

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Electrophorèse des protéines
Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Biochimie spécialisée / Immunopathologie **05ATI2**

Novembre 2005

Edition : août 2006

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

Expédition : 16 novembre 2005

Clôture : 12 décembre 2005

Edition des comptes-rendus individuels : 17 février 2006

Paramètres contrôlés : **05G9 – Electrophorèse des protéines**

Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Nombre de laboratoires concernés* : 2326

Nombre de laboratoires participants** : 2246

* 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 05AT12 a concerné les laboratoires qui ont déclaré pratiquer l'électrophorèse des protéines et/ou la recherche d'immunoglobuline monoclonale.

L'échantillon 05G9 contenait une immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa (15 g/l), mise en évidence par l'existence d'un pic étroit dans la zone des γ -globulines sur le tracé de l'électrophorèse des protéines sériques. Dans l'ensemble, les résultats de l'électrophorèse sont relativement homogènes et satisfaisants avec un taux de bonnes réponses concernant l'interprétation du tracé de 98,7%. Concernant la recherche d'immunoglobuline monoclonale, la réponse attendue a été rendue par 93,5% des laboratoires.

Cet échantillon avait un double intérêt : évaluation externe de la phase analytique mais aussi sensibilisation à la phase pré-analytique. En effet, l'échantillon était un plasma. La présence de fibrinogène pouvait donc être observée à l'électrophorèse. D'autre part, l'aspect de l'échantillon pouvait orienter le biologiste vers la présence d'une cryoglobuline. Une zone de commentaires libres permettait aux participants d'effectuer des remarques sur ces deux points. Cette zone a été remplie exceptionnellement par les laboratoires.

Echantillon 05G9

Electrophorèse des protéines et/ou recherche d'immunoglobuline monoclonale

Définition de l'échantillon

L'échantillon 05G9 était un **plasma** liquide d'origine humaine qui contenait une immunoglobuline monoclonale (15 g/l), mise en évidence par l'existence d'un pic étroit dans la zone des γ -globulines sur le tracé de l'électrophorèse des protéines sériques. Cette immunoglobuline monoclonale **de type IgG Kappa** avait une activité **cryoprécipitante**. Parallèlement, la concentration des immunoglobulines polyclonales était fortement diminuée.

Les commentaires des experts figurent aux paragraphes 1 et 2 ci-dessous :

Dr J. BIENVENU (C.H. Lyon sud – Lyon - 69), Dr A. CHEVAILLIER (CHU – Angers - 49), Dr J. DE GRAEVE (C.H.U Ranguel – Toulouse - 31), Dr A. DAUNIZEAU (C.H. Schaffner – Lens - 62), Dr JM GOMBERT (Hôpital de la Milétrie – Poitiers - 86), Dr L. INTRATOR (Hôpital Henri Mondor – Créteil - 94), Dr B.N. PHAM (Hôpital Beaujon – Clichy -92).

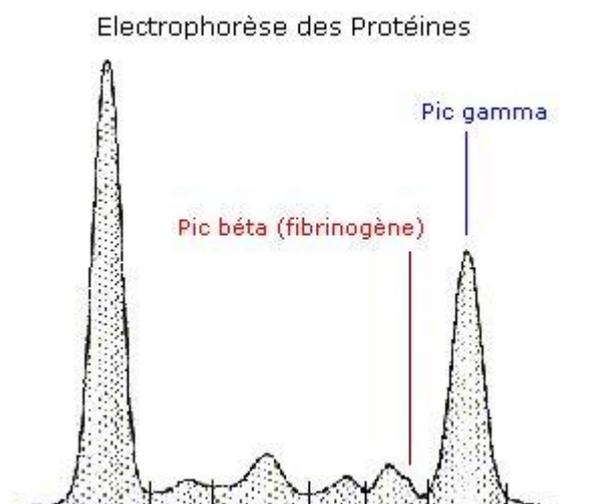
1 – Electrophorèse des protéines

Commentaires attendus obtenus à partir de la réponse des experts :

« Pic étroit dans la zone des γ -globulines et pic étroit dans la zone des β -globulines » (figure 1) ;
« Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale ».

NB : pic étroit dans la zone des β -globulines dû à la présence de fibrinogène.

Figure 1 - tracé électrophorétique obtenu avec l'échantillon 05G9
support : gel d'agarose, colorant : amidoschwarz (noir amide)

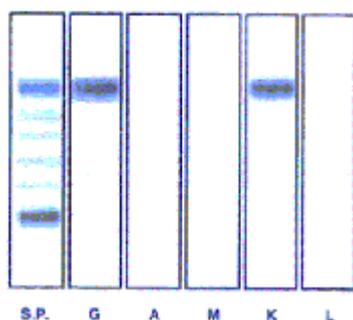


2 – Recherche et quantification de l'immunoglobuline monoclonale

Commentaires attendus obtenus à partir de la réponse des experts :

Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa (Figure 2)

Figure 2 - Immunofixation obtenue avec l'échantillon 05G9



Méthode statistique et expression des résultats

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

- élimination des valeurs aberrantes (ex : erreurs grossières de type erreur d'unité, de transcription...) sur l'effectif non tronqué (N).
 - calcul de la valeur cible (m), c'est-à-dire moyenne obtenue après double troncature à deux écarts-types ; cette double troncature permet d'éliminer les valeurs extrêmes. Il a été vérifié que la valeur cible obtenue est proche de la médiane.
 - l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) obtenus après cette double troncature sont considérés comme représentatifs de la dispersion des résultats.
 - ces calculs sont réalisés si l'effectif du groupe est suffisant ($N \geq 10$).
- Pour évaluer la qualité des résultats rendus par chaque laboratoire, l'écart entre la valeur rendue et la valeur cible est apprécié en fonction de limites acceptables :
- La zone d'acceptabilité est obtenue en appliquant à la valeur cible des limites acceptables exprimées en % (tableau I) qui tiennent compte à la fois d'objectifs analytiques et d'exigences cliniques ;
 - ces limites acceptables ont été déterminées d'après les travaux du Groupe SFBC « Normes de validation du protocole de validation de techniques » publiés dans les Annales de Biologie Clinique (*Ann. Biol. Clin.*, 1999, 57 : 685 - 695).

Tableau I - Limites acceptables

Analyse	Limites acceptables
Protéinogramme (fractions en %)	
Albumine	± 12%
α 1-globulines	± 30%
α 2-globulines	± 20%
β -globulines	± 20%
γ -globulines	± 20%

Résultats des participants

Le nombre de laboratoires ayant effectué au moins une des analyses de cette opération est de 2022.

La répartition selon les analyses est la suivante :

- 1403 laboratoires ont effectué l'électrophorèse des protéines et la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale,
- 590 laboratoires ont effectué uniquement l'électrophorèse des protéines,
- 29 laboratoires ont effectué uniquement la détection/caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale.

1 – Electrophorèse des protéines

Le nombre de laboratoires ayant répondu pour cette analyse est de 1993 (2191 en 2004).

1 – 1 - Méthodes et réactifs

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

Le support le plus utilisé est le gel d'agarose : 85,0% d'utilisateurs (84,7% en 2004). L'acétate de cellulose n'est plus utilisé que par 4,7% d'utilisateurs (contre 9,8% en 2004).

L'électrophorèse capillaire poursuit sa progression : 200 laboratoires en sont équipés, soit 10% contre 4,6% en 2004.

En ce qui concerne le choix du colorant, sur gel d'agarose, le noir amide (amidoschwarz) est le plus souvent utilisé : 1425 laboratoires ont fait ce choix, soit 71,5%. Puis, viennent le bleu acide utilisé par 261 laboratoires (13,1%) et le rouge ponceau utilisé par 8 laboratoires (0,4%). Sur gel d'acétate de cellulose, seul le rouge ponceau est utilisé, 94 laboratoires ont fait ce choix (4,7%).

Tableau II – Electrophorèse des protéines (%) – Echantillon 05G9 – Méthodes et réactifs utilisés

Méthodes - Réactifs	Nombre d'utilisateurs	%
Support Acetate de cellulose - rouge ponceau [cell-Pon]	94	4,7
- Helena BioSciences, Titan III Protéines	89	
- Biomidi, Midifilm / Midiplaque Protéines	3	
- Sebia, Sebiagel	2	
Support Agarose - amidoschwarz (noir amide, amido black) [aga-Schw]	1425	71,5
- Sebia, Hydragel (HR) Protein(e) HYDRASYS	919	
- Sebia, Hydragel Protein(e) K20	359	
- Sebia, Hydragel β 1- β 2 HYDRASYS	105	
- Helena BioSciences, REP β 1- β 2 (amido black)	10	
- Helena BioSciences, Titan Gel Protéines (HR)	9	
- Beckman Coulter, Paragon SPE	9	
- Biomidi, Midigel Protéines	8	
- Helena BioSciences, REP (amido black)	6	
Support Agarose - bleu acide [aga-Bleu]	261	13,1
- Helena BioSciences, Titan Gel SPE-IFE	133	
- Helena BioSciences, SAS-MX SP-10	78	
- Helena BioSciences, SAS-1 (bleu acide)	33	
- Helena BioSciences, SAS-MX SP-10 β 1- β 2	17	
Support Agarose - rouge ponceau [aga-Pon]	8	0,4
- Helena BioSciences, REP (rouge ponceau)	8	
Electrophorèse capillaire [capillaire]	200	10,0
- Sebia, Capillarys	167	
- Beckman Coulter, Paragon CZE 2000 (SPE kit)	33	
Non précisés	5	0,3
Total	1993	100,0

1 – 2 - Résultats quantitatifs

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

Tableau III : Electrophorèse des protéines (%) – Echantillon 05G9 - Résultats par groupe technique (N ≥ 10)

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	1993	48,60	5,3	3,48	17,1	9,07	11,8	8,09	26,0	30,53	8,4
BECKMAN-COULTER, Paragon CZE [capillaire]	33	43,07	2,0	7,79	3,6	11,05	2,9	5,24	7,1	33,07	1,3
HELENA Titan III Protéines [cell-Pon]	89	48,84	4,8	3,39	20,3	7,78	13,5	3,76	13,2	35,95	6,6
- appareil HELENA Junior 24	47	48,80	5,4	3,54	18,3	7,83	13,5	3,84	9,1	36,47	7,7
- appareil HELENA Process 24	14	48,98	3,8	2,90	23,7	7,97	10,0	3,56	12,5	35,92	6,3
HELENA, REP β1-β2 [aga-Schw]	10	45,93	3,3	3,87	16,3	9,87	10,7	8,19	34,7	31,99	11,2
HELENA, SAS-1 [aga-Bleu]	33	45,78	3,4	4,26	11,1	9,15	6,5	9,01	19,9	31,21	3,9
- appareil HELENA SAS-1 (automate)	18	45,94	3,5	4,14	14,5	9,54	14,8	8,61	21,9	31,40	4,3
- appareil HELENA Platinum (logiciel)	10	45,82	2,4	4,19	9,9	9,13	3,7	7,88	34,4	31,25	3,2
HELENA, SAS-MX SP-10 [aga-Bleu]	78	47,64	4,5	4,48	15,0	7,75	9,2	5,69	51,2	34,56	8,3
- appareil HELENA Junior 24	40	47,61	4,8	4,48	11,1	7,70	8,5	4,85	51,2	35,40	6,7
HELENA SAS-MX SP-10 β1-β2 [aga-Bleu]	17	46,89	4,3	3,98	13,2	9,12	4,4	6,39	43,9	33,64	7,9
HELENA Titan Gel SPE-IFE [aga-Bleu]	132	47,09	3,5	3,54	19,3	8,16	7,5	7,63	32,5	33,39	7,4
- appareil HELENA Polyslit (automate)	56	46,93	3,8	3,38	10,9	8,18	7,3	7,41	37,4	33,76	7,2
- appareil HELENA Polyscan	19	47,24	3,2	3,25	20,7	8,12	7,6	8,73	8,6	33,38	7,2
- appareil HELENA Junior 24	18	47,61	4,0	3,83	39,1	8,32	9,9	7,44	34,1	32,79	8,6
- appareil HELENA Optiscan	16	47,21	1,8	3,46	9,4	8,33	5,0	9,14	5,9	31,65	2,9
- appareil HELENA Platinum (logiciel)	10	45,99	4,5	4,53	19,4	8,57	12,3	8,31	30,8	32,60	8,1
SEBIA Capillarys [capillaire]	167	47,54	1,7	4,76	5,9	7,03	20,5	7,48	24,0	32,43	4,6
SEBIA Hydragel (HR) Protein(e) Hydrasys [aga-Schw]	912	49,27	5,4	3,38	10,9	9,14	9,9	9,00	14,5	29,48	6,6
- appareil SEBIA Hydrasys (automate)	556	49,36	5,6	3,40	11,4	9,09	10,1	8,98	15,3	29,50	7,0
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [sans standardisation]	105	50,69	4,0	3,29	8,9	8,89	7,3	8,86	12,6	28,87	5,5
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [avec standardisation]	99	47,23	4,8	3,56	10,3	9,51	9,2	9,36	12,8	30,62	6,2
- appareil SEBIA Phoresis (logiciel)	38	50,78	7,4	3,14	13,8	8,86	11,8	8,45	22,5	29,29	8,2
- appareil SEBIA Préférence	38	50,00	2,7	3,34	7,5	9,22	9,1	8,84	11,4	29,03	3,3
- appareil SEBIA DVSE	32	49,10	4,9	3,52	9,7	9,69	14,4	9,34	10,5	28,73	6,3
- appareil SEBIA Préférence-Ecran	17	49,96	4,5	3,40	10,0	9,39	8,7	6,86	39,1	28,97	5,4
SEBIA Hydragel β1-β2 Hydrasys [aga-Schw]	105	48,81	6,0	3,01	11,7	9,73	9,1	9,51	9,9	29,36	6,0
- appareil SEBIA Hydrasys (automate)	63	48,29	6,3	3,02	10,9	9,87	8,6	9,47	10,9	29,64	5,5
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [sans standardisation]	14	52,37	2,1	2,96	13,5	8,74	8,2	8,87	7,4	27,97	5,2
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [avec standardisation]	13	47,40	6,2	3,17	7,5	9,94	8,5	10,10	6,5	30,08	6,0
SEBIA Hydragel Protein(e) K20 [aga-Schw]	358	49,48	5,2	3,18	12,2	9,45	9,4	8,64	11,6	29,53	6,5
- appareil SEBIA DVSE	79	49,19	5,4	3,22	11,5	9,84	8,3	8,76	9,4	29,37	6,5
- appareil SEBIA Préférence	78	49,01	4,2	3,17	13,2	9,48	9,4	8,73	9,1	29,77	5,2
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [sans standardisation]	45	50,98	4,1	3,12	10,8	9,20	7,8	8,10	14,3	28,79	6,7
- appareil SEBIA DVS	33	49,19	4,6	3,20	8,3	9,26	9,6	8,70	12,9	30,35	7,6
- appareil SEBIA Préférence-Ecran	26	49,21	5,6	3,34	11,0	9,52	9,4	8,37	12,8	29,69	7,0
- appareil SEBIA Profil	22	50,46	4,1	3,05	13,8	9,66	9,5	8,62	13,5	28,61	7,6
- appareil SEBIA Hyrys 2 Hit [avec standardisation]	17	48,13	4,3	3,37	13,0	9,18	8,5	8,47	11,7	30,83	6,4
- appareil SEBIA Phoresis (logiciel)	12	52,78	4,5	2,88	13,6	8,02	11,8	6,65	32,6	29,59	5,8
- appareil HELENA Junior 24	17	47,91	5,1	3,17	16,4	10,07	12,1	7,67	32,2	30,87	5,7

1.2.1 Albumine (%)

Les valeurs moyennes sont proches les unes des autres pour les différents couples réactif/appareil d'un même fabricant. Cependant, pour l'ensemble des techniques, on peut observer que les résultats d'albumine vont de 43% (Beckman, Paragon CZE) à 53% (Sebia, Hydragel K20 sur Phorésis). On peut remarquer également que les moyennes varient de 47% à près de 51% à l'intérieur du groupe technique Sebia Hydragel Hydrasys, avec un décalage de 3 à 4% entre la technique Sebia sur lecteur Hyrys avec et sans standardisation.

D'une façon générale, pour l'ensemble des techniques, la dispersion des résultats est faible (CV = 5,3%). Les CV les plus bas sont obtenus avec les techniques d'électrophorèse capillaire : 1,7% avec le système Sebia Capillarys et 2% avec le système Beckman Paragon CZE et avec une technique en gel : Helena Titan Gel SPE-IFE sur lecteur Optiscan (1,8%).

1.2.2 α 1-globulines (%)

Les valeurs moyennes des différents groupes techniques sont proches les unes des autres sauf celles de l'électrophorèse capillaire : 7,8% pour le système Beckman Paragon CZE et 4,8% pour le système Sebia Capillarys pour une moyenne générale de 3,5%. A noter que sur l'ensemble des résultats, les valeurs extrêmes d' α 1-globulines vont de 2,9% (Sebia, Hydragel K20 sur Phorésis) à 7,8% (Beckman, Paragon CZE).

Quant aux CV, ils sont élevés (CV général de 17,1%), et ce, de façon plus marquée pour les techniques en gel Helena (CV entre 11 et 20%) que pour les techniques en gel Sebia (CV de 11 à 12% environ). Les CV les plus bas sont obtenus avec les techniques d'électrophorèse capillaire (3,6% avec le système Beckman Paragon CZE et 5,9% avec le système Sebia Capillarys). Des performances voisines sont observées avec quelques techniques en gel : Sebia Hydragel sur lecteur Préférence (7,5%) et Sebia Hydragel β 1- β 2 sur lecteur Hyrys 2 [avec standardisation] (7,5%).

1.2.3 α 2-globulines (%)

Les valeurs moyennes des différents groupes techniques sont proches les unes des autres, à l'exception des techniques d'électrophorèse capillaire. Cependant, on peut observer que, sur l'ensemble des résultats, les valeurs extrêmes d' α 2-globulines vont de 7% (Sebia, Capillarys) à environ 11% (Beckman, Paragon CZE).

Pour les techniques en gel, les CV sont légèrement moins élevés pour les techniques Helena (CV de l'ordre de 8,5%) que pour les techniques Sebia (CV de l'ordre de 9,5%). Pour les techniques d'électrophorèse capillaire, le système Beckman Paragon CZE montre un CV de 2,9% alors que le système Sebia Capillarys affiche quant à lui un CV de 20,5%.

1.2.4 β -globulines (%)

Sur l'ensemble des techniques, on peut observer que les valeurs moyennes vont 3,6% (Helena, Titan III sur lecteur Process 24) à 10,1% (Sebia, Hydragel β 1- β 2 sur lecteur Hyrys avec standardisation). Toutefois, on peut noter que les valeurs moyennes des techniques Sebia sont proches (de l'ordre de 9%), à l'exception de la technique Sebia Capillarys (7,5%). Pour les techniques Helena, on observe quelques différences entre les valeurs moyennes (de 3,8% à 9% en fonction des techniques).

Quant aux CV, ils sont élevés (CV général de 26%), et ce, de façon plus marquée pour les techniques en gel Helena que pour les techniques en gel Sebia. Les CV les plus bas sont obtenus avec la technique d'électrophorèse capillaire Beckman Paragon CZE (7,1%) et avec quelques techniques en gel : Helena Titan Gel SPE-IFE sur lecteur Optiscan (CV d'environ 6%) et Sebia Hydragel β 1- β 2 sur lecteur Hyrys (CV de l'ordre de 7%).

1.2.5 γ -globulines (%)

Pour cette fraction, ce sont les moyennes qui distinguent les techniques Helena des techniques Sebia, environ 34% pour les premières, 29,5% pour les secondes. On note une exception, la moyenne des résultats obtenus avec le système Sebia Capillarys est de 32,4%. Sur l'ensemble des techniques, on peut observer, toutefois, que les valeurs extrêmes de γ -globulines vont de 28% (Sebia, Hydragel β 1- β 2 sur lecteur Hyrys sans standardisation) à 36,5% (Helena, Titan III sur lecteur Junior 24).

Les CV ne diffèrent pas selon les fournisseurs de techniques sur gel. Pour cette fraction, les techniques d'électrophorèse capillaire montrent des résultats très groupés : CV de 1,3% pour le système Beckman Paragon CZE, de 4,6% pour le système Sebia Capillarys pour un CV général de 8,4%.

1.2.6 Commentaires

Dans ce tableau III, on peut observer des CV élevés avec la technique d'électrophorèse capillaire Sebia Capillarys pour les α 2-globulines et les β -globulines, à 20,5% et 24,0% respectivement. Cela ne correspond pas aux valeurs observées lors des précédents contrôles avec cette technique.

Une analyse plus fine des résultats de ce groupe permet d'expliquer ce phénomène qui est lié à la nature de l'échantillon. Elle met en évidence trois sous-groupes homogènes qui peuvent s'expliquer par la présence dans l'échantillon des produits de dégradation des protéines et de fibrinogène (figure 3). En effet, on observe plusieurs pics inhabituels dont un se situe entre les α 2-globulines et les β -globulines. Il apparaît

évident que certains laboratoires ont intégré ce pic avec les α_2 -globulines (Groupe III), d'autres avec les β -globulines (Groupe II). Le calcul des CV pour chacun de ces sous-groupes donne les résultats suivants (tableau III bis) beaucoup plus conformes aux valeurs attendues pour la technique.

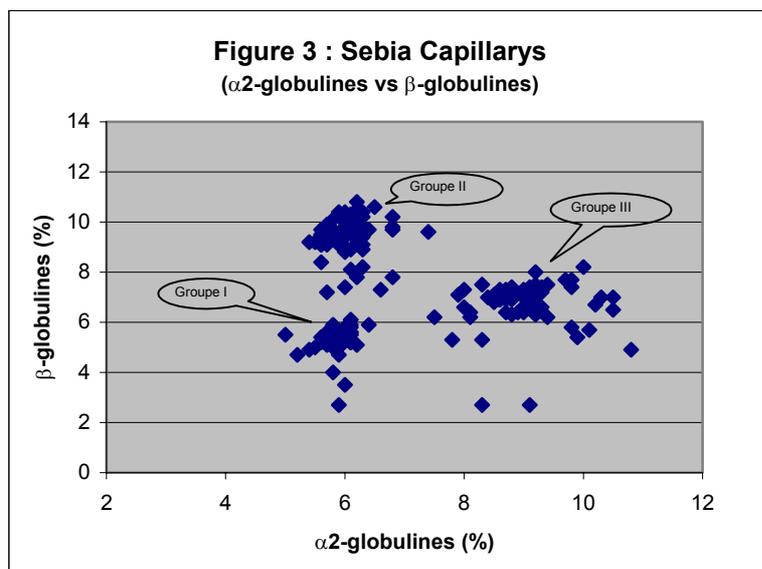


Tableau III bis : Système Sebia Capillarys, statistiques des sous groupes I, II et III.

	Groupe I		Groupe II		Groupe III	
	α_2	β	α_2	β	α_2	β
N	40		60		64	
m	5,9	5,4	6,0	9,7	9,0	6,8
CV	3,1%	6,1%	3,8%	5,0%	6,5%	9,6%

1- 3 - Interprétation du tracé

L'examen du gel et du tracé (figure 1) permettait d'observer la présence d'une bande étroite dans la zone des γ -globulines correspondant à l'**immunoglobuline monoclonale**, et d'une bande étroite dans la zone des β -globulines correspondant au **fibrinogène**.

La réponse attendue (analyse du tracé et commentaire associé) était donc : "Pic étroit dans la zone des γ -globulines et pic étroit dans la zone des β -globulines », assortie du commentaire "Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale". Cette réponse complète a été rapportée par 273 laboratoires.

La réponse « Pic étroit dans la zone des γ -globulines », assortie du commentaire "Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale", bien que partielle, a été considérée comme acceptable. Cette réponse a été rapportée par 1490 laboratoires.

Le nombre de laboratoires ayant donné une bonne analyse du tracé (réponse attendue ou acceptable) et/ou le commentaire attendu, est de 1966 soit **98,7%** des participants (contre 92,2% en 2004). Le tableau IV en donne la répartition.

Tableau IV : Electrophorèse des protéines / Bonnes réponses : analyse du tracé et/ou commentaire – Echantillon 05G9

Analyse du tracé	Commentaire	Nombre de laboratoires (%)
« Pic étroit dans la zone des β -globulines et pic étroit dans la zone des γ -globulines » <u>ou</u> « Pic étroit dans la zone des γ -globulines »	« Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale »	
+	+	1763 (88,5%)
-	+	191 (9,5%)
+	-	12 (0,6%)
-	-	27 (1,4%)

1– 4 – Analyse des résultats

L'échantillon de cette opération était un plasma de patient suivi pour myélome multiple. Vu la quantité importante d'immunoglobuline monoclonale présente dans l'échantillon (pic étroit dans la zone des γ -globulines estimé à environ 15 g/l), la seule difficulté de l'exercice résidait dans la mise évidence d'un petit pic étroit supplémentaire, lié à la présence de fibrinogène, migrant dans la zone des β -globulines.

L'observation du pic dans la zone des β -globulines n'a été rapportée que par 275 laboratoires (soit 14% des participants). Plusieurs explications peuvent être avancées. La première serait un défaut d'observation des zones de migration électrophorétique en α et β -globulines par les biologistes, défaut d'observation ayant pu être renforcé par la présence du pic étroit important dans la zone des. Une deuxième explication possible serait le manque de sensibilité de la technique d'électrophorèse utilisée. Il est à souhaiter que cette explication ne soit que théorique car elle sous-entend que les biologistes utilisant une telle technique d'électrophorèse accepteraient un seuil de sensibilité électrophorétique d'environ 3 g/l (taux du fibrinogène dans l'échantillon 05G9) au lieu du seuil admis de 0,5 à 1 g/l. On peut se demander dans quelle mesure certains biologistes ont pu considérer que le fibrinogène ne devait pas être mentionné car sans intérêt et indiquant un prélèvement non conforme.

Enfin, concernant les 27 laboratoires qui n'ont pas vu le pic étroit dans la zone des γ -globulines lié à la présence d'immunoglobuline monoclonale ; ils ont été contactés afin de les aider à analyser leur réponse.

2 – Détection et caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale

Le nombre de laboratoires ayant participé à cette analyse est de 1431, nombre comparable à celui de 2004 (1423).

2 – 1 – Techniques et réactifs

Le bordereau réponse permettait aux laboratoires de renseigner deux réactifs : un réactif relevant de la technique d'immunofixation et un réactif relevant d'une autre technique.

Le tableau V montre la répartition des techniques et des réactifs :

- 1269 laboratoires utilisent uniquement un réactif d'immunofixation
- 139 laboratoires utilisent uniquement un réactif relevant d'une technique autre que l'immunofixation
- 23 laboratoires utilisent deux techniques dont l'immunofixation.

L'immunofixation représente donc 88,8% des techniques utilisées. Elle représentait 96% des réactifs utilisés en 2004. Cette diminution s'explique par une progression de l'électrophorèse capillaire qui ne représentait que 2% des réactifs employés en 2004 contre 9,5% en 2005. L'immunoélectrophorèse reste peu employée (1,5%).

Tableau V : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : réactifs – Echantillon 05G9

Technique / Réactif	Nombre de laboratoires
Immunofixation	1292
BECKMAN Paragon IFE	14
ELITECH / HELENA Kit Titan gel IFE 2000	70
HELENA SAS-3 Immunofix	13
HELENA SAS-I Immunofix	23
HELENA SAS-MX Immunofix	33
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MD) [Hydrasis]	670
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF (MS) [Hydrasis]	211
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF Bence Jones (MD) [Hydrasis]	5
SEBIA Hydragel 1/2/4/9 IF Bence Jones (MS) [Hydrasis]	4
SEBIA Hydragel 6/12 IF Penta (MD) [Hydrasis]	1
SEBIA Hydragel 6/12 IF Penta (MS) [Hydrasis]	1
SEBIA Hydragel Bence Jones K20	1
SEBIA Hydragel IF Penta K20	9
SEBIA Hydragel IF K20/double IF K20	223
THE BINDING SITE Coffret d'immunofixation	1
Autres ou non précisé	13
Immunoélectrophorèse	22
BECKMAN Paragon IEP	2
SEBIA Hydragel IEP sans antiserum [K20]	14
Technique « maison »	6
Electrophorèse capillaire	138
BECKMAN Réactif d'IF pour l'EP capillaire	26
SEBIA Capillarys immunotyping	112
Immunoblot	1
Technique « maison »	1
Autres Techniques	1
THE BINDING SITE Freelite kappa libre (BN prospec, BNII)	1

2 – 2 - Résultats

La réponse attendue « Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa » a été rendue par 93,5% des laboratoires (tableau VI). On note 6% de réponses associant une protéine de Bence Jones Kappa à cette IgG Kappa. Ce type de réponses (immunoglobuline monoclonale + chaîne légère libre monoclonale de même isotype) avait diminué entre 2003 et 2004, passant de 6,6% à 2,8%. Le nombre de mauvaises réponses est de 7 soit 0,5%, résultat comparable à 2004 (0,6%).

Tableau VI : Détection / caractérisation de l'immunoglobuline monoclonale : résultats – Echantillon 05G9

Résultats	Nombre de réponses
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa	1338
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa + protéine de Bence Jones Kappa	86
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Lambda	3
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgM Lambda	1
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgM Kappa + protéine de Bence Jones Kappa	1
Présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgA Kappa	1
Absence d'immunoglobuline monoclonale*	1

*Le laboratoire ayant répondu absence d'immunoglobuline monoclonale avait pourtant mis en évidence un pic étroit dans la zone des gamma-globulines.

2 – 3 – Analyses des résultats

Le taux de bonnes réponses est bon (93,5%) mais pourrait facilement être amélioré par une meilleure utilisation des immun-sérums anti-chaînes légères libres (voir chapitre 3.2). En effet, 6% des participants ont trouvé une protéine de Bence Jones Kappa associée à l'immunoglobuline monoclonale. Or, il n'existait pas de protéine de Bence Jones Kappa (la recherche de protéine de Bence Jones dans le sérum et les urines du patient dont est issu l'échantillon était négative).

Un laboratoire a répondu absence d'immunoglobuline monoclonale bien qu'ayant mis en évidence la présence d'un pic étroit dans la zone des gamma-globulines en électrophorèse. Un courrier a été adressé au biologiste afin de comprendre cette discordance. La réponse de ce laboratoire n'était pas due à une erreur technique mais à un problème d'interprétation, la bande observée n'ayant pas été considérée comme suffisamment étroite pour être étiquetée comme « bande en rapport avec la présence d'une immunoglobuline monoclonale ».

Rappelons que la présence d'une bande étroite à l'électrophorèse est le premier signe biologique signant l'existence d'une immunoglobuline monoclonale. La « largeur » de la bande est un critère subjectif, une bande étroite pouvant être interprétée comme étant « large » lorsqu'une immunoglobuline monoclonale est présente en grande quantité dans le sérum d'un patient (cas de l'échantillon 05G9).

3 – « Commentaires libres » des participants

Exceptionnellement, une zone de commentaires libres figurait sur le bordereau-réponse.

3 – 1 - Résultats

Nous avons recueilli des commentaires libres sur 453 bordereaux réponses. Ces commentaires ont été regroupés en trois classes (tableaux VII, VIII et IX) : commentaires libres concernant la caractérisation des pics et de l'Ig monoclonale, commentaires libres concernant les caractéristiques de l'échantillon et/ou les investigations à effectuer, et commentaires libres portant sur l'électrophorèse. Un même laboratoire a pu émettre plusieurs commentaires dans une même classe.

Deux commentaires principaux étaient attendus dans la première classe (tableau VII) :

- présence de fibrinogène
- présence d'une cryoglobuline

La présence de fibrinogène n'a été évoquée que par 139 laboratoires malgré la présence à l'électrophorèse d'un pic en beta-globuline, soit 7% (139/1991) des laboratoires ayant effectué une électrophorèse des protéines. Ce pic est soit passé inaperçu, soit interprété comme étant une autre immunoglobuline monoclonale (39 réponses), soit étant de l'hémoglobine (1 réponse), soit non interprété (200 laboratoires ayant répondu « Pic étroit dans la zone des gamma-globulines + Pic étroit dans la zone des beta-globulines » à l'électrophorèse).

Si la présence de la cryoglobuline n'a été évoquée que par 55 laboratoires, 73 autres laboratoires ont mis en évidence les phénomènes liés à cette activité (tableau VIII) : « précipitation de l'échantillon à froid » et/ou « prélèvement trouble » et/ou « précipitation au niveau des points de dépôt ». Au total, nous avons donc 128 réponses orientant vers une cryoglobuline soit 6,3% (128/2020) des participants à cette opération de contrôle. Quatre autres laboratoires ont pensé à la possible présence d'une cryoglobuline (1 laboratoire a remarqué la précipitation au niveau des points de dépôt et 2 ont préconisé un traitement au mercapto-éthanol), mais ont conclu après analyse à l'absence de cryoglobuline.

Tableau VII : Commentaires libres : caractérisation des pics et de l'Ig monoclonale – Echantillon 05G9

Commentaires libres concernant la caractérisation des pics et de l'Ig monoclonale	Nombre de laboratoires
commentaire attendu	
Présence d'une cryoglobuline et de fibrinogène	5
commentaire correct mais partiel	
Présence de fibrinogène	134
Présence d'une cryoglobuline	50
commentaires faux	
Présence possible d'une autre Ig monoclonale	29
Tester les anti-sérums anti-D et anti-E	10
Absence de cryoglobuline	4
Présence d'hémoglobine	1

Tableau VIII : Commentaires libres : caractéristiques de l'échantillon et/ou investigations à effectuer – Echantillon 05G9

Commentaires libres concernant les caractéristiques de l'échantillon et/ou les investigations à effectuer	Nombre de laboratoires
Commentaires justes mais insuffisants en absence du commentaire attendu	
Précipitation de l'échantillon à froid	3
Prélèvement trouble	40
Précipitation au niveau des points de dépôt	55*
Faire une recherche de protéine de Bence – Jones urinaire	119
Faire un dosage pondéral des immunoglobulines	62
Quantifier l'Ig monoclonale	41
Commentaires faux	
Prélèvement à traiter au mercaptoéthanol	51

*parmi les 55 laboratoires ayant observé une précipitation au point de dépôt, 22 préconisent un traitement au mercaptoéthanol

Tableau IX : Commentaires libres : remarques sur l'électrophorèse – Echantillon 05G9

Commentaires libres : remarques sur l'électrophorèse	Nombre de laboratoires
Diminution des Ig polyclonales (répression de synthèse)	68
Hypoalbuminémie	55

3 – 2 – Analyse des résultats

L'échantillon de l'opération 05AT12 contenait une immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa ayant une activité cryoprécipitante. Sa température de précipitation était élevée : 30°C.

Si le taux de bonnes réponses, à savoir « présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa » est correct, il est néanmoins curieux de constater que 86 laboratoires sur 1531, soit 6%, aient rapporté la présence d'une protéine de Bence Jones Kappa (chaînes légères libres monoclonales de type Kappa) en plus. Il est possible que le caractère cryoprécipitant de l'immunoglobuline monoclonale ait été à l'origine d'artéfacts, tel qu'un phénomène de précipitation au point de dépôt en immunofixation. Cependant, il est important de réaliser les contrôles adéquats avant de conclure à la présence de protéine de Bence Jones. Le Bulletin du Contrôle National de Qualité de l'Afssaps n°2 (février 2005) rappelait que « L'utilisation d'antisérum anti-chaînes libres doit s'accompagner de contrôles. Le premier contrôle consiste à utiliser l'antisérum anti-Lambda libre si on recherche la présence de protéine de Bence Jones Kappa et inversement. Le deuxième contrôle est de faire un « blanc antisérum », c'est-à-dire un dépôt de sérum, sans dépôt d'antisérum ». L'information n'a pas eu les effets escomptés.

Pour les laboratoires couplant électrophorèse des protéines et recherche d'immunoglobuline monoclonale en immunofixation, il était relativement simple de faire le lien entre le pic étroit dans la zone des β -globulines et la présence de fibrinogène (absence de bande de précipitation avec les immunosérums anti-chaînes lourdes et anti-chaînes légères utilisés, au niveau de la migration électrophorétique du pic étroit dans la zone des β -globulines). Il était même possible de confirmer la présence de fibrinogène soit avec un immunosérum anti-fibrinogène, soit en dosant le fibrinogène, soit encore en refaisant l'électrophorèse après avoir éliminé le fibrinogène (utilisation de thrombase). On s'attendait donc à ce qu'un nombre plus élevé de laboratoires rendent en commentaires libres « présence de fibrinogène ».

La vraie difficulté que pouvait poser cette opération était liée à l'activité cryoprécipitante de l'immunoglobuline monoclonale. Le commentaire « présence d'une cryoglobuline » n'a été rapporté que par 55 laboratoires. Aussi, le seul conseil qui puisse être formulé est de garder à l'esprit l'importance de la phase pré-analytique en biologie. Vérifier l'aspect de tout échantillon avant de le tester fait partie des bonnes pratiques de laboratoire.

4 – Analyse de la cohérence des réponses Electrophorèse / Recherche d'immunoglobuline monoclonale

Un laboratoire a répondu « absence d'immunoglobuline monoclonale » alors qu'il avait mis en évidence un pic étroit dans la zone des gamma-globulines.

A l'électrophorèse, 15 laboratoires n'ont observé ni pic monoclonal ni profil oligoclonal ni restriction d'hétérogénéité ni bande large à l'électrophorèse et n'ont pas répondu « Résultats nécessitant des examens complémentaires pour la recherche et le typage d'une dysglobulinémie monoclonale » en conclusion du tracé électrophorétique. Un seul d'entre eux a effectué une recherche d'immunoglobuline monoclonale qu'il a rendu positive.

Le nombre de laboratoires ayant rendu des réponses incohérentes entre l'électrophorèse et la recherche d'immunoglobuline monoclonale est faible : les 2 laboratoires cités ci-dessus. Cela ne représente que 0,14% (2/1402) des laboratoires réalisant les deux analyses. Ce pourcentage était de 0,6 en 2004 et 10,1% en 2003. On observe donc une réelle amélioration dans l'interprétation globale des résultats.

Conclusion

L'intérêt de cette opération était d'aborder la phase pré-analytique. L'échantillon distribué était un plasma de patient atteint de myélome multiple (plasmaphérèse thérapeutique). Cette opération a permis de rappeler aux laboratoires l'importance de vérifier l'aspect de tout échantillon avant de le tester. Par ailleurs, l'échantillon choisi a illustré le fait que le caractère cryoprécipitant d'une immunoglobuline monoclonale pouvait entraîner des difficultés d'interprétation dans les tests d'identification des composants monoclonaux.