Analyse des résultats

IgG (tableau IX)

Dans l'ensemble, les résultats sont bons.

On remarque cependant que quatre réactifs fournissent des résultats qui s'écartent notablement de la moyenne générale égale à 7,14 g/l :

- deux réactifs donnent des valeurs trop élevées : Fumouze Turbox avec une moyenne à 8,77 g/l et Konelab avec une moyenne à 8,48 g/l,
- deux réactifs donnent des valeurs plus basses : Binding Site Minineph avec une moyenne à 6,70 g/l et Dade Behring Turbiquant avec une moyenne à 6,52 g/l.

Deux réactifs montrent des CV supérieurs à 10% alors que le CV général est égal à 7,2% : le réactif Fumouze Turbox a un CV de 11,5% et l'immunodiffusion radiale (IDR) de la société Dade Behring a un CV voisin de 17%. On peut rappeler ici que l'IDR est aujourd'hui « dépassée » et ne devrait plus être utilisée.

IgA (tableau X)

Dans l'ensemble, les résultats sont bons.

On remarque cependant que deux réactifs fournissent des résultats qui s'écartent notablement de la moyenne générale égale à 1,28 g/l : le réactif Fumouze Turbox avec une moyenne à 1,65 g/l et le réactif Beckman Coulter Synchron avec une moyenne à 1,67 g/l.

Comme pour les IgG, deux réactifs montrent des CV supérieurs à 10% alors que le CV général est égal à 8,7% : Fumouze Turbox avec un CV à 17% et l'immunodiffusion radiale (IDR) de Dade Behring avec un CV voisin de 13%. Même remarque concernant l'IDR, qui ne devrait plus être utilisée.

IgM (tableau XI)

La moyenne générale est égale à 5,20 g/l. On observe des résultats très variables selon les réactifs : de 3,72 g/l à 6,99 g/l.

Ces écarts sont certainement imputables à la présence dans l'échantillon de l'IgM monoclonale. En effet, les IgM sont des protéines de poids moléculaire élevé et de ce fait, relativement peu solubles, à plus forte raison quand leur concentration augmente. Ceci peut conduire à des phénomènes de précipitation, même en l'absence d'anticorps (précipitations non spécifiques), qui génèrent un signal de même type qu'une précipitation spécifique en néphélométrie ou en turbidimétrie. Ceci peut affecter les résultats obtenus par

des techniques dont la mesure du blanc échantillon avant addition de l'anticorps spécifique n'est pas effectuée dans des conditions optimales. Ces écarts entre techniques expliquent la dispersion des résultats que révèle un CV élevé, égal à 21,7%.

A remarquer, une fois de plus, les mauvais résultats enregistrés avec le réactif d'immunodiffusion radiale de Dade Behring (LC-NOR partigen) avec un CV de 41,1%.

3-3 Commentaire

Sachant que la présence d'une immunoglobuline monoclonale peut interférer dans le dosage des immunoglobulines polyclonales de même isotype, une électrophorèse des protéines doit systématiquement être réalisée avant le dosage des immunoglobulines.

4 – Détection et caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale

Le nombre de laboratoires ayant participé à cette analyse est de 1423. La participation a augmenté de 6 % par rapport à 2003 (opération 03AT11).

4 – 1 – Méthodes et réactifs

La répartition des méthodes utilisées par les participants est précisée dans le tableau XII. L'immunofixation est utilisée seule ou associée à une autre technique par 96 % des participants (1375/1423). Les réactifs utilisés sont répertoriés dans le tableau XIII. Quant aux réactifs utilisés pour les autres méthodes, ils sont cités dans le tableau XIV. L'immunoélectrophorèse et l'électrophorèse capillaire concernent chacune 2 % des laboratoires.

Tableau XII : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : méthodes utilisées – Sérum 04G9-

Immunofixation	Immunoélectrophorèse, immunoblot, électrophorèse capillaire ou autre	Nombre de participants
oui	non	1363
non	oui	48
oui	oui	12

Tableau XIII : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : réactifs d'immunofixation – Sérum 04G9-

Réactifs d'immunofixation	Nombre de participants
SEBIA Hydragel 1,2et4 IF / Hydratest 1,2et4 IF	804
SEBIA Hydragel IF K20/double IF K20	342
HELENA Kit Titan gel IFE 2000	71
HELENA Titan gel SPE-IFE	48
HELENA Titan gel haute résolution immunofix	26
HELENA Kit REP/SPIFE IFE 6-4-2	24
BECKMAN COULTER Paragon IFE	16
SEBIA Hydragel 2/4 Bence Jones	14
HELENA SAS-MX Immunofix	8
SEBIA Hydragel Bence Jones K20	5
HELENA SAS-I Immunofix	2
BIOCADE Kit Biocagel IF	2
BIOMIDI Immunofixation sur Midigel IFE	1
DAKO kit d'immunofixation	1

Tableau XIV : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : autres réactifs – Sérum 04G9-

Réactifs utilisant une méthode autre que l'immunofixation	Nombre de participants
Immunoélectrophorèse	
SEBIA Hydragel IEP	24
Technique « maison » : immunoélectrophorèse	4
HELENA Titan gel pour immunoélectrophorèse	4
HELENA plaques d'immunoélectrophorèse	1
BECKMAN COULTER Paragon IEP	2
Electrophorèse capillaire	
BECKMAN Réactif d'IF pour l'EP capillaire	22
Autres	
THE BINDING SITE Freelite lambda libre	1
HELENA Kit Titan gel IEF IgG	1

4 – 2 - Résultats

La réponse attendue « Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgM Lambda » a été rendue par 96% des participants. Si l'on inclut les 40 réponses «Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgM Lambda + protéine de Bence Jones Lambda », le taux de bonnes réponses atteint 99 %. L'ensemble des 1423 réponses est présenté dans le tableau XV.

Tableau XV : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : résultats – Sérum 04G9-

Résultats	Nombre de laboratoires
Présence d'Ig monoclonale de type IgM Lambda	1370
Présence d'Ig monoclonale de type IgM Lambda + protéine de Bence Jones Lambda	40
Présence d'Ig monoclonale de type IgM Kappa	8
Présence d'Ig monoclonale de type IgA Lambda	2
Absence d'Ig monoclonale	3

Parmi les trois laboratoires qui ont rendu « Absence d'Ig monoclonale », deux avaient donné cette réponse à la précédente opération de contrôle en 2003. On note cependant que le nombre de réponses « Absence d'Ig monoclonale » a diminué puisqu'il est passé de 26 sur 1340 en 2003 (soit 2 %) à 3 sur 1423 en 2004 (soit 0,2 %). Il est important de signaler que les échantillons 03G9 et 04G9 contenaient tous deux une immunoglobuline IgM lambda, mais à plus forte concentration pour l'échantillon envoyé en 2004. Deux des trois laboratoires qui ont rendu « Absence d'Ig monoclonale » ont noté une anomalie au niveau des gamma-globulines, le troisième au niveau des alpha-globulines mais aucun n'a donné de commentaire suspectant une immunoglobuline monoclonale.

Quant aux réponses « Présence d'Ig monoclonale de type IgM Lambda + protéine de Bence Jones Lambda » soit 2,8 %, elles sont en décroissance par rapport à 2003 (89/1340 soit 6,6 %).

4 – 3 – Analyses des résultats

Après investigation, l'observation d'une protéine de Bence Jones serait liée à une dégradation au cours du temps de l'immunoglobuline monoclonale, avec libération de la chaîne légère. Celle-ci serait mise en évidence par les antisérums anti-chaînes légères libres. La question qui se pose est de savoir pourquoi certains biologistes utilisent systématiquement ces réactifs quand ils observent une immunoglobuline monoclonale complète sans fraction supplémentaire associée.

En 2003, les deux réponses « Absence d'Ig monoclonale » et « Ig monoclonale IgM Lambda + protéine de Bence Jones Lambda » avaient suscité l'envoi d'un courrier aux laboratoires leur expliquant les causes d'erreur éventuelles et la démarche diagnostique. L'efficacité de ce courrier s'est vérifiée par la diminution de ces deux types de réponses. En effet, sur les 89 laboratoires ayant trouvé une protéine de Bence Jones associée en 2003, 71 ont obtenu la bonne réponse en 2004. Néanmoins, 16 participants ont persisté dans la recherche d'une protéine de Bence Jones.

5 – Quantification de l'immunoglobuline monoclonale

5 – 1 - Résultats

665 laboratoires ont fourni une réponse (tableau XVI). Les trois méthodes les plus utilisées sont la densitométrie (n = 421 utilisateurs), l'appréciation visuelle (n = 113) et l'électrophorèse capillaire (n = 49).

L'immunonéphélométrie, l'immunoturbidimétrie et l'immunodiffusion radiale ont été employées respectivement par 42, 36 et 2 participants.

Tableau XVI : Quantification de l'immunoglobuline monoclonale – Sérum 04G9

Méthode	N	m	s	CV (%)	Médiane
Ensemble des résultats	665	4,82	0,889	18,5	4,90
Appréciation visuelle	113	4,51	0,738	16,4	4,50
Densitométrie	421	4,68	0,790	16,9	4,80
Electrophorèse capillaire	49	5,83	0,711	12,2	5,80
Immunonéphélométrie	42	5,95	0,366	6,2	5,90
Immunoturbidimétrie	36	4,48	1,044	23,3	4,10
Immunodiffusion radiale	2	-	-	-	-

5 – 2 – Analyse des résultats

Nous remarquons que 12% des participants ont utilisé une méthode inadaptée pour ce dosage, à savoir l'immunonéphélométrie, l'immunoturbidimétrie ou l'immunodiffusion radiale. En effet, ces dernières dosent l'ensemble des immunoglobulines d'un même isotype, polyclonales et monoclonales.

Il est intéressant de constater que la densitométrie (électrophorèse) et l'appréciation visuelle du pic sur le tracé électrophorétique montrent des performances très proches.

Les résultats de l'électrophorèse capillaire sont un peu moins dispersés (CV = 12,2%) avec une moyenne sensiblement plus élevée (moyenne = 5,83 g/l).

6 – Cohérences des réponses Electrophorèse / Recherche d'immunoglobuline monoclonale

6 – 1 – Résultats

Parmi les 1389 laboratoires ayant rendu un commentaire à l'électrophorèse ainsi qu'un résultat pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale, 0,6% des participants (9) ont rendu un commentaire à l'électrophorèse sans aucun rapport avec la présence d'immunoglobuline monoclonale, bien qu'ils l'aient mise en évidence en immunofixation. Ce taux était de 10% en 2003.

6 – 2 – Analyse des résultats

Une lettre d'information adressée aux participants en 2003 soulignait le taux important (10%) de laboratoires rendant des résultats incohérents entre électrophorèse et immunofixation. On note en 2004 une nette diminution de ces anomalies. Il est important de vérifier la cohérence des résultats d'un même bilan. Les 9 laboratoires, cités au paragraphe 6.1, auraient dû remettre en cause leur technique d'électrophorèse.

Conclusion

Les principaux messages de l'opération 04AT11 sont les suivants :

- les résultats de dosage de l'albumine ne sont pas superposables à ceux obtenus par calcul densitométrique sur tracé électrophorétique.
- la présence d'une immunoglobuline monoclonale pouvant interférer dans le dosage des immunoglobulines polyclonales de même isotype, il est conseillé de systématiquement réaliser une électrophorèse avant de doser les immunoglobulines polyclonales.
- les techniques d'immunoprécipitation (immunonéphélométrie, immunoturbidimétrie ou immunodiffusion radiale) ne sont pas adaptées pour quantifier une immunoglobuline monoclonale.