

Évaluation de l'automate Optilite® pour la détermination de l'activité complément total et des dosages des fractions C3 et C4

Evaluation of the Optilite® analyser for determination of total complement activity and C3 and C4 fractions

Benoit Nespola

Hélène Comitogianni

Isabelle Jahn

Joëlle Goetz

Laboratoire d'immunologie, Hôpitaux
Universitaires de Strasbourg, France

Résumé. Le système du complément est composé d'un ensemble de protéines plasmatiques ou membranaires. Les déficits en protéines du complément peuvent être héréditaires ou acquis du fait de la présence d'auto-anticorps ou par consommation. Nous avons évalué les performances analytiques de l'automate Optilite® pour le dosage des fractions C3 et C4 et pour l'évaluation de l'activité complément total. Les CV intra- et inter-séries et les concordances avec les automates utilisés au laboratoire (BNII® et BCT®, Siemens) sont satisfaisantes tout comme la concordance entre les échantillons sériques et plasmatiques. Nous avons également déterminé les valeurs de référence pour les différents paramètres testés dans l'optique d'une utilisation en routine de l'Optilite® au laboratoire.

Mots clés : activité complément total, C3, C4, automate Optilite®, performances analytiques

Abstract. The complement system is composed of a set of plasma or membrane proteins. Complement protein deficiencies can be inherited or acquired, through the presence of autoantibodies or through consumption. We evaluated the analytical performance of the Optilite® analyser for the determination of the C3 and C4 levels and for the evaluation of the total complement activity. The intra- and inter-series CVs were evaluated and have showed satisfactory results, the concordances with analysers currently used in the laboratory (BNII® and BCT®, Siemens) are very good, as is the agreement between the serum and plasma samples. We also determined the reference values for the different parameters tested in view of a routine use of Optilite® analyser in the laboratory.

Key words: total complement activity, C3, C4, Optilite® analyser, analytical performances

Article reçu le 27 mai 2019,
accepté le 21 juin 2019

Le système du complément est composé d'un ensemble de protéines plasmatiques ou membranaires. Il existe trois voies d'activation des protéines du système. La voie classique est activée par des complexes antigène-anticorps, la voie alterne au contact des agents pathogènes ou de cellules tumorales, la voie des lectines par les saccharides de certains pathogènes. La voie finale commune aboutit au complexe

d'attaque membranaire qui forme un pore dans la membrane d'une cellule ou d'un micro-organisme entraînant une lyse osmotique [1].

L'exploration du complément peut être réalisée sur du sérum ou du plasma EDTA, voire plasma citraté. L'exploration de base du système comprend généralement une étude de l'activité complément total (CT) par une méthode hémolytique ou non et un dosage des fractions C3 et C4 situées au carrefour des voies d'activation du système. Le CT est un test fonctionnel explorant la voie classique jusqu'à la formation du complexe d'attaque

Correspondance : B. Nespola
<benoit.nespola@chru-strasbourg.fr>

membranaire. Dans ce travail nous avons évalué la technique non hémolytique CH50 Optilite® commercialisée sur l'automate Optilite® de la société The Binding Site (TBS). L'objectif de ce travail était d'évaluer les performances du réactif CH50 Optilite® dans le contexte d'arrêt de commercialisation du réactif utilisé jusqu'alors au laboratoire pour évaluer l'activité complément total, le réactif Siemens utilisé sur le coagulomètre BCT® (Siemens). Nous avons également évalué les kits de dosage des fractions C3 et C4 distribués par TBS. Ces deux dosages sont actuellement réalisés par néphélométrie sur l'automate BNII® (Siemens) au laboratoire. L'automate Optilite® a été mis à notre disposition pour réaliser ces évaluations. Nous avons étudié la répétabilité, la reproductibilité, la linéarité et la concordance avec les techniques utilisées au laboratoire. Nous avons également déterminé les valeurs de référence sur sérum et sur plasma pour le réactif CH50 Optilite®, celles-ci n'ayant pas été réalisées par le fournisseur sur l'automate Optilite® mais sur l'automate Spaplus® commercialisé également par la société TBS. Les valeurs de références des fractions C3 et C4 ont aussi été déterminées pour les réactifs C3c Optilite® et C4 Optilite®.

Matériel et méthode

Échantillons

Nous avons évalué le réactif CH50 Optilite® sur des prélèvements de 74 patients du service d'immunologie clinique de notre Centre hospitalo-universitaire. L'exploration du complément a été réalisée parallèlement sur sérum et sur plasma. Dans un second temps, le sérum et le plasma de 75 donneurs de sang prélevés à l'Établissement français du sang ont permis de déterminer les valeurs de référence chez l'adulte sur les deux types de matrices. Les sérums ont été prélevés sur tubes secs sans gel séparateur puis centrifugés à 3 500 tours/minute pendant 10 minutes. Après décantation, les sérums ont été rapidement congelés à -20°C . Les plasmas ont été prélevés sur tubes EDTA puis traités de la même manière que les sérums.

Évaluation de l'activité complément total et dosages des fractions C3 et C4 sur Optilite®

Le réactif CH50 Optilite® est destiné à la détermination quantitative *in vitro* de l'activité totale du complément. Des liposomes renfermant de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) miment un micro-organisme. Des anticorps anti-dinitrophényl (DNP) présents dans le réactif vont se fixer sur les groupements DNP à la surface des liposomes et activent le système du complément de l'échantillon à tester. Cette activation du complément lyse les liposomes entraînant la libération de G6PDH qui

réagit avec le NAD et le glucose-6 phosphate du réactif. L'absorbance mesurée est proportionnelle à l'activité complément total de l'échantillon et permet grâce à une courbe de calibration de donner une valeur pour un échantillon [2].

Les fractions C3 et C4 sont dosées par turbidimétrie par les réactifs C3c Optilite® et C4 Optilite®. Un anti-sérum spécifique permet la formation de complexes immuns insolubles. La quantité de lumière transmise est inversement proportionnelle à la concentration de la protéine spécifique à doser.

Résultats

Variations intra- et inter-séries

La variabilité intra-série a été évaluée en passant 10 fois le même échantillon dans la même série. Nous avons réalisé cette répétabilité sur des contrôles de deux fournisseurs différents (TBS et Siemens) ainsi que sur des sérums et des plasmas provenant de donneurs de sang. Les CV obtenus pour la variabilité intra-série figurent dans le *tableau 1*. Ces CV sont identiques à ceux obtenus par le fournisseur et répondent aux limites d'acceptabilité de la Société française de biologie clinique (SFBC) pour les fractions C3 et C4 [3]. Il n'existe pas de limite d'acceptabilité pour l'activité complément total.

La reproductibilité a été déterminée sur des contrôles internes de qualité distribués par TBS, mais également sur des contrôles distribués par deux autres fournisseurs. Celle-ci a été évaluée pendant 35 jours d'utilisation consécutifs. Les résultats sont présentés dans le *tableau 2*. Les CV inter-séries obtenus sur l'Optilite® au laboratoire sont légèrement supérieurs à ceux référencés dans la fiche technique du réactif par TBS ($< 4\%$) et pour les fractions C3 et C4 ne répondent pas toujours aux limites d'acceptabilité de la SFBC et devront être réévalués sur une autre période. Ils sont inférieurs au CV limite fixé au laboratoire (8 %) en l'absence de limites d'acceptabilité définies par des sociétés savantes pour l'activité complément total.

Concordance entre les échantillons plasmatiques et sériques sur l'Optilite®

Nous avons comparé la mesure de l'activité complément total et les dosages du C3 et du C4 réalisés sur le sérum et le plasma de chaque patient. Les courbes de régression linéaire sont présentées *figure 1*. Les coefficients de corrélation r sont respectivement de 0,95 pour le CT, 0,97 pour le C3 et 0,99 pour le C4.

L'approche de Bland-Altman met en évidence quatre résultats discordants pour l'activité complément total entre les échantillons sériques et plasmatiques. Un patient a des

Tableau 1. Coefficients de variation (CV) intra-série de l'activité complément total et des dosages du C3 et du C4 obtenus sur des sérums, des plasmas et des contrôles de qualité.

	CT	C3	C4	Limites SFBC (C3 et C4)
Sérum Bas	1,77	2,18	3,97	6,0
Sérum Moyen	2,37	1,29	0,99	4,5
Sérum Haut	1,28	0,78	0,97	3,8
Plasma Bas	1,56	1,00	1,49	6,0
Plasma Moyen	2,44	1,59	1,02	4,5
Plasma Haut	1,26	1,18	3,47	3,8
TBS Low	1,82	0,60	0,56	4,5
TBS High	2,13	1,44	1,16	3,8
TBS Élevé	0,71			*
Fournisseur 1 Bas	1,87			*
Fournisseur 1 Normal	0,79			
Fournisseur 2 Bas		0,98	1,44	4,5
Fournisseur 2 Normal		1,57	0,88	3,8
Fournisseur 2 Haut		1,38	0,89	3,8

Les CV sont exprimés en pourcentage. * Absence de limites d'acceptabilité.

Tableau 2. Coefficients de variation (CV) inter-série de l'activité complément total et des dosages du C3 et du C4 obtenus sur des contrôles de qualité distribués par différents fournisseurs.

	CT	C3	C4	Limites SFBC (C3 et C4)
TBS Low	5,7	6,9	5,2	6
TBS High	6,3	4,5	5,0	5
TBS Élevé	5,2			**
Fournisseur 1	6,2			**
Fournisseur 2 Bas		7,9	10,4	8
Fournisseur 2 Normal		6,6	7,0	6
Fournisseur 2 Haut		3,9	5,3	5

Les CV sont exprimés en pourcentage. ** Absence de limites d'acceptabilité, CV fixé à 8 % par le laboratoire.

résultats nettement discordants entre les deux matrices : le CT dans le sérum est inférieur à 14 U/mL et a une valeur à 53 U/mL dans le plasma, résultat évocateur d'une activation à froid du système. Il s'agit d'un patient ayant un lymphome non hodgkinien. Les résultats des trois autres patients sont différents au test de Bland-Altman mais cette différence est sans incidence dans l'interprétation biologique. En effet, deux résultats sont légèrement augmentés et un résultat légèrement diminué dans les deux matrices (figure 1).

Deux dosages de C3 sont significativement différents entre le sérum et le plasma, plus élevés dans le plasma mais avec des valeurs comprises dans l'intervalle de référence. Pour le premier patient, le dosage du C3 est de 1,26 g/L dans le plasma et de 0,75 g/L dans le sérum. Le dosage du C4 et

l'activité complément total sont compris dans les valeurs de référence pour les deux matrices. Pour l'autre patient, le dosage est de 0,93 g/L dans le sérum et 1,21 g/L dans le plasma, sans incidence sur l'interprétation du résultat.

Pour le dosage du C4, l'approche de Bland-Altman met en évidence trois résultats discordants entre les échantillons sériques et plasmatiques. Ces trois patients ont des concentrations normales ou augmentées de C4 dans le sérum et le plasma sans impact sur l'interprétation des résultats. Les trois échantillons ont des résultats plus élevés dans le plasma que dans le sérum.

Concordance entre l'Optilite® et le BCT® pour l'évaluation de l'activité complément total et entre l'Optilite® et le BNII® pour les dosages du C3 et du C4

Nous avons comparé l'Optilite® et le BCT® pour la mesure de l'activité complément total sur le sérum de chaque patient. Les deux techniques sont corrélées pour la mesure de l'activité CT avec un coefficient de corrélation r de 0,91 (figure 2). Les dosages du C3 et du C4 entre l'Optilite® et le BNII® sont aussi corrélés (r respectivement de 0,96 pour le C3 et 0,97 pour le C4).

Intervalle de référence

Les intervalles de référence ont été évalués sur 75 sérums et plasmas provenant de donneurs sains adultes (tableau 3). Nous avons adopté ces valeurs de référence au laboratoire.

Étude de la linéarité

Nous avons évalué la linéarité de l'activité CT sur sérum et sur plasma par des dilutions d'un échantillon de titre très élevé en complément total (figure 3). Le domaine de mesure défini par la courbe de calibration s'étend de 14 à 96 U/mL. Cette étude permet de vérifier la linéarité sur l'ensemble de la courbe de calibration.

Les courbes présentées sur la figure 3 montrent des résultats parfaitement comparables entre les valeurs attendues et les valeurs mesurées. Les droites de régression linéaire qui en découlent ont des coefficients de corrélation (R^2) respectivement de 0,998 pour le sérum et 0,997 pour le plasma. Les mesures de l'activité CT sur sérum et plasma sont linéaires sur l'ensemble du domaine de mesure.

Interférences

L'influence de la turbidité des échantillons sur la mesure de l'activité complément total et sur les dosages du C3 et du C4 a été évaluée par surcharge d'un pool de sérum par une solution de Medialipide® à 20 % (émulsion destinée à l'alimentation parentérale à base d'huile de soja et de triglycérides). Nous n'avons pas observé d'interférence de

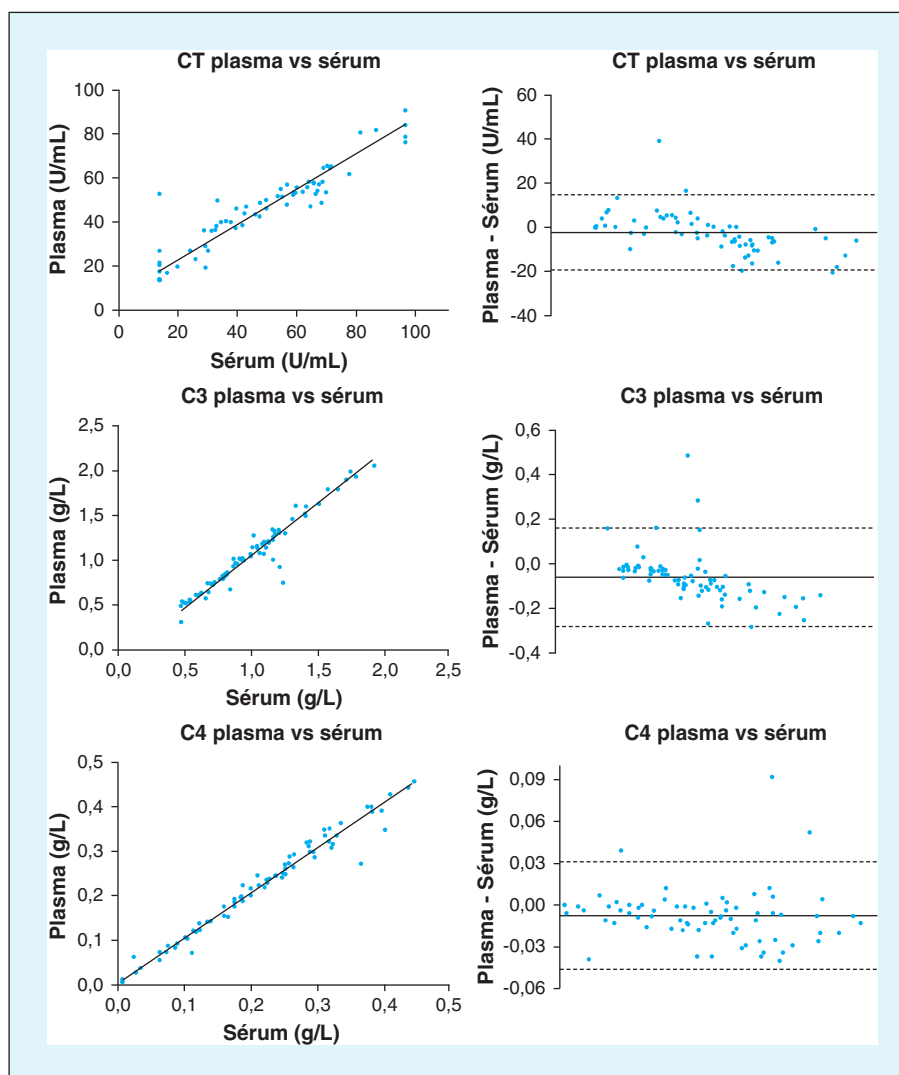


Figure 1. Corrélation entre l'activité complément total, le C3 et le C4 sur sérum et sur plasma sur Optilite® (figures de gauche). Concordance entre l'activité CT, les dosages du C3 et du C4 évaluée sur sérum et sur plasma (approche de Bland et Altman). Chaque point représente la différence entre l'activité CT ou les dosages de C3 et C4 obtenus sur sérum et sur plasma en fonction de la moyenne des activités obtenues sur les deux matrices. La ligne bleue continue est la moyenne des différences obtenues et correspond au biais entre l'activité CT ou les dosages de C3 et C4 sur sérum et sur plasma, les lignes pointillées sont les limites de l'intervalle de confiance à 95 % des différences (figures de droite).

la turbidité pour la détermination de l'activité complément total sérique et jusqu'à 9,4 g/L de triglycérides pour les fractions C3 et C4. Au-delà de cette concentration de triglycérides, une étape de centrifugation à 10 000 g réalisée dans les minutes précédant le dosage permet d'éliminer l'interférence induite par la turbidité d'un sérum lipémique (figure 4).

Contamination inter-échantillons

Pour évaluer la contamination inter-échantillons, nous avons titré trois fois consécutivement un échantillon avec

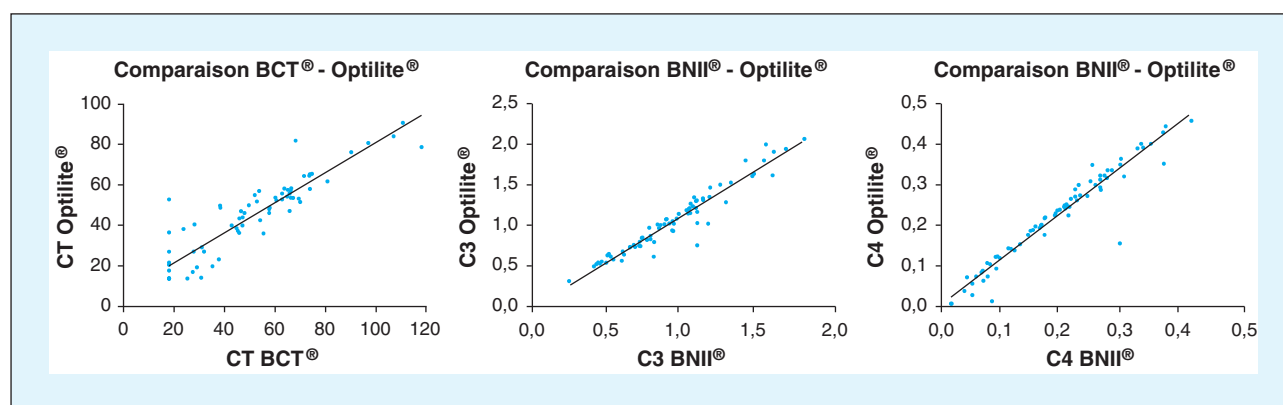
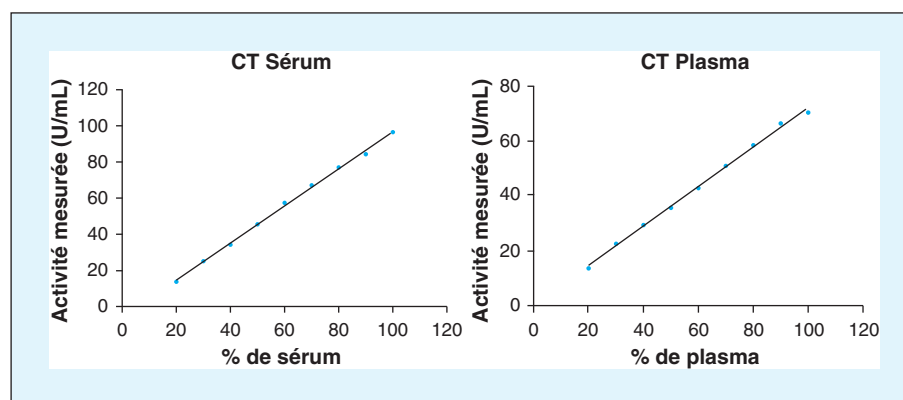
des concentrations élevées de C3 ou de C4 et avec une activité CT augmentée suivi d'un échantillon avec des titres bas qui a également été titré trois fois [4]. Nous n'avons pas mis en évidence de contamination significative (entre 0,4 et 2,4 %) pour les trois paramètres évalués, sur sérum et sur plasma.

Discussion

L'exploration biologique de la cascade du complément est indispensable pour le diagnostic et le suivi de certaines

Tableau 3. Intervalle de référence du CT, du C3 et du C4 sur sérum et sur plasma.

	CT (U/mL)		C3 (g/L)		C4 (g/L)	
	Sérum	Plasma	Sérum	Plasma	Sérum	Plasma
Valeur la plus basse	36,0	30,6	0,86	0,83	0,10	0,10
Valeur la plus haute	81,4	76,9	1,89	1,81	0,43	0,52
Moyenne	59,7	53,4	1,31	1,17	0,25	0,24
Médiane	60,4	52,9	1,32	1,17	0,25	0,23
Déviati on standard	10,4	8,9	0,23	0,22	0,07	0,07
Valeurs de référence	38,2 – 79,2	33,0 – 72,3	0,89 – 1,87	0,85 – 1,80	0,13 – 0,42	0,13 – 0,39

**Figure 2.** Corrélation entre l'activité complément total évaluée sur Optilite® et sur BCT® et entre les dosages du C3 et du C4 sur Optilite® et BNII®.**Figure 3.** Étude de la linéarité de l'activité complément total sur sérum et sur plasma.

pathologies (maladies auto-immunes, glomérulonéphrites, déficits constitutionnels) et le dépistage de déficit en fractions du système du complément. Dans notre laboratoire d'immunologie, l'évaluation de l'automate Optilite® (The Binding Site) pour la mesure de l'activité complément total et le dosage des fractions C3 et C4 montre que les performances de celui-ci en termes de précision, de linéarité et d'absence de contamination inter-échantillons

sont satisfaisantes, aussi bien pour les échantillons de sérum ou de plasma. En vue de l'utilisation de l'automate en routine, les valeurs de référence du complément total, du C3 et du C4, sur sérum et sur plasma, ont été définies chez l'adulte. L'exploration du système du complément sur cet automate est relativement aisée et rapide par rapport à la technique réalisée sur le coagulomètre BCT® (Siemens). Les performances analytiques du réactif CH50 Optilite® et

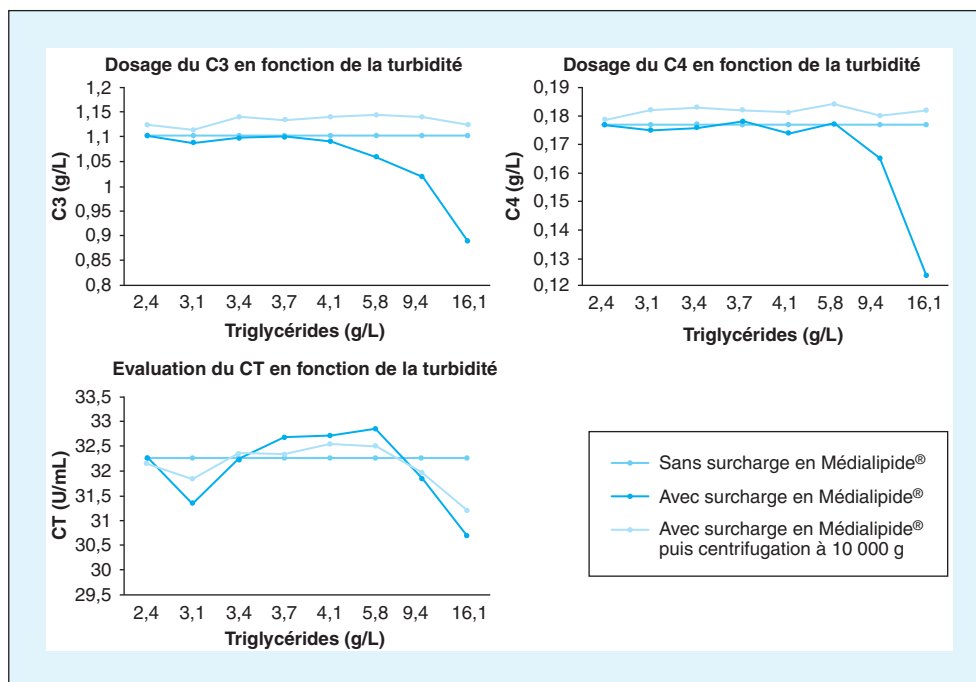


Figure 4. Influence de la turbidité du sérum sur l'évaluation de l'activité complément total et sur les dosages du C3 et du C4 déterminés sur Optilite®. Une concentration de triglycérides supérieure à 9,4 g/L diminue significativement les dosages du C3 et du C4 mais cette diminution est corrigée par une centrifugation préalable des sérums lipémiques 10 minutes à 10 000 g.

des réactifs C3c Optilite® et C4 Optilite® répondent aux attentes d'un laboratoire d'immunologie spécialisé.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Merle NS, Church SE, Fremaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 2015 ; 6 : 262.

2. Yamamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchiyama S, *et al.* Automated homogeneous liposome-based assay system for total complement activity. *Clin Chem* 1995 ; 41 : 586-90.

3. Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Quality specifications and allowable standards for validation of methods used in clinical biochemistry. *Ann Biol Clin* 1999 ; 57 : 685-95.

4. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin* 2010 ; 68 : 247-94.