

A. GUYARD <sup>(1)</sup>, S. ALBAREDE <sup>(1)</sup>, L. MANNESSIER <sup>(2)</sup>, E. BURG <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Afssaps – DEDIM – Saint-Denis, France – <sup>(2)</sup> EFS – Lille, France

## INTRODUCTION

L'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé), en charge du Contrôle national de qualité (CNQ) des laboratoires d'analyses de biologie médicale, contrôle une centaine d'analyses par an. Les analyses d'immuno-hématologie, dont la recherche d'anticorps irréguliers (RAI), figuraient au programme du Contrôle de qualité français depuis les années 80 dans le cadre du contrôle d'hématologie. Après sa création en 1994, l'Agence du Médicament avait repris l'organisation de ces opérations d'évaluation externe de la qualité et l'Afssaps qui lui a succédé en 1998 poursuit cette mission.

Les opérations d'immuno-hématologie (RAI, groupeage sanguin) sont groupées, pour des raisons de logistique, avec les opérations d'hématologie. Dans le cadre des opérations pluriannuelles d'hématologie, un échantillon de sérum est adressé aux laboratoires ayant déclaré pratiquer les RAI. Selon leur activité, les laboratoires rendent le dépistage seul ou bien le dépistage et l'identification.

Depuis 1996, les échantillons (2 ml) sont des sérums liquides, d'origine humaine, testés négatifs pour les sérologies virales VIH, VHC et Ag HBS. Ils sont fabriqués industriellement, dilués en sérum AB et prêts à l'emploi.

Les échantillons sont adressés pour contrôle à des experts de l'EFS afin de valider la réponse attendue.

Les réponses des laboratoires sont rendues par l'intermédiaire d'un **bordereau-réponse** qui a évolué régulièrement et permet le recueil, sous forme codée, des techniques, des panels d'hématies et des réponses en dépistage et en identification.

Les comptes rendus individuels sont expédiés en retour aux laboratoires.

## MÉTHODOLOGIE

## BILAN DES 9 DERNIÈRES ANNÉES

### Effectif des laboratoires français concernés :

En 2004, le nombre de laboratoires ayant participé aux opérations de contrôle de RAI est de 2801. Seuls 266 laboratoires, soit 9,5 %, fournissent des réponses pour le dépistage et l'identification.

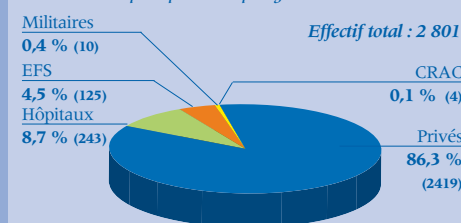
Le tableau I montre une diminution du nombre de laboratoires depuis 1995. On remarque que la réduction est proportionnellement plus importante pour l'identification que pour le dépistage.

Tableau I : Evolution de l'effectif des laboratoires entre 1995 et 2004

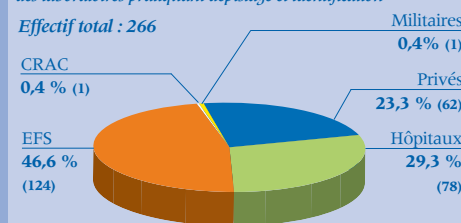
|                | 1995 | 2004 | Evolution en % |
|----------------|------|------|----------------|
| Dépistage      | 3327 | 2801 | - 15,8         |
| Identification | 350  | 266  | - 23,7         |

Les graphes 1 et 2 montrent quelles analyses (dépistage et identification) sont pratiquées en fonction du type de laboratoire.

Graphe 1 : Répartition par activité des laboratoires pratiquant le dépistage



Graphe 2 : Répartition par activité des laboratoires pratiquant dépistage et identification



Les laboratoires ayant répondu pour le dépistage sont, pour plus de 80 %, des laboratoires privés. En revanche, pour les identifications, la moitié des réponses provient des EFS, un quart, des laboratoires privés et le dernier quart, des laboratoires hospitaliers.

### Spécificité des anticorps proposés

Selon les années, un ou plusieurs échantillons ont été envoyés soit un total de 21 entre 1995 et 2004. Les différentes spécificités proposées sont présentées dans le tableau II. L'anticorps le plus souvent soumis au contrôle, seul ou en association, est l'anticorps RH3. Si le choix d'un anticorps se veut le plus souvent pédagogique et diversifié, il est en réalité dicté par les problèmes d'approvisionnement en matière première compte tenu des volumes importants nécessaires pour le CNQ.

Tableau II : Anticorps testés entre 1995 et 2004

| Spécificité des anticorps | Nombre d'échantillons |
|---------------------------|-----------------------|
| Anti-RH1                  | 3                     |
| Anti-RH3                  | 3                     |
| Anti-RH5                  | 1                     |
| Anti-KEL1                 | 3                     |
| Anti-FY1                  | 1                     |
| Anti-FY2                  | 2                     |
| Anti-JK1                  | 1                     |
| Anti-RH1 + Anti-RH3       | 1                     |
| Anti-RH3 + Anti-KEL1      | 1                     |
| Anti-FY1 + Anti-MNS3      | 1                     |
| Absence d'anticorps       | 4                     |

### Résultats des dépistages

Les pourcentages de bonnes réponses en dépistage figurent sur le tableau III.

Tableau III :

Résultats des dépistages positifs entre 1995 et 2004

| Echantillon                  | 95D9      | 96H9                 | 97A9                | 97D9      | 98A9                 |
|------------------------------|-----------|----------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| Spécificité                  | Anti-RH3  | Anti-RH1             | Anti-KEL1           | Anti-RH3  | Anti-RH1             |
| Bonnes réponses en dépistage | 94,6 %    | 99,8 %               | 96,6 %              | 99,2 %    | 99,3 %               |
| Echantillon                  | 98C9      | 98D9                 | 99C9                | 00A9      | 00B9                 |
| Spécificité                  | Anti-KEL1 | Anti-FY1             | Anti-RH3            | Anti-JK1  | Anti-RH3 + anti-KEL1 |
| Bonnes réponses en dépistage | 98,7 %    | 94,5 %               | 99,5 %              | 98,5 %    | 99,3 %               |
| Echantillon                  | 00C9      | 00D9                 | 01C9                | 02A9      | 02B9                 |
| Spécificité                  | Anti-FY2  | Anti-RH1             | Anti-RH1 + anti-RH3 | Anti-KEL1 | Anti-FY2             |
| Bonnes réponses en dépistage | 98,6 %    | 99,7 %               | 99,9 %              | 99,0 %    | 98,5 %               |
| Echantillon                  | 03A9      | 04A9                 |                     |           |                      |
| Spécificité                  | Anti-RH5  | Anti-FY1 + anti-MNS3 |                     |           |                      |
| Bonnes réponses en dépistage | 99,8 %    | 99,4 %               |                     |           |                      |

La moyenne des taux de bonnes réponses (98,5 %) est satisfaisante ; les valeurs extrêmes vont de 94,5 à 99,9 %. Une étude (non parue) réalisée en 1999 à partir des résultats obtenus entre 1981 et 1999 avait montré que le taux de bonnes réponses en dépistage et le titre de l'échantillon étaient significativement dépendants pour les antigènes RH1 et KEL1.

Les taux de bonnes réponses sur les 4 échantillons négatifs en dépistage vont de 98,0 % à 99,7 %.

### Résultats des identifications

Les pourcentages de bonnes réponses en identification figurent sur le tableau IV.

Tableau IV : Résultats des identifications entre 1995 et 2004

| Echantillon                       | 95D9      | 96H9                 | 97A9                | 97D9      | 98A9                 |
|-----------------------------------|-----------|----------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| Spécificité                       | Anti-RH3  | Anti-RH1             | Anti-KEL1           | Anti-RH3  | Anti-RH1             |
| Bonnes réponses en identification | 98,0 %    | 96,9 %               | 95,3 %              | 96,3 %    | 98,4 %               |
| Echantillon                       | 98C9      | 98D9                 | 99C9                | 00A9      | 00B9                 |
| Spécificité                       | Anti-KEL1 | Anti-FY1             | Anti-RH3            | Anti-JK1  | Anti-RH3 + anti-KEL1 |
| Bonnes réponses en dépistage      | 97,4 %    | 96,2 %               | 98,7 %              | 97,0 %    | 97,2 %               |
| Echantillon                       | 00C9      | 00D9                 | 01C9                | 02A9      | 02B9                 |
| Spécificité                       | Anti-FY2  | Anti-RH1             | Anti-RH1 + anti-RH3 | Anti-KEL1 | Anti-FY2             |
| Bonnes réponses en dépistage      | annulé    | 99,3 %               | 98,2 %              | 100 %     | 97,2 %               |
| Echantillon                       | 03A9      | 04A9                 |                     |           |                      |
| Spécificité                       | Anti-RH5  | Anti-FY1 + anti-MNS3 |                     |           |                      |
| Bonnes réponses en dépistage      | 93,7 %    | 95,5 %               |                     |           |                      |

La moyenne des taux de bonnes réponses (97,2 %) est satisfaisante également ; les valeurs extrêmes vont de 93,7 à 100 %. Les résultats de l'échantillon 00C9 ont été annulés en raison d'une imprécision dans le codage initialement prévu. Le taux relativement bas pour l'échantillon 03A9 (93,7 %) s'explique par le fait que les panels d'hématies commerciaux étaient insuffisants pour exclure certains anticorps ; 16 laboratoires avaient rendu un mélange de deux anticorps alors que seul l'anti-RH5 était présent dans le sérum. On constate que le taux de bonnes réponses en identification pour les anticorps proposés plusieurs fois tend à s'améliorer notamment pour les anticorps anti-RH1 et anti-KEL1.

### Réactifs et techniques

Les différentes techniques utilisées en 1995 étaient le test de Coombs (test indirect à l'antiglobuline), le test aux enzymes, les tests d'agglutination en milieu salin et en milieu albumineux. Depuis 2002, suite à l'arrêt du 26 avril 2002 (1), seul le test indirect à l'antiglobuline (TIA) est requis pour le dépistage. Pour l'identification, le test aux enzymes peut être utile voire indispensable en complément du TIA.

L'ensemble des réactifs cités par les participants montre que le TIA et le test aux enzymes étaient les techniques utilisées de façon prépondérante dans la réalisation des RAI en dépistage en 1996 (tableau V).

Tableau V : Répartition des techniques utilisées en 1996

| Technique                                 | Effectif |
|---|----------|
| Test indirect à l'antiglobuline           | 42,7 %   |
| Test aux enzymes                          | 39,9 %   |
| Test d'agglutination en milieu salin      | 3,3 %    |
| Test d'agglutination en milieu albumineux | 1,8 %    |
| Autres ou non précisé                     | 12,3 %   |

Le TIA et le test aux enzymes sont mis en oeuvre soit de façon traditionnelle (agglutination en tube) soit avec les procédés de filtration ou d'immuno-adhérence. Les techniques utilisant la filtration ou l'immuno-adhérence, déjà majoritaires en 1996, ont vu leur utilisation augmenter jusqu'en 2001 (tableau VI). En 2004, elles sont employées de façon quasi exclusive. En effet l'arrêt de 2002 prévoit « la mise en oeuvre d'un test indirect à l'antiglobuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter, sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale. »

Tableau VI : Evolution de l'utilisation des techniques de dépistage entre 1996 et 2004

|                               | 1996   | 2001   | 2004   |
|-------------------------------|--------|--------|--------|
| TIA                           |        |        |        |
| Filtration / immuno-adhérence | 87,0 % | 96,7 % | 99,9 % |
| Techniques traditionnelles    | 13,0 % | 3,3 %  | 0,1 %  |
| Test aux enzymes              |        |        |        |
| Filtration / immuno-adhérence | 89,9 % | 97,3 % | -      |
| Techniques traditionnelles    | 10,1 % | 2,7 %  | -      |

Le désintérêt pour les techniques traditionnelles, justifié par leur difficulté de mise en oeuvre et de lecture, est renforcé par le fait que ces techniques montrent un taux de mauvaises réponses en dépistage toujours supérieur à celui des techniques par filtration et immuno-adhérence (tableau VII). Les techniques en filtration sont de loin les plus utilisées, les techniques en immuno-adhérence ne représentant que 1 % des réactifs cités par les laboratoires.

Tableau VII : Pourcentage de mauvaises réponses en dépistage selon les techniques entre 1996 et 1999

|                               | 96H9  | 97A9   | 97D9  | 98C9  | 98D9   | 99C9  |
|-------------------------------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|
| Techniques traditionnelles    | 5 %   | 14,2 % | 7,2 % | 6,7 % | 11,0 % | 3,5 % |
| Filtration / immuno-adhérence | 0,8 % | 3,2 %  | 1,5 % | 1,2 % | 1,2 %  | 0,7 % |

Sur l'ensemble des réponses erronées rendues pendant ces 9 années, une part est attribuable à des erreurs de transcription, de codage, voire d'échantillon. Quant à l'erreur analytique, elle peut relever de causes telles que l'oubli ou la distribution défectueuse d'un élément de la réaction, l'utilisation d'un panel d'hématies vieilles ou mal conservées...

### Panels d'hématies

Depuis 1998, les laboratoires précisent la nature des hématies qu'ils utilisent pour le dépistage et l'identification. En 2004, 23 panels commerciaux ont été relevés pour le dépistage et 9 pour l'identification.

## CONCLUSION

Avec des moyennes de taux de bonnes réponses de 99 % en dépistage et de 97 % en identification, le bilan de ces 9 années d'évaluation externe de la qualité des RAI est satisfaisant. Des spécificités variées, uniques ou associées, ont été proposées permettant de couvrir l'ensemble des anticorps les plus fréquemment rencontrés. Le nombre de laboratoires tend à diminuer tant pour le

dépistage que pour l'identification et actuellement moins de 10 % des laboratoires pratiquent dépistage et identification. L'utilisation prépondérante de la technique en filtration représente l'évolution technique majeure, en raison de ses avantages techniques et de la réglementation (1) qui en promeut l'usage. Cette technique est en effet mentionnée dans 99 % des réponses au CNQ. L'automatisation de ces

techniques est un progrès supplémentaire et devra être prise en compte dans les réponses au CNQ.

(1) Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale - annexe générale - C. - Cas particulier des bonnes pratiques de laboratoire en immuno-hématologie érythrocytaire