

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles

Immunopathologie

Edition : avril 2008

07AT12

Novembre 2007

Stéphanie ALBAREDE
Bach-Nga PHAM (INTS - Paris)

Expédition : 13 novembre 2007

Clôture : 10 décembre 2007

Edition des comptes-rendus individuels :

Paramètres contrôlés : **07G1 – Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles**

Nombre de laboratoires concernés* : 165

Nombre de laboratoires participants** : 161

* 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

Cette première opération « Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles » (ANCA) proposait un sérum contenant un mélange d'auto-anticorps, associant ANCA de spécificité anti-myéloperoxidase (anti-MPO) et anticorps anti-nucléaires. Cet échantillon 07G1 provenait d'un patient atteint d'une vascularite de type polyangéite microscopique.

Le taux de résultats faussement négatifs pour le dépistage en immunofluorescence indirecte des ANCA est de 7,8% et le taux de résultats faussement négatifs pour l'identification des anticorps anti-MPO est de 17,5%. Les taux de bonnes réponses sont donc insuffisants et doivent être améliorés au regard de la valeur diagnostic des ANCA. Notons, en ce qui concerne l'identification des anticorps anti-MPO, que le taux de réponses erronées est nettement supérieur en technique immunodot qu'en technique ELISA. Ces résultats mettent en évidence un fois de plus que la technique immunodot est mal maîtrisée par les laboratoires (observation déjà notée pour d'autres analyses : anticorps anti-thyroïdiens ou sérologie virale).

Enfin, ce contrôle souligne le manque de standardisation pour le titrage des auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et donc l'importance du suivi du patient avec un même réactif.

Echantillon 07G1

Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA)

Définition de l'échantillon

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

Les experts suivants ont testé cet échantillon :

Dr L.H. Noël (C.H. Necker – Paris - 75), Dr N. Fabien (CH Lyon Sud – Lyon - 69), Dr F. Fortenfant (C.H.U Ranguel – Toulouse – 31).

La réponse unanime des experts est :

- Dépistage en immunofluorescence indirect (IFI) : réaction ininterprétable due à la présence d'anticorps anti-nucléaires.
- Identification : présence d'anticorps anti-myelopéroxydase (anticorps anti-MPO)

Résultats des participants

L'échantillon 07G1 a été envoyé aux 165 laboratoires inscrits au contrôle national de qualité anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. Nous avons réceptionné en retour 161 bordereaux-réponses. Sur 40 bordereaux, il était précisé que le laboratoire n'effectuait pas cette analyse. D'après les commentaires des biologistes, ce décalage par rapport aux déclarations d'activité serait plutôt lié à des erreurs de déclaration qu'à un abandon de cette analyse. Rappelons ici l'importance de remplir correctement les rubriques du questionnaire activité et de penser aux mises à jour afin d'éviter non seulement des dépenses inutiles, mais aussi pour permettre l'obtention d'échantillons intéressants qu'un nombre élevé de participants ne rend pas possible.

1 – Dépistage

1- 1 Méthode et réactifs

1 – 1 – 1 Immunofluorescence indirecte (IFI)

Le nombre de laboratoires ayant pratiqué le dépistage des ANCA en IFI est de 105.

Grossissement de l'objectif :

Parmi les 104 laboratoires ayant précisé le grossissement de l'objectif employé, la majorité utilise un grossissement de 40 (tableau I)

tableau I – Grossissement de l'objectif utilisé par les participants

Grossissement	Effectif
10	1
20	3
40	91
50	6
60	1
63	2

Dilution de dépistage

Parmi les 104 laboratoires ayant précisé la dilution de dépistage employée, 63% utilisent la dilution 1 : 20 (tableau II).

tableau II – Titre de la dilution de dépistage utilisée par les participants

Titre de dépistage (inverse de dilution)	Effectif
8	1
10	19
20	61
40	14
50	2
80	2
160	3
320	1
400	1

Fixateurs

Cet item a été renseigné par les 105 participants. L'utilisation de deux fixateurs, éthanol et formol, est la méthode la plus fréquente (66% des participants). Cependant, 41% des laboratoires ont choisi d'utiliser uniquement l'éthanol (tableau III).

tableau III – Fixateur utilisé en IFI par les participants

Fixateurs	Effectif
Ethanol et formol	63
Ethanol	39
Formol	2
Ethanol et Méthanol	1

Réactifs

Les réactifs d'IFI utilisés pour cette opération 07AT12 sont répertoriés dans le tableau IV. Un même laboratoire pouvait rendre une conclusion qualitative avec un seul réactif et un seul fixateur, ou un seul réactif et deux fixateurs différents, ou deux réactifs différents. Ceci explique le fait que le nombre de kits utilisés (150) soit supérieur au nombre de participants (105).

1 – 1 – 2 Autres techniques

Onze laboratoires ont employé une technique autre que l'immunofluorescence indirecte. Parmi eux, sept ont également effectué un test d'IFI.

Deux techniques ont été employées : ELISA et Immunodot (tableau V).

1– 2 Résultats

1 – 1 – 1 Immunofluorescence indirecte

Si l'on analyse les réponses qualitatives par laboratoires, on obtient la répartition suivante :

- 88 réponses « positif »
- 8 réponses « négatif »
- 7 réponses « ininterprétable ».

Deux laboratoires n'ont pas conclu.

L'analyse des résultats qualitatifs par test est reportée dans le tableau (IV).

L'aspect a été reporté majoritairement de type périnucléaire pour une fixation à l'éthanol (69% des réponses). De plus, 26% de laboratoires rapportent un aspect anti-nucléaire (tableau VI). Pour la fixation au formol, 86% de laboratoires décrivent un aspect cytoplasmique.

Concernant les 28 laboratoires rapportant un aspect anti-nucléaire, la répartition de leur réponse qualitative est représentée dans le tableau VII. On retrouve ici l'ensemble des 7 réponses « ininterprétable » et 6 des huit réponses « négatif ».

tableau IV – Réactifs utilisés en IFI par les participants

Réactif d'immunofluorescence indirecte	Code	Effectif	Résultats 07G1			
			Positif	négatif	ininterprétable	pas de réponse
BIO ADVANCE Granulocytes fixés à l'éthanol (réf : 1200-xxxx)	AFB1	6	3	1	2	
BIO ADVANCE Granulocytes fixés au méthanol (réf : 1202-xxxx)	AFB2	1			1	
BIO ADVANCE IFI: "Granulocyte mosaïque 1"(réf : 1201-xxxx-1)	AFB3	5	5			
BIO ADVANCE IFI: "Granulocyte mosaïque 2"(réf : 1201-xxxx-2)	AFB4	13	12	1		
BIO ADVANCE IFI: "Granulocyte mosaïque 12"(réf : 1201-xxxx-12)	AFB8	1	1			
BIO ADVANCE IFI: "Granulocyte mosaïque 3"(réf : 1201-xxxx-3)	AFB5	1	1			
BIO ADVANCE IFI: "Granulocyte mosaïque 8"(réf : 1201-xxxx-8)	AFB7	4	4			
BIO-RAD Lames ANCA ethanol (réf :29403 / 29417 / 29416)	AFR1	7	5	1		1
BIO-RAD Lames ANCA Formol (réf : 29418)	AFR2	2	1	1		
BIO-RAD Lames ANCA COMBI ethanol/Formol (réf : 29419)	AFR3	3	2	1		
BIOMEDICAL DIAGNOSTIC c ANCA ethanol (réf : IMM 1140)	AFL1	5	4	1		
BIOMEDICAL DIAGNOSTIC p ANCA Formol (réf : IMM 1141)	AFL2	2	2			
MENARINI NOVA Lite ANCA (coffret complet) (réf :708290)	AFM1	7	7			
MENARINI ANCA fixé à l'éthanol (lame 6 ou 12 puits) (réf : 508290 / 508296)	AFM2	36	29	2	4	1
MENARINI ANCA fixé au formol (lame 6 ou 12 puits) (réf : 508295 / 508297)	AFM3	29	25		4	
MENARINI ANCA fixé au méthanol (lame 6 puits) (réf : 508280)	AFM4	1	1			
THE BINDING SITE Combi kit ANCA (réf : FK018)	AFT1	3	3			
THE BINDING SITE Coffret ANCA éthanol (réf : FK016.1 / FK016)	AFT2	9	9			
THE BINDING SITE Coffret ANCA fomol (réf : FK017.1 / FK017)	AFT3	3	3			
THE BINDING SITE Lames de neutrophiles fixées à l'ethanol (réf : FS016.1 / FS016.2)	AFT4	3	2			1
THE BINDING SITE Lames de neutrophiles fixées au formol (réf : FS017.1 / FS017.2)	AFT5	1	1			
Technique maison	AFX1	6	5		1	
Autres	AFXX	2	2			
	Totaux	150	127	8	12	3

tableau V – Réactifs utilisés par les participants relevant d'une autre technique que l'IFI

Réactif	Code	Résultats 07G1	
		Positif	Douteux
Immunodot			
BIOMEDICAL DIAGNOSTIOCS ANCA-MBG-DOT (réf :HM025)	AEL1	4	2
Elisa			
DIASORIN GBM et ANCA screening rapid (réf : GCP100)	AEN1	3	1
ORGENTEC ANCAscreen (ORG589 / ORG289-12 / ORG289-24)	AEC1	1	

tableau VI – Aspect de la fluorescence en fonction du fixateur : résultats des participants

Aspect 07G1	Fixateur		
	Ethanol	Formol	Méthanol
Périnucléaire	71	5	
Cytoplasmique	1	51	
antinuécléaire	27	2	1
Autre atypique	4	1	

tableau VII – Répartition des réponses des laboratoires ayant observé un aspect antinucléaire

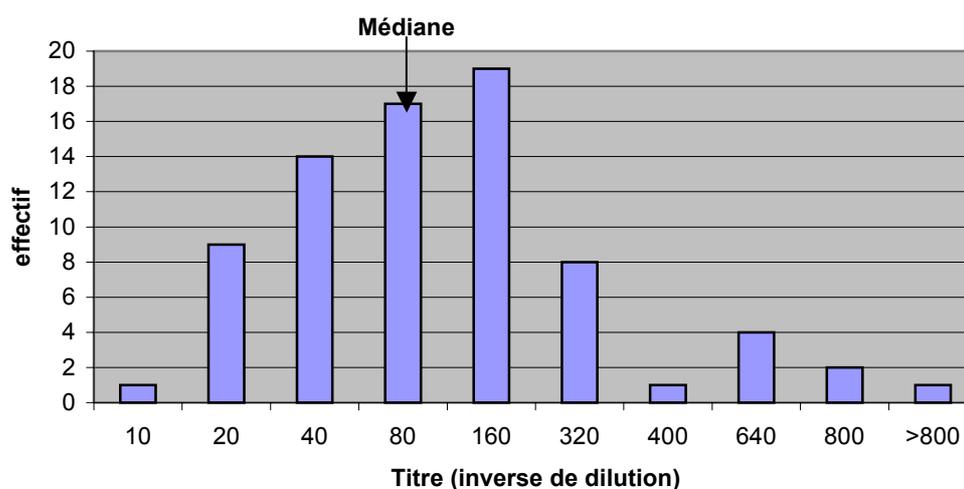
IFI : Résultats des laboratoires ayant observé un aspect antinucléaire						
Fixateur 1	Aspect 1	Fixateur 2	Aspect 2	Positif	Négatif	Ininterprétable
Ethanol	Aspect antinucléaire	-	-	2	2	2
Ethanol	Aspect antinucléaire	Formol			3	1
Ethanol	Aspect antinucléaire	Formol	Aspect cytoplasmique	10		4
Ethanol	Aspect antinucléaire	Formol	Aspect antinucléaire		1	
Ethanol	Aspect périnucléaire	Ethanol	Aspect antinucléaire	1		
Ethanol	Aspect périnucléaire	Méthanol	Aspect antinucléaire	1		
-	-	Formol	Aspect antinucléaire	1		

Parmi les 8 réponses négatives en IFI, quatre laboratoires ont procédé à l'identification des anticorps. Concernant les anticorps anti-MPO (réponse attendue : « positif »), les réponses de ces 4 laboratoires se répartissent en 3 « négatif » et 1 « douteux ».

Concernant le titre des anticorps, 77 laboratoires ont répondu à cet item dont un disant que le sérum ne pouvait pas être titré du fait de la présence d'anticorps antinucléaires. Les 7 titres rendus « supérieur à » ont été transformés en la dilution immédiatement supérieure pour calculer la médiane. Cette médiane est de 90 et correspond donc à un titre de 1 : 80.

La répartition des titres est reportée dans le graphique 1.

figure 1 - Répartition des titres obtenus par les participants / Echantillon 07G1



1 – 2 – 2 Autres techniques

On n'observe pas de résultats négatifs pour les 11 dépistages effectués en immunodot ou ELISA (Tableau V).

1– 3 Commentaires

L'échantillon 07G1 était un sérum de patient contenant à la fois des anticorps anti-nucléaires et des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles de spécificité anti-MPO. Dans ce sens, la réponse attendue pour le dépistage des ANCA était « résultat ininterprétable » de par la présence d'anticorps anti-nucléaires. Nous avons cependant considéré la réponse « résultat positif, aspect périnucléaire » comme acceptable, sans tenir compte des titres rendus puisqu'il y avait là aussi interférence avec les anticorps anti-nucléaires .

2 – Identification

2 – 1 – Anticorps anti-myéloperoxydase (MPO)

104 laboratoires ont testé la spécificité anti-MPO dont 5 laboratoires à l'aide de deux kits différents.

2 – 1 – 1 Techniques et réactifs

Sur 109 tests réalisés, 56,9% relèvent d'une technique ELISA, 30,3% d'une technique immunodot et 6,5% de la cytométrie de flux (tableau VIII).

tableau VIII – Répartition des résultats anticorps anti-MPO en fonction des réactifs

Réactif	Code	Anticorps anti-MPO / 07G1				Pas de réponse
		n	Positif	Douteux	négatif	
ELISA		62	55	3	2	1*
BIO ADVANCE ELISA Anti-MPO (réf : EA 1211-9601 G)	AMB4	15	15			
BIO ADVANCE ELISA Profil ANCA (réf : EA 1200-12008-1G)	AMB1	7	7			
BIO-RAD Kallestad anti-MPO (pANCA) microplate EIA (réf :31024)	AMR1	4	1		3	
DIASORIN MPO-ANCA (réf :MPO103X)	AMN1	4	2	2		
INGEN Aeskulisa MPO (réf :3303)	AMG1	1		1		
MENARINI Coffret ELISA QUANTA Lite MPO IgG (réf :708700)	AMM1	6	6			
ORGENTEC Anti-MPO (réf :ORG519 / ORG219-12 / ORG219-24)	AMC1	4	4			
PHADIA EliA MPO Well (réf :14-5513-01)	AMP1	12	12			
PHADIA Varelisa MPO ANCA (réf :17696)	AMP2	3	2			1*
THE BINDING SITE Coffret anti-MPO 96 tests (réf: MK031)	AMT1	5	5			
Elisa Maison	AMZE	1	1			
Immunodot		33	23	5	6	
ALPHADIA Vasculitis ANCA Dot kit (réf : AD MPD)	AMA1	2	2			
BIO ADVANCE EUROLINE MPO + PR3 (réf :DL 1200-1601-2 G)	AMB3	3	1		2	
BIO ADVANCE EUROLINE MPO + PR3 + GBM (réf : DL 1200-1601-3 G)	AMB2	4	4			
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ANCA-MBG-DOT (réf : HM025)	AML1	17	10	4	3	
DIASORIN ANCA+GMB Dot (ancagd-24/l)	AMN3	6	5	1		
ORGENTEC ANCA-3 Line (réf : ORG789-08 , ORG789-16)	AMC2	1	1			
Cytométrie		7	5			2*
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Fidis Vasculitis (réf : MX007)	AML2	7	5			2*
Autres		7	7			
Totaux		109**	90	8	8	3*

* titres > seuils

** résultats correspondant à 104 laboratoires

2 – 1 – 2 Résultats

Par test effectué (109 tests), le taux de bonnes réponses pour les anticorps anti-MPO, c'est à dire positives, est de 82,5% (tableau VIII). Ce taux est identique si l'on analyse les réponses par laboratoire (104 laboratoires) : 82,7%.

Le pourcentage de réponses faussement négatives est supérieur en technique Immunodot qu'en technique ELISA (18,2% contre 3,2%) et nul en cytométrie de flux.

Le nombre de laboratoires ayant rendu un titre est de 59. La médiane a été calculée après une troncature à trois écart-types. Seules les médianes des réactifs pour lesquels l'effectif est supérieur à trois sont inscrites dans le tableau IX. La médiane générale n'a pas été calculée, la dispersion des résultats en inter-réactifs étant trop grande (valeurs allant de 0 à 225).

tableau IX – résultats 07G1 : titres d'anticorps anti-MPO

Réactif	Anticorps anti-MPO / 07G1			
	Code	n	Seuil	Médiane
BIO ADVANCE ELISA Anti-MPO (réf : EA 1211-9601 G)	AMB4	8	20	68,5
MENARINI Coffret ELISA QUANTA Lite MPO IgG (réf :708700)	AMM1	6	20	37,5
PHADIA EliA MPO Well (réf :14-5513-01)	AMP1	7	10	50,0

2 – 2 – Anticorps anti-protéinase 3 (PR3)

90 laboratoires ont testé la spécificité anti-PR3 en utilisant un seul réactif.

2 – 2 – 1 Techniques et réactifs

Sur 90 tests réalisés, 57,8% relèvent d'une technique ELISA, 34,4% d'une technique immunodot et 2,2% de la cytométrie de flux (tableau X).

tableau X – Réactifs utilisés pour l'identification des anticorps anti-PR3 en fonction des réactifs

Réactif	Anticorps anti-PR3 07G1	
	Code	n
ELISA		52
BIO ADVANCE ELISA Anti-MPO (réf : EA 1211-9601 G)	APB4	8
BIO ADVANCE ELISA Anti-PR3-hn-hr (réf : EA 1201-9601-2G)	APB6	1
BIO ADVANCE ELISA Capture Anti-PR3 (réf : EA 1201-9601-1 G)	APB5	3
BIO ADVANCE ELISA Profil ANCA (réf : EA 1200-12008-1G)	APB1	3
BIORAD Kallestad anti-PR3 (cANCA) microplate (réf: EIA 31023)	APR1	3
DIASORIN PR3-ANCA (réf: PR3 102X)	APN1	3
MENARINI Coffret ELISA QUANTA Lite PR3 IgG (réf: 708705)	APM1	6
ORGENTEC Anti-PR3 (réf: ORG518 / ORG218-12 / ORG218-24)	APC1	4
PHADIA EliA PR3 well (réf: 14-5512-01)	APP1	11
PHADIA Varelisa PR3 ANCA (réf: 17796)	APP2	4
SERVIBIO ImmuLISA PR3 (réf: Y1162)	APS1	1
THE BINDING SITE Coffret anti-PR3 96 tests (réf: MK032)	APT1	5
Immunodot		31
BIO ADVANCE EUROLINE MPO + PR3 (réf :DL 1200-1601-2 G)	APB3	2
BIO ADVANCE EUROLINE MPO + PR3 + GBM (réf : DL 1200-1601-3 G)	APB2	4
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Fidis Vasculitis (réf : MX007)	APL2	7
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ANCA-MBG-DOT (réf : HM025)	APL1	14
DIASORIN ANCA+GMB Dot (ancagd-24/l)	APN3	3
ORGENTEC ANCA-3 Line (réf : ORG789-08 , ORG789-16)	APC2	1
Cytométrie		2
ALPHADIA Vasculitis ANCA Dot kit (réf : AD MPD)	APA1	2
Autres		5

2 – 2 – 2 Résultats

On observe 100% de réponses négatives pour les 87 laboratoires ayant rendu un résultat qualitatif. Les 3 laboratoires n'ayant pas conclu sur le caractère positif/négatif de l'échantillon 07G1 avaient tous un titre inférieur au seuil.

2 – 3 – Autres spécificités

La spécificité anti-membrane basale glomérulaire (anti-MBG) a été testée par 12 laboratoires.

2 – 3 – 1 Techniques et réactifs

On retrouve les mêmes techniques que pour les anticorps anti-MPO et anti-PR3 mais avec une prédominance de l'immunodot (6 utilisateurs) (tableau XI).

tableau XI – Réactifs utilisés pour l'identification des anticorps anti-MBG en fonction des réactifs

Réactif	Anticorps anti-MBG 07G1	
	Code	n
ELISA		1
DIASORIN ANCA panel kit (réf : PAN106)	AAN1	1
Immunodot		6
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS ANCA-MBG-DOT (réf : M025)	AAL1	5
ORGENTEC ANCA-3 Line (réf : ORG789-08 , ORG789-16)	AAC2	1
Cytométrie		3
BIOMEDICAL DIAGNOSTICS Fidis Vasculitis (réf : MX007)	AAL2	3
Autre ou non précisé		2

2 – 3 – 2 Résultats

Sur les 12 résultats anticorps anti-MBG, on dénombre 11 résultats négatifs et un résultat douteux

Commentaires

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) appartiennent à une nouvelle famille d'auto-anticorps décrite il y a une quinzaine d'années. Ces anticorps sont dirigés contre des enzymes contenues dans les granules des polynucléaires neutrophiles. Les cibles antigéniques préférentielles des ANCA sont la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3), enzymes co-localisées dans les granules azurophiles et les lysosomes des polynucléaires neutrophiles.

Les ANCA occupent une place de plus en plus importante dans le diagnostic des vascularites systémiques. Leur valeur diagnostique est grande dans la granulomatose de Wegener, le syndrome de Churg et Strauss, la périartérite microscopique et les glomérulonéphrites nécrosantes focales sans dépôt d'immunoglobulines.

Les ANCA sont détectés en immunofluorescence indirecte en utilisant comme substrat des polynucléaires neutrophiles fixés à l'éthanol. Deux principaux aspects peuvent être observés : cytoplasmique (C-ANCA) ou périmoléculaire (P-ANCA). La positivité de la recherche d'ANCA en immunofluorescence indirecte doit toujours être complétée par l'identification de la spécificité anti-MPO ou anti-PR3 de l'auto-anticorps. En effet, les aspects C-ANCA ou P-ANCA ne sont pas toujours associés à la présence d'anticorps anti-PR3 ou d'anticorps anti-MPO, respectivement. Ils peuvent être associés à la présence d'anticorps dirigés contre d'autres cibles antigéniques, de valeur diagnostique non démontrée. Par ailleurs, l'aspect P-ANCA peut être masqué par la présence d'anticorps anti-nucléaires. L'interprétation des résultats doit toujours tenir compte du contexte clinique.

Pour cette première opération « anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles » du Contrôle National de Qualité, l'échantillon 07G1 était un échantillon obtenu chez un patient atteint d'une vascularite

de type polyangéite microscopique. Le sérum contenait un mélange d'auto-anticorps, associant ANCA de spécificité anti-MPO et anticorps anti-nucléaires.

Le fait marquant concernant cette opération est l'alerte de Réactovigilance déclenchée par l'unité du Contrôle National de Qualité de l'Afssaps au vu des résultats faussement négatifs d'anticorps anti-MPO obtenus avec certains réactifs. Compte tenu de la valeur diagnostique des anticorps anti-MPO, il importe que les réactifs utilisés dans les contextes d'urgence clinique soient totalement fiables.

Le deuxième élément mis en exergue par le Contrôle National de Qualité anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) est l'absence de standardisation concernant le titrage de ces auto-anticorps. Dans les techniques de type ELISA, les titres des ANCA sont rendus en unités arbitraires. Les résultats rendus par les participants montrent une dispersion inter-réactifs importante des titres d'ANCA (valeurs allant de 0 à 225 UA/mL). Ces données confirment qu'il ne faut jamais comparer les titres d'ANCA obtenus avec des réactifs différents, sachant que le suivi du titre des ANCA est un critère de réponse au traitement corticoïde et/ou immunosuppresseur parfois utilisé par les cliniciens.