

Validation analytique de l'ImmunoCAP 250 (Sweden Diagnostics)

E. Cavalier¹, A. Carlisi, J.-P. Chapelle

Service de chimie médicale, CHU de Liège, Belgique

Résumé:

La société Sweden Diagnostics a récemment mis sur le marché l'ImmunoCAP 250, automate permettant de réaliser le dosage des IgE totales et spécifiques. Nous avons évalué les caractéristiques analytiques de cet appareil et dosé 149 échantillons positifs sur Unicap 100 pour 12 allergènes différents et 30 échantillons de concentration différente en IgE. La précision intra-et inter-série est bonne, avec un CV inférieur à 10 %, sauf pour des IgE spécifiques d'un allergène (venin de guêpe) à faible concentration (0,80 kU_A/L) où elle est inférieure à 15 %, toujours en accord avec les guidelines du NCCLS. La limite de détection est de 0.01 kU_A/L pour les IgE spécifiques et de 0,35 kU/L pour les IgE totales. La méthode est linéaire jusqu'à 5 000 kU/L pour les IgE totales et au moins 80 kU_A/L pour les IgE spécifiques. Le résultat du test de surcharge réalisé avec le standard international WHO 75/502 est compris entre 85 et 115 %, avec une moyenne de 103 %. Le coefficient de corrélation entre les deux appareils est de respectivement 0,9866 et 0,9984 pour les IgE spécifiques et totales. L'ImmunoCAP 250 est une très bonne solution pour les laboratoires qui réalisent annuellement entre vingt et trente mille déterminations.

Mots clés: allergie, automate, validation, ImmunoCap®

Abstract: A new automate, ImmunoCAP 250 has recently been released by Sweden Diagnostics for the determination of specific and total IgE. We have evaluated its analytical performances (intra- and inter-assay precision, linearity, recovery and sensibility) and compared the results obtained by Unicap 100 on 149 samples positive for 12 different allergens and 30 samples containing different concentrations of total IgE. Intra- and inter-assay precision are less than 10% excepted for the specific IgE of one allergen (i3, common wasp), but still in accordance with the NCCLS guidelines. The sensibility is 0.01 kU_A/L for specific and 0.35 kU/L for total IgE. The method is linear up to 5000 kU/l for total and at least 80 kU_A/l for specific IgE. The recovery test showed a recovery of the International standard WHO 75/502 between 85 and 115%, with a mean of 103%. The correlation coefficient between the ImmunoCAP 250 and Unicap 100 is 0.9866 and 0.9984 for specific and total IgE respectively. ImmunoCAP 250 is a good solution for laboratories that perform twenty to thirty thousand determinations.

Key words: allergy, automate, evaluation, ImmunoCap®

L'ImmunoCAP 250 est un automate qui permet de réaliser le dosage des IgE spécifiques et totales dans le sérum, récemment mis sur le marché par la société Sweden Diagnostics (Uppsala, Suède). Cet appareil, qui arrive presque dix ans après le lancement de l'Unicap 100, vient combler le vide entre celui-ci et l'Unicap 1000 (mis sur le marché en 2001) et permet, grâce à grande capacité de travail et de gestion, le remplacement dans notre laboratoire de trois Unicaps 100. La possibilité de stocker les réactifs à bord, le chargement continu des échantillons et sa capacité de travail en font un appareil de choix pour des laboratoires qui, comme le nôtre, réalisent 25 000 dosages d'IgE spécifiques et 8 000 dosages d'IgE totales par an. Nous avons évalué ses caractéristiques analytiques et redosé des échantillons sanguins que nous avons trouvés positifs avec l'Unicap 100, appareil que nous utilisons en routine dans notre laboratoire.

Matériel et méthodes

Échantillons

Les échantillons de sérum que nous avons analysés ont été prélevés chez des patients provenant des consultations d'allergologie, de pédiatrie et de dermatologie que nous recevons quotidiennement. Nous avons étudié plus particulièrement les IgE dirigées contre 10 allergènes en raison de leur fréquence particulièrement haute chez les patients atopiques : il s'agit de dl (acarien), el (chat), e5 (chien), f1 (blanc d'œuf), f2 (lait de vache), f13 (arachide), il (abeille), i3 (guêpe), m5 (*Candida albicans*) et t3 (pollen de bouleau) ainsi que 2 mixtures d'allergènes : gx3 (mixture de graminées) et wx6 (mixture d'herbacées).

ImmunoCAP 250

L'ImmunoCAP 250, automate dédié aujourd'hui uniquement à l'allergie, dispose, conservés à 4 °C, de 178 kits d'allergènes différents et peut être chargé de 5 racks de 10 échantillons sériques au maximum. Sa cadence maximale est de 60 résultats/heure. Le principe de fonctionnement est le suivant : le logiciel de l'automate interroge l'informatique centrale du laboratoire (en mode bidirectionnel) pour déterminer la liste des analyses à réaliser ou le technicien encode celle-ci manuellement. Ensuite la machine prélève 40 µL de sérum qu'elle dépose dans l'immunocap, un dispositif qui contient une éponge de polymère hydrophile flexible sur laquelle les allergènes ou le mélange d'allergènes sont couplés de manière covalente. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, les IgE non fixées à l'allergène sont éliminées et le conjugué (un anticorps anti-IgE greffé avec de la β -galactosidase) est ajouté. Après 24 minutes d'incubation, le surnageant est éliminé par aspiration et le substrat (Méthyl-umbelliféryl- β -D-galactoside) est déposé dans l'immunocap. Suit une incubation de 9 minutes, l'ajout d'une solution qui arrête la réaction enzymatique et lecture de la fluorescence générée par le produit de la dégradation enzymatique, la méthyl-umbelliférone, qui est proportionnelle à la concentration des IgE dans le sérum.

La concentration des IgE spécifiques est exprimée en unité de masse de protéine IgE par litre, où $1 \text{ kU}_A/\text{L} = 0.994 \text{ kU/L}$, 1 unité (U) de protéine IgE étant définie par le standard international WHO 75/502 comme correspondant à 2,42 ng. Les courbes de calibration (IgE humaines en milieu tampon) vont de 0 à 100 kU_A/L pour les IgE spécifiques et de 2 à 5 000 kU/L pour les IgE totales.

Résultats

Répétabilité et reproductibilité

La reproductibilité intra-série a été déterminée pour 4 allergènes (d1, e1, i3, t3) et pour les IgE totales sur 20 réplicats (*tableau 1*). Les coefficients de variation sont inférieurs à 10 % sauf pour le taux faible en i3 (0,80 kU_A/L) où le coefficient a atteint 13 %. La reproductibilité inter-série a été étudiée sur 5 niveaux, en 10 jours différents répartis sur trois mois. Tous les CV sont inférieurs à 10 % (*tableau 2*).

Limite de détection

La limite de détection a été déterminée en passant 20 fois le standard zéro. On calcule ensuite la moyenne des unités relatives (RU) obtenues et l'écart-type. La limite de détection est obtenue en extrapolant sur la courbe de calibration la moyenne + 3 écarts-types. Pour les IgE spécifiques, elle est de 0,01 kU/L et pour les IgE totales de 0,35 kU/L .

Linéarité valeurs théoriques/valeurs observées

Sept dilutions successives, de moitié en moitié, ont été effectuées sur des échantillons de valeur élevée, soit 4 873 kU/L en IgE totales et 85,3 kU_A/L d'IgE anti-fl. Nous constatons que les résultats obtenus (y) sont en corrélation avec le facteur de dilution (x) pour les deux dosages. Les équations sont : $y = 5020,2 x + 62,79$ pour les IgE totales et $y = 86,741 x + 2,2092$ pour les IgE spécifiques anti-fl.

Tableau 1: Reproductibilité intra-série.

Allergène	Nombre d'essais	Moyenne	Écart-type	CV (%)
d1	20	8,9 kU_A/L	0,3 kU_A/L	3,4
e1	20	17,2 kU_A/L	1,6 kU_A/L	9,2
i3	20	0,80 kU_A/L	0,10 kU_A/L	12,9
t3	20	51,5 kU_A/L	2,7 kU_A/L	5,2
IgE totales	20	60 kU/L	1,2 kU/L	2,0
IgE totales	20	365 kU/L	12,4 kU/L	3,4

Tableau 2: Reproductibilité inter-série.

Allergène	Moyenne	Écart-type	CV (%)
d1	1,37 kU _A /l	0,09 kU _A /l	6,9
d1	9,73 kU _A /l	0,51 kU _A /l	5,2
e1	15,5 kU _A /l	1,18 kU _A /l	7,6
ex1	25,8 kU _A /l	1,29 kU _A /l	5,0
t3	55,9 kU _A /l	2,71 kU _A /l	4,9
IgE totales	61 kU/l	1,6 kU/l	2,7
IgE totales	383 kU/l	13 kU/l	3,4

Test d'enrichissement avec un standard international

Ce test a été effectué par ajout dosé de quinze quantités connues d'IgE (2° Standard International NIBC/WHO code 75/502) allant de 7 à 2 500 kU à un pool de sérums de faible concentration en IgE totales. Les résultats obtenus montrent que la linéarité de la méthode est excellente, car la différence moyenne entre les valeurs mesurées et les valeurs attendues en milieu sérique est de 1,5 % (extrêmes : 11,6% ; - 4,4 %) avec un coefficient de corrélation de 0,9997. L'équation de la droite de régression est y (valeurs observées) = 0,9448 x (valeurs attendues) + 5,8323.

Pour déterminer la linéarité dans des valeurs plus basses, le test a également été réalisé en effectuant cinq ajouts dosés de quantités connues allant de 10 à 0,5 kU d'IgE au diluant fourni par la société. La linéarité dans les valeurs les plus basses reste excellente avec une différence moyenne de 4,8 % (extrêmes : 0,6 % ; 10 %) et un coefficient de corrélation de 0,9988. L'équation de la droite de régression est y (valeurs observées) = 0,9409 x (valeurs attendues) + 0,0606.

Test de surcharge

Le pourcentage de récupération est déterminé en ajoutant en parallèle dans le point zéro de la courbe et dans un échantillon sérique une faible concentration de standard international (1, 2, 5 et 10 kU). On dose avant et après ajout dans les deux milieux. Les résultats montrent que les pourcentages de récupération sont compris entre 85 et 115%. La récupération moyenne est de 103 %

Comparaison des résultats obtenus avec les deux appareils

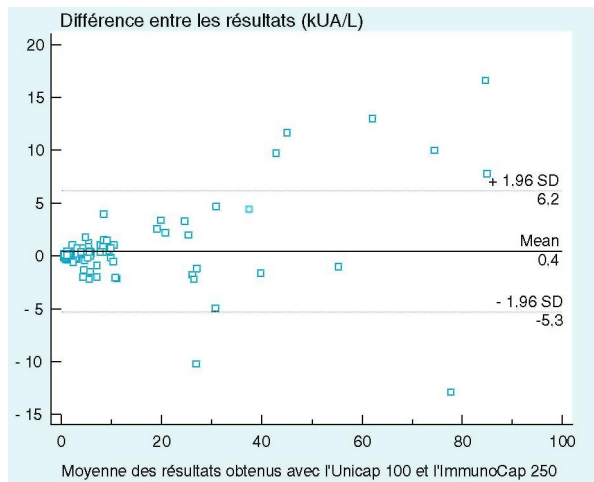
IgE spécifiques

Nous avons comparé les résultats de 149 échantillons sériques positifs pour 12 allergènes différents, dont certains hautement impliqués dans des réactions invasives, comme il, i3, fl3 et fl1. Globalement, le diagramme de Bland-Altman montre une différence moyenne de 0,4 kUA/L ainsi qu'une légère tendance pour l'Unicap 250 à trouver des valeurs plus élevées pour des échantillons fortement positifs (*figure 1*). La droite de régression a pour équation y (U250) = 0,9138 x (U100) + 0,314 avec un r de 0,9866 dont l'intervalle de confiance est (0,9815-0,9903); $p < 0,001$. Quand on analyse les données allergène par allergène, on se rend compte qu'aucun test spécifique positif sur l'Unicap 100 n'a été retrouvé négatif par le 250 et ce même pour les valeurs proches du cut-off. Cependant, quelques échantillons négatifs, mais ayant des RLU relativement plus élevées, ont été retrouvés positifs avec le 250.

IgE totales

Nous avons comparé les résultats de 15 échantillons sériques dont les taux en IgE totales sont normaux ainsi que 15 échantillons pathologiques. Les valeurs observées sont distribuées entre 2 et 1 963 kU/L. La droite de régression globale a pour équation y (U250) = 0,9765 x (U100) + 12 avec un r de 0,9984 dont l'intervalle de confiance est (0,9966-0,9992) ; $p < 0,001$. Il faut cependant noter que dans les valeurs < 100 kU/L, l'ImmunoCAP 250 dose significativement plus haut que l'Unicap 100 alors que ce n'est pas le cas dans les valeurs plus élevées. Le graphique de Bland et Altman montre qu'avec l'ImmunoCAP 250, les valeurs basses sont en moyenne de l'ordre de 30 % supérieures à celles observées sur l'Unicap 100.

Figure 1: Comparaison des deux automates selon la représentation de Bland-Altman. Les intervalles de confiance de la différence entre les deux machines sont représentés par les lignes pointillées.



Discussion

Cette étude a pour but de comparer l'Unicap 100 avec l'ImmunoCAP 250 dans le cadre de son accréditation selon la norme EN 17025. Les résultats de l'étude de précision sont conformes aux recommandations publiées par le National committee for clinical laboratory Standards (NCCLS), à savoir un CV intra-essai inférieur à 10 % et un CV inter-essai inférieur à 15 % [1]. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'Unicap 1000 [2]. La linéarité est excellente, que ce soit dans les valeurs basses ou élevées. Le test de récupération d'une quantité connue de standard international par la méthode des ajouts dosés donne également entière satisfaction, avec une récupération moyenne de 103 %.

La concordance entre les deux appareils est bonne, bien que l'ImmunoCAP 250 donne des résultats un peu plus élevés que l'Unicap 100, qui peuvent devenir positifs alors qu'ils avaient antérieurement été classés comme négatifs. La corrélation pour les IgE spécifiques est identique à ce que De Decker *et al.* ont montré pour 7 allergènes différents [3].

L'ImmunoCAP 250, en plus de ses qualités analytiques, est un appareil facile à utiliser, bien adapté pour les laboratoires qui réalisent entre 20 000 et 30 000 déterminations par an. Le premier résultat est disponible après 108 minutes et ensuite, un résultat sort après chaque minute. En pratique, le chargement de l'appareil en début de journée prend environ une heure. En plus des *curve controls*, nous passons un contrôle interne à deux niveaux en début, milieu et fin de journée. Pour les IgE spécifiques, nous utilisons un contrôle « titré » commercialisé par Sweden Diagnostics et un pool de sérums positifs en dl dont nous avons déterminé la valeur ; au moins un des ces deux contrôles doit se trouver dans la zone *cut-off*, vers 0,50 kU_A/L. L'ImmunoCAP 250 est une amélioration dans le travail de notre laboratoire : par rapport aux 3 Unicap 100 que nous utilisons, nous économisons du temps-technicien, la qualité augmente grâce notamment à la possibilité de garder les Caps à bord (ce qui ne rompt pas la chaîne du froid), et aux qualités analytiques intrinsèques de l'appareil.

Références

1. In : *Division of Clinical Laboratory Devices, Office of Device Evaluation. Review criteria for the assessment of allergen-specific immunoglobulin E (IgE) in vitro diagnostics devices using immunological methods.* Washington : Public Health Service, 2000 : 1-18.
2. Barthet C, Sabbah A, Lewin P. Setup of the Unicap 1000 in a Reference lab specialised in allergy : technical organisation and performances. Abstract book of the XXIII EAACI Congress, Amsterdam, 2004.
3. De Decker L, Zone A, Leborgne M. Evaluation analytique de l' ImmunoCAP 250, nouvel automate d'allergie, Poster Corata 2004 (Paris) sur http://www.corata.org/recueil_paris/posterparisdedecker.htm.