

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

hGH – PTH – 25 OH Vitamine D	13GPV1	novembre 2013
-------------------------------------	---------------	----------------------

**Hormone de croissance (hGH)
Parathormone (PTH)
25 OH Vitamine D**

Avril 2015

Michèle NOEL (ANSM)

Monique LEBAN (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris)

Opération	13GPV1
Expédition	13/11/2013
Clôture	9/12/2013
Edition des comptes-rendus individuels	13/02/2014
Paramètres contrôlés	hGH, PTH, 25 OH Vitamine D
Echantillons envoyés	GH204, GH205, PTH131, VITD131, VITD132
Nombre de laboratoires concernés*	823
Nombre de laboratoires participants**	798

* Laboratoires ayant déclaré à l'ANSM 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

En 2013, une opération de contrôle de qualité portant sur le dosage de l'hormone de croissance (hGH), de la parathormone (PTH) et de la 25 OH vitamine D a été réalisée. Les laboratoires concernés ont largement participé (participation de 97%).

Lors de cette opération, réalisée en novembre 2013, les échantillons envoyés pour contrôler l'hGH (GH204 et GH205) étaient des pools lyophilisés de sérums natifs. L'échantillon envoyé pour contrôler la PTH (PTH131) était issu d'un pool lyophilisé de sérums natifs surchargé avec le standard international SI 95/646. Les échantillons permettant de doser la 25 OH vitamine D étaient constitués de pools sériques natifs sans surcharge.

Concernant l'hGH, en 2013, toutes les trousse de réactifs utilisées pour doser l'hGH sont désormais étalonnées contre le Standard International SI 98/574, préparation d'hGH recombinante (isoforme 22 kDa). Malgré l'apparition de nouvelles trousse de dosage, les résultats obtenus en 2013 ont confirmé une stabilisation des discordances inter-techniques. L'écart inter-réactif observé avec l'échantillon GH205 est sans doute lié à une interférence.

Concernant la PTH, la dispersion inter-laboratoires inter-techniques est importante, expliquée par l'existence de réactions croisées avec les fragments « non 1-84 » et le manque d'homogénéité des calibrateurs utilisés. Après expression des résultats en multiple de la limite supérieure des valeurs usuelles (selon les recommandations KDIGO 2009), l'écart inter-techniques est légèrement atténué.

Concernant la 25 OH vitamine D, la dispersion inter-laboratoires inter-techniques des résultats obtenus pour les deux échantillons est correcte. La dispersion inter-laboratoires intra-technique est améliorable.

hGH

Echantillons GH204 – GH205

Méthode statistique et expression des résultats

Le traitement statistique des données comporte plusieurs étapes :

- Calcul de la valeur cible : vu le nombre faible de résultats, c'est la médiane (Med), toutes techniques confondues ainsi que la médiane pour la trousse utilisée. Le rapport (R) entre la médiane obtenue pour chaque trousse et la médiane obtenue toutes techniques confondues est calculé.
- Calcul des paramètres estimant la dispersion : coefficient de variation tronqué (CVtr) et espace interquartile. Le CVtr (écart-type / moyenne exprimé en %) est calculé après une troncature à 2 écarts-types, c'est à dire après élimination des valeurs extrêmes en dehors de la moyenne ± 2 écarts-types. L'espace interquartile représente l'intervalle centré sur la médiane qui comprend 50% de l'ensemble des données. Ces paramètres ne sont calculés que si l'effectif est suffisant ($n \geq 3$).
- Calcul du CV intra-réactif médian : cette valeur sépare les réactifs en 2 groupes d'effectifs égaux : la moitié des réactifs présente un CVtr intra-réactif inférieur ou égal au CV médian.
- La comparaison des résultats entre eux est effectuée par des tests non paramétriques adaptés (test de Kruskal Wallis, test de Wilcoxon). Les résultats sont significativement différents si $p < 0,05$.
- Des limites acceptables (LA) sont utilisées pour apprécier les résultats obtenus par chaque laboratoire. Ces limites tiennent compte des performances analytiques des systèmes de dosage présents sur le marché mais également des exigences cliniques. Les LA sont exprimées en % et permettent de délimiter de part et d'autre de la cible (médiane obtenue avec la même trousse) un intervalle à l'intérieur duquel un résultat est considéré comme « acceptable ». La limite acceptable utilisée lors de l'opération 13GPV1 est de 15%.

Définition des échantillons

Deux échantillons lyophilisés ont été envoyés lors de l'opération 13 GPV1. Ils ont été fabriqués à partir de pools sériques natifs non surchargés.

Avant l'envoi, l'expert a vérifié sur 5 flacons, la concentration en hGH, ainsi que la stabilité à 4°C après reconstitution (tableau I). Les résultats ne sont pas statistiquement différents (test de Wilcoxon).

En 2013, la concentration des échantillons se situait à des valeurs proches, d'une part, du seuil utilisé dans le cadre du test d'hypoglycémie à l'insuline utilisé pour définir le déficit en hGH de l'adulte (GH205 – 10 mUI/L) et d'autre part, d'une valeur basse (GH204 - 5 mUI/L).

tableau I : résultats de l'étude de stabilité (dosages effectués par l'expert avec la trousse Access [QE]).

	GH204		GH205	
	résultat à T0	résultat à T96 heures	résultat à T0	résultat à T96 heures
Médiane (mUI/L)	4,9	5,2	9,2	9,1

Réactifs utilisés

La répartition des trousses de réactifs utilisées lors de l'opération 13GPV1 est donnée dans le tableau II. La figure 1 illustre la répartition des trousses de dosage utilisées. Les 10 trousses utilisées sont toutes des techniques immunométriques à deux sites (méthode « sandwich ») qui utilisent :

- un traceur radioactif pour quatre d'entre elles : Irma BRAHMS [AM] ; Irma DIASORIN [B9] ; RIACT IBA CIS bio [BN] ; Irma BECKMAN, [BO],
- un traceur non isotopique pour les six autres : AIA TOSOH [DL] ; Access BECKMAN [QE] ; Elecsys ROCHE [RD] ; Immulite SIEMENS [SA] ; Isys IDS [SC] ; Liaison DIASORIN [S8]. Ces dernières sont automatisées.

Au total, 12,7% des laboratoires ayant dosé l'hGH lors de l'opération 13GPV1 utilisent une technique avec traceur radioactif, confirmant la diminution progressive du nombre d'utilisateurs des techniques isotopiques amorcée depuis 2000 (30,7% en 2008, 20% en 2010 et en 2011, 14,7% en 2012). Cinq trousses dont 4 utilisant une technique avec marqueurs radioactifs sont très peu utilisées (moins de 5 utilisateurs).

En 2013, toutes les trousses de réactif sont standardisées sur le Standard International : SI 98/574, une préparation d'hGH recombinante (isoforme 22 kDa)

figure 1 : répartition des trousse de dosage utilisées pour doser l'hGH lors de l'opération 13GPV1.

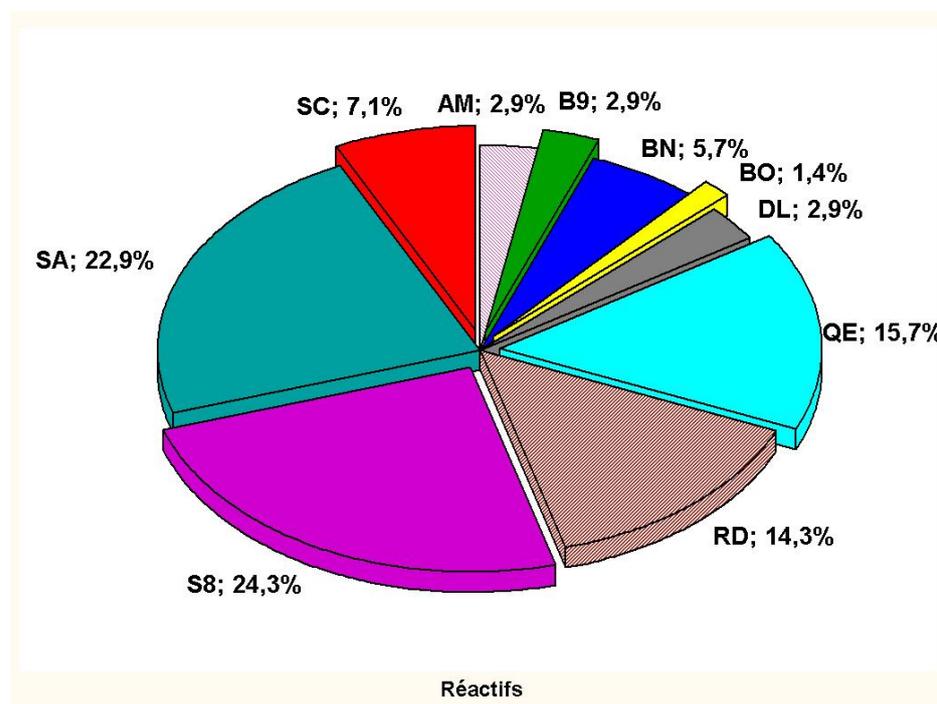


tableau II : réactifs utilisés pour doser l'hGH lors de l'opération 13GPV1.

Code	technique	trousse, distributeurs	Nombre d'utilisateurs
			13GPV1
AM	isotopique	IRMA, BRAHMS	2
B9		CTK-IRMA, DIASORIN	2
BN		RIACT, IBA CIS bio	4
BO		IRMA GH, BECKMAN	1
DL	non isotopique	AIA Pack / STAT AIA Pack, TOSOH	2
QE		Access, BECKMAN	11
RD		Cobas, ROCHE	10
S8		Liaison, DIASORIN	18
SA		Immulite, SIEMENS	16
SC		Isys, IDS	5

Résultats des participants

Le dosage de cet analyte a été réalisé par 8,9% des participants. Le nombre de laboratoires ayant rendu des résultats est en légère diminution depuis 2009.

Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 13GPV1 sont donnés dans le tableau III et sur la figure 2.

Pour l'échantillon GH204 de concentration proche de 5 mUI/L (la médiane toutes techniques est de 6,0 mUI/L) deux résultats aberrants ont été exclus des calculs statistiques. La dispersion inter-laboratoires inter-réactifs est en légère détérioration par rapport aux résultats obtenus en 2009 (2009 : 11,8% versus 2013 : 14,6%).

Les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Pour les trousse avec plus de 2 utilisateurs, la trousse Access BECKMAN [QE] donne des résultats statistiquement plus bas que ceux obtenus par les trousse Isys IDS [SC], Immulite SIEMENS [SA] et Cobas ROCHE [RD].

L'écart entre la médiane de la trousse donnant les résultats les plus hauts Cobas ROCHE [RD] et celle donnant les résultats les plus bas Access BECKMAN [QE] est de 37% (expression en % par rapport à la médiane toutes techniques), stable en regard du résultat obtenu en 2009 (39%).

Les trousse utilisées présentent une précision correcte avec des CV inter-laboratoires intra-réactif inférieurs à 10%. La valeur médiane des CV inter-laboratoires intra-réactif est de 7,4%, en amélioration par rapport au résultat de 2009 (8,1%).

Pour l'échantillon GH205, les résultats obtenus avec les réactifs DIASORIN Irma [B9] et Liaison [S8], très éloignés des résultats obtenus avec les autres trousse ont été exclus du calcul de la médiane toutes techniques. Cette discordance est très probablement liée à une interférence.

Les trousse utilisées présentent une précision correcte avec des CV inter-laboratoires intra-réactif inférieurs à 10%. La valeur médiane des CV inter-laboratoires intra-réactif est de 5,9%, proche du résultat de 2012 (5,6%).

tableau III : résultats d'hGH obtenus lors de l'opération 13GPV1 (résultats exprimés en mUI/L).

code	distributeur	Réactif	N	Ntr	Med (mUI/L)	R (%)	Interquartile (mUI/L)	Min (mUI/L)	Max (mUI/L)	Mtr (mUI/L)	CVtr (%)
GH204											
		Toutes techniques	68	65	6,00	100	5,2 - 6,7	2,90	22,80	5,97	14,62
AM	DIASOURCE	hGH IRMA	2	2	3,70	62	NC	3,70	3,70	3,70	
B9	DIASORIN S.A.	HGH-CTK IRMA	2	2	5,95	99	NC	5,90	6,00	5,95	
BN	CISBIO	hGH-RIACT	4	4	5,70	95	5,4 - 6,1	5,40	6,20	5,75	7,17
BO	BECKMAN COULTER	IRMA GH (Immunotech)	1	1	4,90	82	NC	4,90	4,90	4,90	
DL	TO SOH Biosciences	AIA Pack hGH / Stat AIA Pack	2	2	6,30	105	NC	5,90	6,70	6,30	
QE	BECKMAN COULTER	Access Ultrasensitive hGH	11	10	4,80	80	4,6 - 4,9	3,70	6,70	4,65	8,06
RD	ROCHE	hGH Cobas	10	10	7,00	117	6,8 - 7,4	6,60	7,60	7,07	4,90
S8	DIASORIN S.A.	Liaison hGH	15	15	5,40	90	5,1 - 5,5	2,90	22,80	5,33	8,17
SA	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	Immulate - Immf000 / Immulite 2000-2000Xpi	16	15	6,39	107	6,1 - 6,8	5,40	7,70	6,38	7,68
SC	IDS	hGH Isys	5	5	6,50	108	6,2 - 6,55	6,10	6,80	6,43	4,39
GH205											
		Toutes techniques	50	47	9,60	100	9,1 - 10,1	3,40	27,80	9,71	6,89
AM	DIASOURCE	hGH IRMA	2	2	8,15	85	NC	7,30	9,00	8,15	
B9	DIASORIN S.A.	HGH-CTK IRMA	2	2	27,60	288	NC	27,40	27,80	27,60	
BN	CISBIO	hGH-RIACT	4	4	9,45	98	9,0 - 9,9	8,90	10,10	9,48	5,99
BO	BECKMAN COULTER	IRMA GH (Immunotech)	1	1	7,10	74	NC	7,10	7,10	7,10	
DL	TO SOH Biosciences	AIA Pack hGH / Stat AIA Pack	2	2	9,70	101	NC	9,70	9,70	9,70	
QE	BECKMAN COULTER	Access Ultrasensitive hGH	11	11	9,20	96	9,6 - 4,8	8,20	10,30	9,23	5,88
RD	ROCHE	hGH Cobas	10	10	10,55	110	10,2 - 10,8	9,80	11,10	10,52	3,74
S8	DIASORIN S.A.	Liaison hGH	16	16	23,95	250	22,6 - 25,2	5,70	26,60	23,94	6,37
SA	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	Immulate - Immf000 / Immulite 2000-2000Xpi	15	14	9,50	99	9,3 - 10,1	3,40	11,20	9,63	4,20
SC	IDS	hGH Isys	5	5	9,30	97	8,8 - 9,6	7,73	9,60	9,01	8,71

N : nombre de valeurs traitées

Ntr : nombre de valeurs restant après élimination de celles situées au-delà de 2 écarts-types de part et d'autre de la moyenne

Med : médiane

R : rapport entre la médiane par trousse et la médiane toutes techniques confondues

Interquartile : intervalle centré sur la médiane comprenant 50% de l'ensemble des données.

Min : minimum

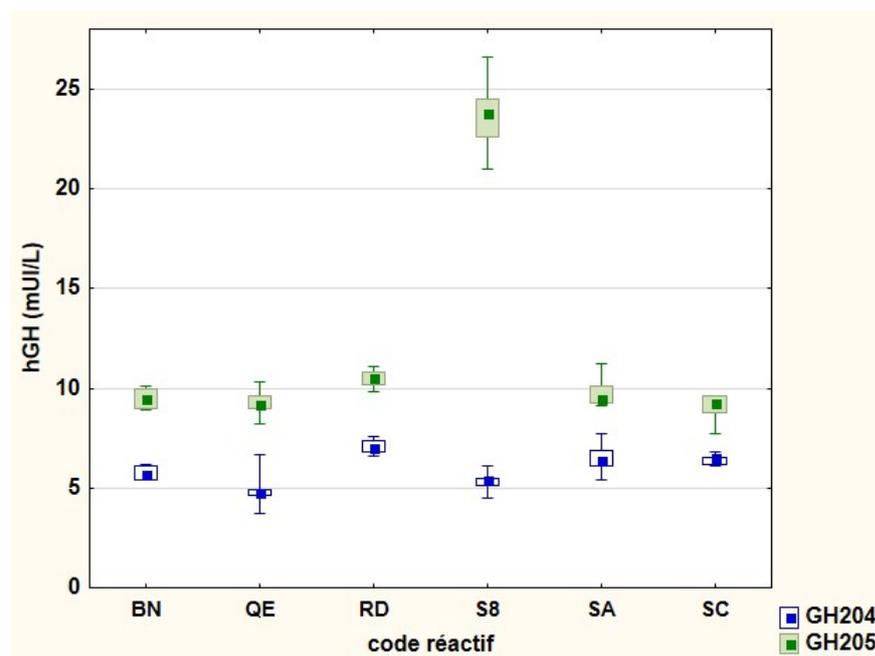
Max : maximum

Mtr : moyenne arithmétique calculée à partir de Ntr

CVtr : coefficient de variation calculé à partir de l'effectif tronqué (voir paragraphe méthode statistique).

NC : non calculé

figure 2 : diagramme « boîte et moustaches » des résultats obtenus lors de l'opération 13GPV1 pour l'hGH avec les réactifs les plus utilisés (n > 3). Les boîtes représentent l'espace inter-quartile (percentile 75 – percentile 25) ainsi que la position de la médiane (point), les « moustaches » positionnent les percentiles 5 et 95.



	Trousses, distributeurs
BN	hGH-RIACT, IBA CISbio
QE	Access hGH, BECKMAN COULTER
RD	hGH Cobas, ROCHE
S8	Liaison hGH, DIASORIN
SA	Immulite, SIEMENS
SC	Isys hGH, IDS-ISYS

Evolution des « connaissances » en 2013.

Lors des opérations du Contrôle national de qualité effectuées depuis 2005, les biologistes doivent préciser : le standard international, l'unité et le facteur de conversion utilisés habituellement pour le rendu des résultats.

L'analyse des réponses montre que tous les résultats sont exprimés par rapport au standard international SI 98/574. De plus, les laboratoires suivent majoritairement les recommandations SFBC (1) avec 47 laboratoires soit 66,2% exprimant strictement leurs résultats en mUI/l du SI 98/574. Pour 6 laboratoires soit 8,4%, le rendu des résultats se fait en mUI/l et en ng/ml du SI 98/574. Enfin, pour les laboratoires rendant uniquement leurs résultats en ng/ml, un laboratoire utilise un facteur de conversion incorrect et cinq n'ont pas répondu.

Rappelons que le standard international SI 98/574, constitué d'hGH recombinante (isoforme 22 kDa), a une activité biologique de 3 μ UI/ng (2). Pour toutes les trousse étalonnées contre le SI 98/574, seul le facteur de conversion indiqué par l'OMS, c'est à dire 3, doit être utilisé pour passer des ng aux μ UI.

Commentaire

Pour l'échantillon GH205, les résultats obtenus avec les réactifs DIASORIN Irma [B9] et Liaison [S8], très éloignés des autres résultats, ont été exclus du calcul de la médiane et de la moyenne tronquée toutes techniques (cf. paragraphe méthode statistique). La « hiérarchie » des médianes intra-technique observée pour cet échantillon est différente de celle obtenue pour l'échantillon GH204 et de celle habituellement observée.

Schématiquement, les valeurs médianes obtenues avec les réactifs commercialisés par DIASORIN (Liaison [S8] et IRMA [B9]) sont habituellement basses, proches de celles obtenues avec le réactif Access BECKMAN [QE].

Cette modification du comportement des trousses DIASORIN pour un seul des échantillons envoyés en 2013, exclut une modification de la calibration des réactifs DIASORIN. Une explication envisageable est l'existence d'une interférence augmentant pour l'échantillon GH205, les résultats des techniques DIASORIN.

La présence de Pegvisomant dans un ou plusieurs sérums ayant servi à la fabrication de l'échantillon GH205 constitue l'hypothèse la plus probable.

Rappelons que le Pegvisomant (SOMAVERT®), GH synthétique sur laquelle des molécules de polyéthylène glycol (PEG) ont été greffées, est un antagoniste de la GH utilisé dans le traitement de l'acromégalie. Cette molécule peut interférer avec certaines techniques de dosage de GH et, selon la concentration de Pegvisomant et le pourcentage de réaction croisée de la technique de dosage utilisée, induire des élévations ou des diminutions de la concentration mesurée de GH. Cette molécule est connue pour interférer positivement avec le réactif Liaison.

Fin 2013, les 10 trousses de dosage utilisées en France sont calibrées contre le SI 98/574. Le standard international utilisé pour la calibration de la trousse utilisée est connu de tous les laboratoires.

En termes de rendu de résultats, 23,2% des laboratoires rendent leurs résultats uniquement en « ng/ml ». Rappelons que la recommandation émise par la SFBC de rendre les résultats en « mUI/l » est toujours d'actualité (1). De même, le seuil définissant le déficit en GH de l'enfant est toujours de 20 mUI/l (arrêté du 24 janvier 1997). Il faut toutefois noter que le récent consensus international sur le dosage d'hGH et d'IGF-I recommande un rendu des valeurs d'hGH en ng/ml à condition que les trousses soient toutes calibrées contre le standard SI 98/574 (3). Dans le cadre du déficit en hormone de croissance chez l'enfant, un rendu des résultats en ng/ml nécessiterait de redéfinir les seuils diagnostiques et thérapeutiques, l'ancien seuil de « 10 ng/ml » n'étant plus adapté.

Bibliographie

1. BAYLE M et al (Groupe de travail SFBC de la section « Evaluation des dosages des paramètres de l'axe somatotrope »). Recommandations pour l'harmonisation des techniques de dosage sérique d'hormone de croissance. Ann. Biol. Clin., 2004, 62, 155–163.
2. BRISTOW AF International standards for growth hormone. Horm Res 1999, 51(suppl 1), 7-12.
3. CLEMMONS D Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. Clinical Chemistry, 2011, 57, 555-559.

PTH

Echantillon PTH131

Méthode statistique et expression des résultats

L'analyse statistique comporte les étapes suivantes :

- Exclusion des valeurs aberrantes très éloignées des autres résultats correspondant à des erreurs grossières.
- Calcul de la valeur cible (moyenne tronquée, Mtr) sur l'ensemble des résultats et pour chaque réactif : la moyenne est obtenue après une double troncature à 2 écarts-types, c'est à dire après deux éliminations successives des valeurs en dehors de la moyenne ± 2 écarts-types. Cette double troncature a pour but de stabiliser la valeur cible en éliminant les valeurs extrêmes. Lorsqu'un même réactif peut être utilisé sur plusieurs automates, une comparaison statistique des résultats des couples « réactif/automate » est effectuée. Les résultats sont regroupés si aucune différence n'est notée.
- Calcul du coefficient de variation inter-laboratoires obtenu après cette double troncature (CVtr) sur l'ensemble des résultats et pour chaque réactif : il est exprimé en % et calculé en divisant l'écart-type par la moyenne. Il estime la dispersion des résultats.
- Ces calculs sont réalisés lorsque l'effectif avant troncature est suffisant ($n \geq 5$).

- Calcul du CV intra-réactif médian : il correspond à la valeur médiane des CVtr inter-laboratoires intra-réactif, cette valeur sépare les réactifs en 2 groupes d'effectifs égaux. La moitié des réactifs présente un CVtr intra-réactif inférieur ou égal au CV médian.
- Des limites acceptables (LA) sont utilisées pour apprécier les résultats obtenus par chaque laboratoire. Ces limites tiennent compte des performances analytiques des systèmes de dosage présents sur le marché mais également des exigences cliniques. Les LA sont exprimées en % et permettent de délimiter de part et d'autre de la cible (moyenne tronquée obtenue avec la même trousse) un intervalle à l'intérieur duquel un résultat est considéré comme « acceptable ». Lors de l'opération 13GPV1, une LA de 15% a été appliquée.

Définition de l'échantillon

Un échantillon lyophilisé a été envoyé lors de l'opération 13GPV1. Il a été fabriqué à partir d'un pool de sérums natifs surchargés avec le standard international SI 95/646 (PTH recombinante 1-84).

Avant l'envoi, l'expert a vérifié sur 5 flacons, la concentration en PTH, ainsi que la stabilité à 4°C après reconstitution (tableau IV). Il était recommandé de doser l'échantillon dans les 4 heures suivant la reconstitution.

La concentration de l'échantillon PTH131 se caractérisait par une valeur élevée largement supérieure aux valeurs usuelles.

tableau IV : résultats de l'étude de stabilité (dosages effectués par l'expert avec la trousse Cobas ROCHE [RD]).

	PTH131	
	résultat à T0	résultat à T4 heures
Médiane (ng/L)	315	293

Réactifs utilisés

Au total 12 trousses sont utilisées, ce sont des immuno-dosages de type « sandwich » automatisés pour la plupart. Deux trousses sont très peu utilisées : la trousse Elsa PTH Irma CISBIO [BN], 4 utilisateurs ; la trousse Vitros PTH ORTHO [P5], 3 utilisateurs.

La répartition des trousses de réactif les plus utilisées ($n \geq 5$) lors de l'opération 13GPV1 est donnée dans le tableau V et sur la figure 3.

Les 10 trousses les plus utilisées sont toutes, sauf deux, ([R8] LIAISON 1-84 PTH, DIASORIN et [ED] Cobas PTH bio-intacte ROCHE), des dosages dits de troisième génération.

figure 3 : répartition des trousses de dosage les plus utilisées ($n \geq 5$) pour doser la PTH lors de l'opération 13GPV1.

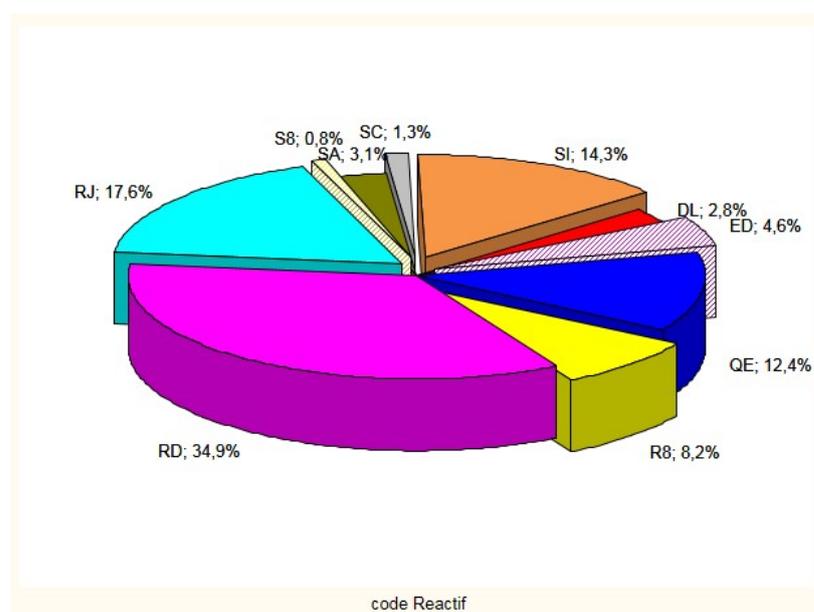


tableau V: réactifs les plus utilisés (n≥5) pour doser la PTH lors de l'opération 13GPV1.

Code	trousses, distributeurs	Nombre d'utilisateurs
		13GPV1
DL	STAT-AIA PACK intact PTH, TOSOH	18
ED	Cobas PTH bio-intacte, ROCHE	31
QE	Access Intact PTH, BECKMAN	80
R8	LIAISON 1-84 PTH, DIASORIN	52
RD	Cobas PTH, ROCHE	221
RJ	ARCHITECT Intact PTH, ABBOTT	112
S8	LIAISON N-Tact PTH, DIASORIN	5
SA	IMMULITE PTH intacte, SIEMENS	20
SC	PTH Intacte ISYS, IDS	8
SI	ADVIA Centaur PTH intacte, SIEMENS	91

Résultats des participants

Le dosage de la PTH a été réalisé par 80,8% des participants. Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 13GPV1 sont donnés dans le tableau VI et sur les figures 4 et 5.

La distribution des résultats est d'allure plurimodale. La dispersion inter-laboratoires globale est importante (CVTr = 23,4%). L'écart entre la moyenne de la trousse donnant les résultats les plus élevés ([SA], Immulite SIEMENS) et celle donnant les résultats les plus bas ([R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN) est important (98%, expression en % par rapport à la moyenne toutes techniques) sans modification en regard des résultats obtenus en 2012 pour l'échantillon PTH121. De plus, les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Pour les trousses avec plus de 4 utilisateurs, les trousses [RJ], Architect ABBOTT et [SA] Immulite SIEMENS donnent des résultats statistiquement plus élevés que ceux obtenus par les autres trousses.

Les deux trousses dites de troisième génération [R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN et [ED] Cobas PTH bio-intacte ROCHE donnent des résultats statistiquement plus bas que ceux obtenus par les autres trousses.

Même après exclusion des résultats obtenus par les deux trousses de 3^e génération, l'écart inter-techniques des trousses de seconde génération demeure important (71 %).

Pour l'échantillon PTH131, toutes les trousses présentent une précision correcte avec des CV inter-laboratoires intra-réactif inférieurs à 10%. La valeur médiane des CV inter-laboratoires intra-réactif est de 5,4% en amélioration en regard du résultat obtenu en 2012 pour l'échantillon PTH121 (7,4%).

Les néphrologues recommandent de rendre les concentrations de PTH des patients dialysés non pas en valeur absolue mais en multiple des Limites Supérieures (LS) des valeurs usuelles de la trousse de dosage utilisée (4). Le tableau VII propose pour les trousses les plus utilisées : la LS des valeurs usuelles fournies dans les notices des fabricants et la valeur moyenne obtenue pour chaque trousse exprimée en multiple de la LS. L'expression en multiple de la LS améliore légèrement l'écart inter-trousses. Ainsi, après expression en multiple de la LS, la trousse [RJ] Architect intact PTH ABBOTT donne des résultats 2 fois plus forts que la trousse donnant les résultats les plus bas [QE] Access intact PTH BECKMAN, lorsque les résultats sont exprimés en ng/l, le facteur est de 2,6.

tableau VI : résultats de la PTH lors de l'opération 13GPV1 (résultats exprimés en ng/L). En raison de la dispersion des résultats, la moyenne toutes techniques est donnée à titre indicatif.

code	distributeur	nom	Nbnt	Moytr	CVtr
		Toutes techniques	638	309,42	23,4
DL	TOSOH Biosciences	ST AIA-PACK intact PTH	18	293,77	9,8
ED	ROCHE Diag.	Cobas PTH (1-84)	29	193,84	1,9
QE	BECKMAN COULTER	Access Intact PTH	78	291,09	5,6
R8	DIASORIN S.A.	Liaison 1-84 PTH	51	193,11	5,6
RD	ROCHE Diag.	Cobas PTH	219	288,95	4,4
RJ	ABBOTT Diag.	Architect Intact PTH	112	456,27	7,6
S8	DIASORIN S.A.	Liaison N-Tact II PTH	5	275,80	5,2
SA	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	Intact PTH Immulite	20	496,00	6,8
SI	SIEMENS MED. SOL. DIAGN.	Intact PTH ADVIA Centaur	91	364,38	4,6
SC	IDS	PTH intacte Isys	8	280,50	3,9

Pour 4 laboratoires dosages effectués avec Elsa PTH CISBIO [BN], résultats : 273 – 300 – 306 – 310 ng/L.

Pour 3 laboratoires dosage effectué avec Vitros PTH ORTHO [P5] résultat : 326 – 332 - 336 ng/L.

tableau VII : résultats de la PTH lors de l'opération 13GPV1 (résultats exprimés en multiple de la limite supérieure des valeurs usuelles indiquées dans les notices).

code	distributeur	réactif	Limite Supérieure (LS) des Valeurs Usuelles (ng/L)	Moyenne exprimée en multiple de LS
DL	TOSOH Biosciences	ST AIA-PACK intact PTH	79,6	3,7
ED	ROCHE Diag.	Cobas PTH bio-intacte	56,9	3,4
QE	BECKMAN COULTER	Access Intact PTH	88,0	3,3
R8	DIASORIN S.A.	Liaison 1-84 PTH	36,8	5,2
RD	ROCHE Diag.	Cobas PTH	65,0	4,4
RJ	ABBOTT Diag.	Architect Intact PTH	68,3	6,7
S8	DIASORIN S.A.	Liaison N-Tact PTH	63,3	4,4
SA	SIEMENS M.S. D.	PTH intacte Immulite	87,0	5,7
SI	SIEMENS M.S. D.	Intact PTH ADVIA Centaur	72,0	5,3
SC	IDS	PTH intacte Isys	78,4	3,6

figure 4 : échantillon PTH131, histogramme de distribution des résultats de la PTH « toutes techniques ».

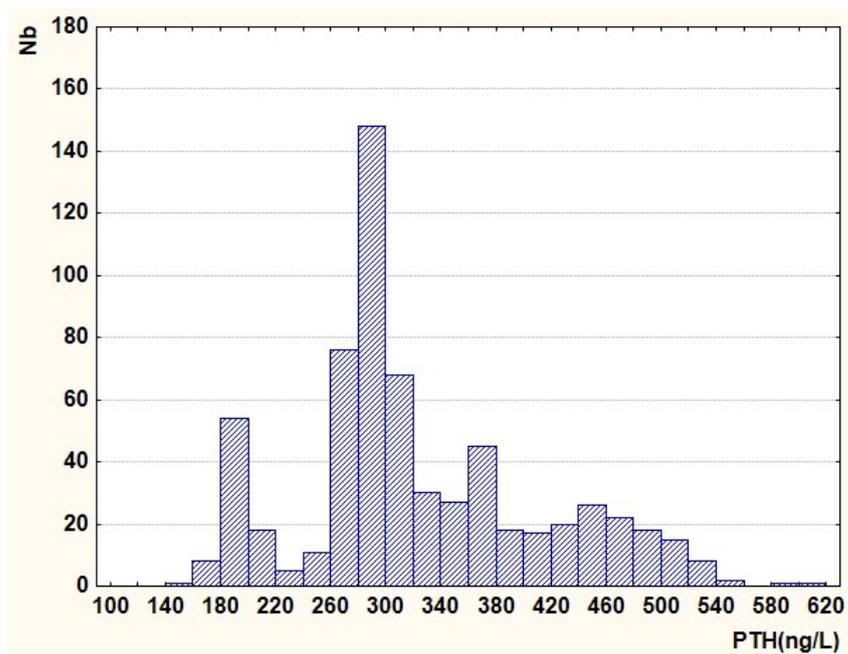
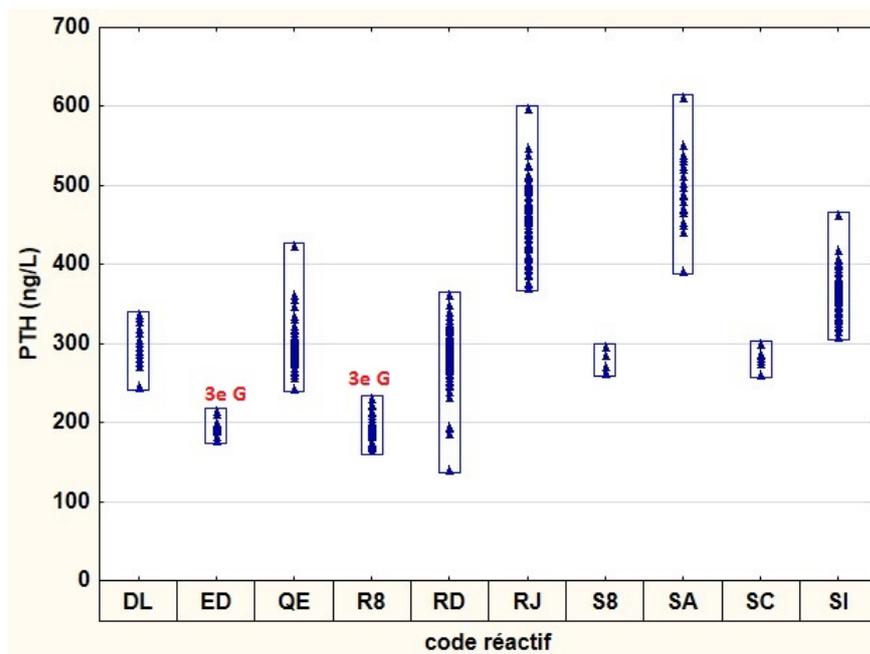


figure 5 : échantillon PTH131, résultats individuels obtenus lors de l'opération 13GPV1 avec les réactifs les plus utilisés ($n \geq 5$). Les rectangles représentent la dispersion intra-réactif, les triangles représentent les résultats individuels. Les 2 trousse de dosages dites de 3^e génération sont notées 3^e G.



Commentaire

La PTH est une hormone peptidique de 84 acides aminés sécrétée par les glandes parathyroïdes en réponse à une baisse de la calcémie ionisée. Son rôle principal est d'augmenter celle-ci en stimulant la résorption osseuse, la réabsorption tubulaire distale et, via la synthèse de la forme active de la vitamine D, l'absorption intestinale du calcium. La PTH 1-84 circule en présence de nombreux fragments issus du métabolisme des cellules parathyroïdiennes ou hépatiques : fragments N-terminaux actifs (1-34) et divers fragments C-terminaux inactifs. Le principal fragment C-terminal (7-84) semble même disposer d'une action hypocalcémisante antagoniste de la PTH 1-84.

Le dosage de la PTH est proposé chez 2 types de patients : chez toute personne nécessitant un diagnostic différentiel des anomalies du métabolisme phospho-calcique (hyperparathyroïdie primaire, bilan ostéoporose....) et chez les insuffisants rénaux chroniques (IRC) pour le suivi thérapeutique de l'hyperparathyroïdie secondaire (90% des dosages). Chez ces derniers, la clairance rénale des fragments de PTH peut être très diminuée, entraînant leur accumulation dans le sang.

Ces divers fragments circulants sont plus ou moins reconnus par les trousse de dosage, ce qui entraîne une variabilité inter-techniques importante. La réaction croisée des trousse avec ces fragments, généralement testée via le fragment 7-84, est comprise entre 48 et 100% pour les dosages dits de seconde génération. Les trousse dites de troisième génération ne reconnaissent pas le fragment 7-84, et les résultats obtenus sont moindres. Ainsi les trousse [R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN et [ED] Cobas PTH bio-intact ROCHE, seuls dosages dits de 3^e génération utilisés lors de l'opération 2013 qui annoncent 0% de croisement, donnent les résultats les plus bas.

Il est important de connaître les caractéristiques de sa trousse et notamment, le pourcentage de croisement avec le fragment 7-84. Or, les données des notices ne permettent pas toujours de connaître le pourcentage de croisement.

La variabilité inter-techniques très importante notée lors de l'opération est également liée au manque d'homogénéité des calibreurs utilisés. Il existe actuellement un standard international officiellement reconnu par l'OMS. L'ancien standard international 79/500, extrait peptidique qui contient vraisemblablement divers fragments de PTH et dont la composition exacte n'est pas connue, a été remplacé par un nouveau standard international, l'IS 95/646, préparation de hPTH (1-84) recombinante. A ce jour, les standards primaires utilisés par les industriels sont, en règle générale, des standards synthétiques et les données de raccordement métrologique des trousse ne sont pas indiquées pour toutes les trousse utilisées lors de l'opération 13GPV1. Rappelons qu'un contrôle du marché des dispositifs de dosage de PTH a été réalisé en 2009. Il s'agissait d'une évaluation des notices au regard des exigences essentielles de la directive européenne 98/79/CE portant notamment sur l'établissement des valeurs usuelles, la spécificité des dosages et le raccordement métrologique au matériel de référence, à la suite de laquelle l'ANSM et le groupe d'experts ont diffusé aux fabricants et aux biologistes certaines recommandations (Rapport du contrôle de marché des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage de la parathormone, Mars 2009).

Une mauvaise estimation des résultats de PTH peut avoir des conséquences importantes sur la prise en charge des patients : surcoût et examens complémentaires inutiles très coûteux ou invasifs en cas d'hyperparathyroïdie primaire (imagerie, cathétérisme, opération...); risque de sous- ou de surdosage thérapeutique susceptible d'induire des effets néfastes pour le patient lors du suivi thérapeutique de l'hyperparathyroïdie secondaire chez les insuffisants rénaux chroniques (IRC).

De nouvelles recommandations internationales éditées par le KDIGO (4) fixent les fourchettes diagnostiques et thérapeutiques devant être atteintes chez les IRC. Ainsi, pour les dialysés, le taux de PTH doit être maintenu entre 2 et 9 fois la limite supérieure des valeurs usuelles de la trousse.

Lors de l'opération 13GPV1, l'expression des résultats en multiple de la valeur supérieure des valeurs usuelles ne résout pas la dispersion des résultats posant le problème de l'hétérogénéité des populations utilisées pour déterminer ces valeurs usuelles. Les mêmes critères d'inclusions/exclusions devraient être utilisés par les fabricants pour établir les valeurs usuelles. Ainsi, une publication récente (5) préconise d'utiliser une population de référence sans déficit en vitamine D et avec une fonction rénale normale pour établir les valeurs usuelles de PTH. Ainsi, les auteurs ont montré que les concentrations de PTH exprimées en multiple de la LS des valeurs usuelles étaient comparables d'une technique à l'autre chez des patients dialysés.

La détermination de la parathormone (PTH) est complexe ; malgré l'amélioration des dosages de PTH, les résultats demeurent encore trop variables. Les problèmes analytiques liés à l'hétérogénéité moléculaire et surtout à la diversité des calibrateurs utilisés, demeurent prépondérants. Un meilleur raccordement métrologique des trousseaux pourrait améliorer la comparabilité des résultats. Un travail international collaboratif est en cours.

Dans le cadre de ses missions, l'ANSM a procédé depuis 2013 à un contrôle des notices. Elle a demandé que le raccordement métrologique et la spécificité du dosage vis-à-vis du fragment 7-84 soient notés. Ce travail est en cours.

Bibliographie

4. Kidney Disease : Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). Kidney International 2009; 76 (Suppl 113): S1-S130.

5. Interpretation of serum PTH concentrations with different kits in dialysis patients according to the KDIGO guidelines : importance of the reference (normal) values. Cavalier E, Delanaye P et al Nephrol Dial Transplant (2012) 27: 1950-1956.

25 OH Vitamine D Echantillons VITD131 – VITD132

Méthode statistique et expression des résultats

L'analyse statistique comporte les étapes suivantes :

- Exclusion des valeurs aberrantes très éloignées des autres résultats correspondant à des erreurs grossières.
 - Calcul de la valeur cible (moyenne tronquée, Mtr) sur l'ensemble des résultats et pour chaque réactif : la moyenne est obtenue après une double troncature à 2 écarts-types, c'est à dire après deux éliminations successives des valeurs en dehors de la moyenne ± 2 écarts-types. Cette double troncature a pour but de stabiliser la valeur cible en éliminant les valeurs extrêmes. Lorsqu'un même réactif peut être utilisé sur plusieurs automates, une comparaison statistique des résultats des couples « réactif/automate » est effectuée. Les résultats sont regroupés si aucune différence n'est notée.
 - Calcul du coefficient de variation inter-laboratoires obtenu après cette double troncature (CVtr) sur l'ensemble des résultats et pour chaque réactif : il est exprimé en % et calculé en divisant l'écart-type par la moyenne. Il estime la dispersion des résultats.
 - Ces calculs sont réalisés lorsque l'effectif avant troncature est suffisant ($n \geq 6$).
 - Calcul du CV intra-réactif médian : il correspond à la valeur médiane des CVtr inter-laboratoires intra-réactif, cette valeur sépare les réactifs en 2 groupes d'effectifs égaux. La moitié des réactifs présente un CVtr intra-réactif inférieur ou égal au CV médian.
 - Des limites acceptables (LA) sont utilisées pour apprécier les résultats obtenus par chaque laboratoire. Ces limites tiennent compte des performances analytiques des systèmes de dosage présents sur le marché mais également des exigences cliniques. Les LA sont exprimées en % et permettent de délimiter de part et d'autre de la cible (moyenne tronquée obtenue avec la même trousse) un intervalle à l'intérieur duquel un résultat est considéré comme « acceptable ». Lors de cette opération, une LA de 25% a été utilisée.

Définition de l'échantillon

Deux échantillons lyophilisés ont été envoyés lors de l'opération 13GPV1.

Il s'agit de pools sériques non surchargés

Avant l'envoi, l'expert a vérifié sur 5 flacons, la concentration en 25 OH vitamine D, ainsi que la stabilité à 4°C après reconstitution (tableau VIII).

En 2013, la concentration de l'échantillon VITD131 se situait en dessous des valeurs souhaitables (le statut vitaminique souhaitable est compris entre 75 et 150 nmol/l) et l'échantillon VITD132 se situait à la limite inférieure des valeurs souhaitables.

Tableau VIII : résultats de l'étude de stabilité (dosages effectués par l'expert avec la trousse RIA DIASORIN [B9]).

	VITD131		VITD132	
	résultat à T0	résultat à T96 heures	résultat à T0	résultat à T96 heures
Médiane (nmol/l)	40	35	90	90

Réactifs utilisés

Lors de cette opération, deux types de techniques de dosage ont été utilisés, les immuno-dosages (réalisés ici par 98,9% des laboratoires) et les techniques séparatives (HPLC ou spectrométrie de masse, par 1,1% des laboratoires).

Au total 15 trousse ou techniques sont présentes. Les techniques sont très largement automatisées, seuls quelques laboratoires utilisent des techniques radio-immunologiques (n=7) ou des techniques séparatives LC/MSMS (n=3) et HPLC (n=4). Cinq laboratoires utilisent la trousse Vidas BIOMERIEUX, quatre laboratoires utilisent la trousse ORTHO VITROS et un laboratoire utilise la trousse Access BECKMAN.

La répartition des trousse de réactifs les plus fréquentes (n ≥ 6) est donnée dans le tableau IX et sur la figure 6.

figure 6 : répartition des trousse de dosage les plus utilisées (n≥6) pour doser la 25 OH-Vitamine D lors de l'opération 13GPV1.

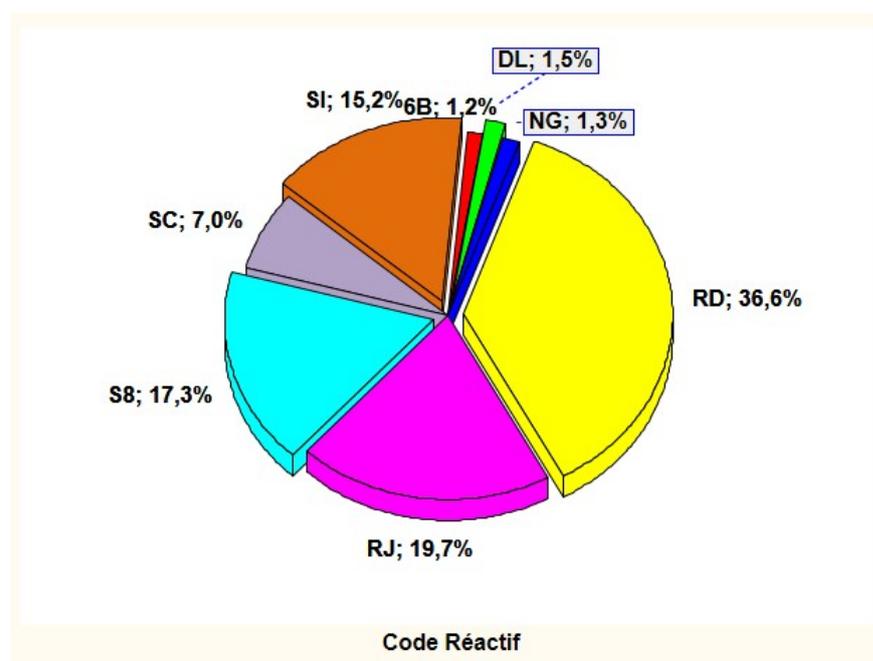


tableau IX : réactifs les plus utilisés (n ≥ 6) pour doser la 25OH-Vitamine D lors de l'opération 13GPV1.

Code	trousse, distributeurs	Nombre d'utilisateurs
6B	ELISA 25OH vitamine D2+D3 BIOADVANCE	8
DL	TOSOH STAT AIA-PACK 25OH vitamin D	10
NG	25 OH Vitamine D EIA, IDS/INGEN	10
RD	Cobas vitamine D total, ROCHE	246
RJ	ARCHITECT 25 OH vitamine D, ABBOTT	133
S8	LIAISON 25 OH vitamine D, DIASORIN	117
SC	25 OH ISYS, IDS	47
SI	ADVIA Centaur vitamine D total, SIEMENS	102

Résultats des participants

Le dosage de la 25 OH vitamine D a été réalisé par 87,6% des participants. Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 13GPV1 sont donnés dans le tableau X et sur les figures 7, 8, 9 et 10.

La distribution des résultats montre un étalement des résultats sur la droite. La dispersion inter-laboratoires globale est correcte (VITD131 : CVTr = 14,6% - VITD132 : CVTr = 12,1%). L'écart entre la moyenne de la technique donnant les résultats les plus élevés et celle donnant les résultats les plus bas est respectivement de 62% pour l'échantillon VITD131 ([DL] ST AIA-Pack TOSOH - [6B] Elisa BIOADVANCE) et de 44% pour l'échantillon VITD132 ([SI] ADVIA Centaur SIEMENS - [6B] Elisa BIOADVANCE) (expression en % par rapport à la moyenne toutes techniques). Les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Pour les 2 niveaux contrôlés, les résultats obtenus avec la trousse Elisa BIOADVANCE sont statistiquement plus bas que ceux obtenus par les autres trousse.

La précision des trousse est peu satisfaisante pour le niveau bas (échantillon VITD131) avec seulement 3 trousse sur 8 pour lesquelles le CV inter-laboratoires intra-réactif est inférieur à 10% et la valeur médiane des CV inter-laboratoires intra-réactif est de 10,4%.

Pour l'échantillon VITD132, deux tiers des trousse utilisées (5/8) présentent une précision (CV inter-laboratoires intra-réactif) inférieure à 10%. La valeur médiane des CV inter-laboratoires intra-réactif est de 7,7%.

tableau X : résultats de la 25 OH vitamine D obtenus lors de l'opération 13GPV1 (résultats exprimés en nmol/L).

code	distributeur	Réactif	Nbnt	Moytr	CVtr
VITD131					
		Toutes techniques	686	35,71	14,55
6B	BIOADVANCE	Elisa 25OH vitamin D2+D3	8	23,48	10,36
DL	TO SOH BIOSCIENCES	ST AIA-PACK 25 OH VITAMINE D	10	45,75	10,70
NG	IDS / I NGEN	25 OH Vitamin D EIA	10	45,10	12,30
RD	ROCHE Diag.	Cobas Vitamin D total	244	31,13	8,89
RJ	ABBOTT Diag.	Architect 25 OH Vitamin D	130	38,99	5,90
S8	DIASORIN S.A.	Liaison 25-OH vitamin D Total	116	35,39	7,97
SC	IDS	25 OH Isys	47	44,30	10,46
SI	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	ADVIA Centaur Vitamine D total	101	41,39	12,20
VITD132					
		Toutes techniques	684	76,92	12,07
6B	BIOADVANCE	Elisa 25OH vitamin D2+D3	8	58,85	13,18
DL	TO SOH BIOSCIENCES	ST AIA-PACK 25 OH VITAMINE D	10	81,05	7,32
NG	IDS / I NGEN	25 OH Vitamin D EIA	10	90,20	17,79
RD	ROCHE Diag.	Cobas Vitamin D total	241	69,06	6,44
RJ	ABBOTT Diag.	Architect 25 OH Vitamin D	132	76,79	4,21
S8	DIASORIN S.A.	Liaison 25-OH vitamin D Total	115	81,17	7,69
SC	IDS	25 OH Isys	47	98,19	7,62
SI	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	ADVIA Centaur Vitamine D total	100	92,40	10,16

figure 7 : échantillon VITD131, histogramme de distribution des résultats de la 25 OH vitamine D « toutes techniques ».

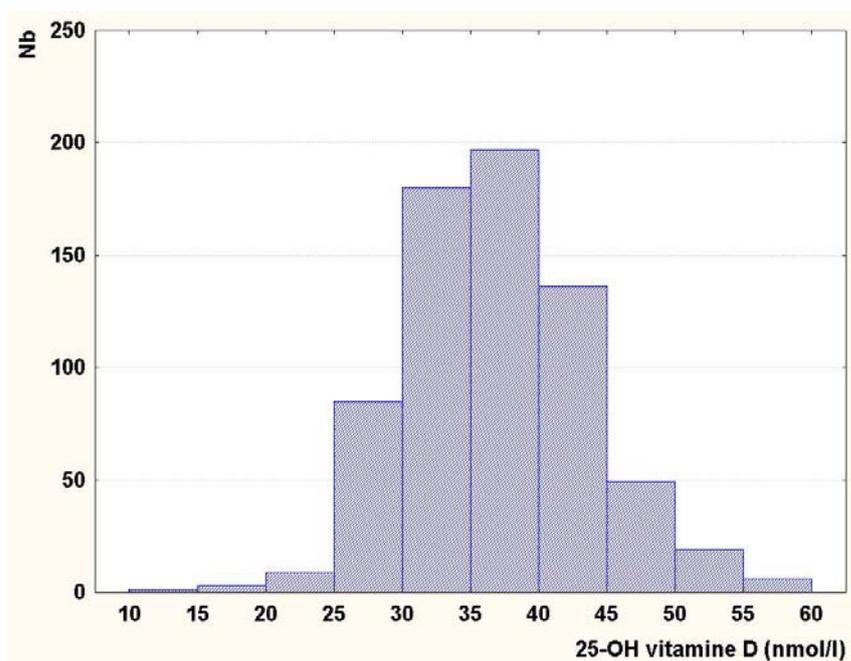


figure 8 : échantillon VITD131 résultats individuels obtenus lors de l'opération 13GPV1 avec les réactifs les plus utilisés ($n \geq 6$). Les rectangles représentent la dispersion intra-réactif, les triangles représentent les résultats individuels.

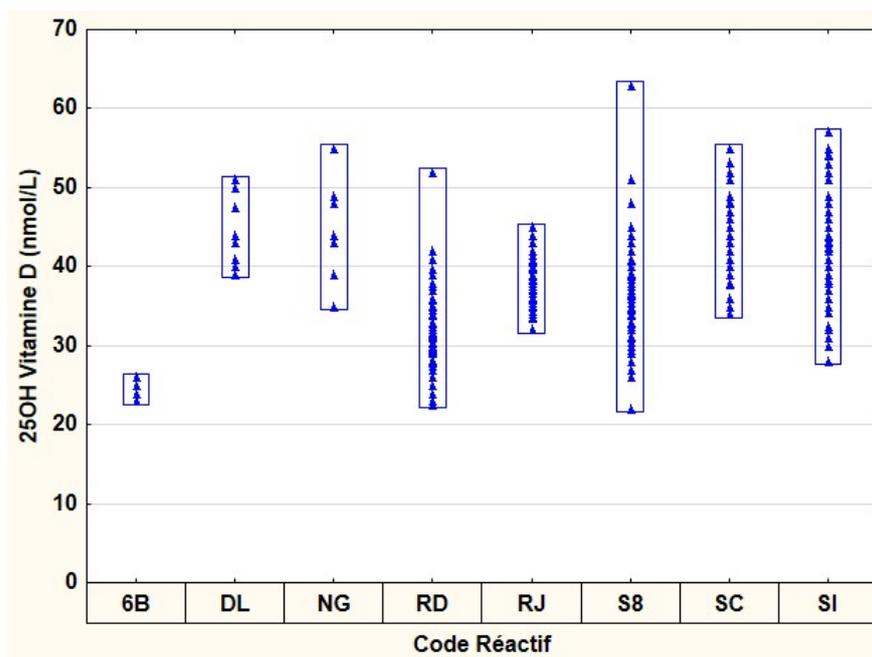


figure 9 : échantillon VITD132, histogramme de distribution des résultats de la 25 OH vitamine D « toutes techniques ».

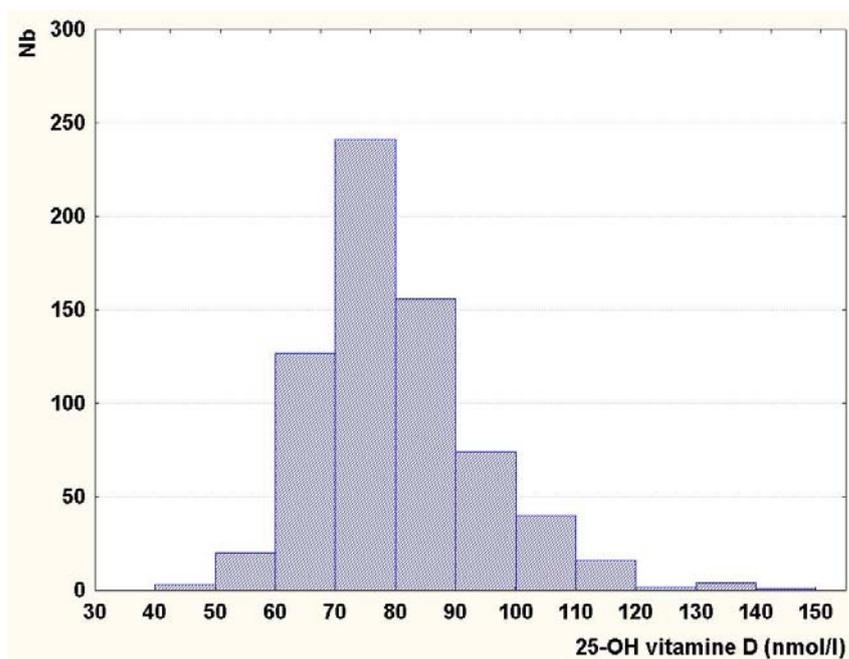
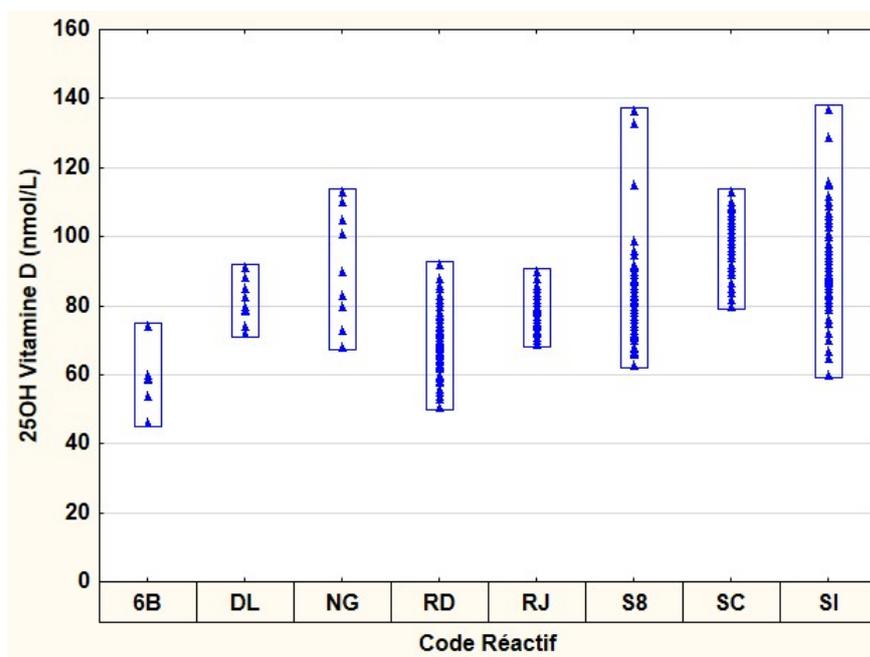


figure 10 : échantillon VITD132 résultats individuels obtenus lors de l'opération 13GPV1 avec les réactifs les plus utilisés ($n \geq 6$). Les rectangles représentent la dispersion intra-réactif, les triangles représentent les résultats individuels.



Commentaire

La vitamine D est une pro-hormone produite par la peau à partir du 7-déhydrocholestérol, sous l'influence des rayons UVB, et apportée en faible quantité par les aliments. Pour être efficace, elle doit d'abord être transformée dans le foie en 25 OH vitamine D (forme de stockage) puis dans les reins en 1-25 dihydroxyvitamine D (forme active). Seul le dosage de la 25 OH vitamine D permet de déterminer le statut global de la vitamine D.

Ces dix dernières années, le nombre de publications scientifiques et médicales sur la vitamine D a explosé. A côté des effets connus sur le métabolisme phospho-calcique et osseux, les effets de la vitamine D sur de nombreux autres tissus ou fonctions de l'organisme (neuromusculaire, système immunitaire, cardiovasculaire, angiogenèse...) sont de mieux en mieux documentés. En parallèle, un grand nombre de fabricants ont proposé ce dosage sur leurs automates. Tout ceci explique pourquoi la prescription du dosage de vitamine D est en constante augmentation. Ainsi, le nombre d'actes réalisés a été multiplié par 10 depuis 2005. Afin de freiner, l'expansion des dosages de 25 OH vitamine D, la HAS a émis en novembre 2013 des recommandations. L'HAS considère qu'il faut réserver le dosage sanguin de 25 OH vitamine D au diagnostic de rachitisme et d'ostéomalacie, aux mentions des AMM des médicaments de l'ostéoporose et à certaines situations particulières : personnes âgées faisant des chutes répétées, suivi ambulatoire de l'adulte transplanté rénal au-delà de 3 mois après transplantation, traitement chirurgical de l'obésité chez l'adulte. Bien qu'un certain nombre d'institutions, dont l'Académie de médecine, et de spécialistes estiment ces recommandations trop restrictives, la Sécurité Sociale a pris acte de ces préconisations. En dehors des indications préconisées par la HAS, le dosage de 25 OH vitamine D n'est plus remboursé.

D'un point de vue analytique, le dosage de vitamine D pose encore de nombreux problèmes liés notamment au fait que la 25 OH vitamine D existe sous deux formes principales, la 25 OH vitamine D2 (ou ergocalciférol) et la 25 OH vitamine D3 (ou cholécalciférol). La supplémentation des patients peut se faire sous les 2 formes (spécialités contenant de la vitamine D2 ou de la vitamine D3). Il est donc primordial que les trousse de dosages puissent doser les deux formes de vitamine D.

De plus, la 25 OH vitamine D est une molécule hautement hydrophobe susceptible d'induire un effet « matrice » lorsque les échantillons proposés par les évaluations externes de qualité ne sont pas des échantillons sériques natifs. Pour cette opération 2013, la composition des échantillons était strictement définie. Il s'agissait de 2 pools de sérums natifs non surchargés, leurs concentrations étaient situées en dessous (VITD131) et à la limite inférieure des valeurs souhaitables (VITD132).

Les résultats obtenus montrent une dispersion inter-laboratoires inter-techniques correcte avec cependant, une trousse (BIOADVANCE Elisa [6B]) donnant des résultats particulièrement bas. La dispersion inter-laboratoires intra-technique est améliorable. En effet, pour le niveau bas (échantillon VITD131) 6 trousse sur 8 dont trois techniques automatisées présentent une dispersion supérieure à 10%.

Les techniques séparatives (HPLC et spectrométrie de masse) sont encore très peu utilisées, et les dosages sont majoritairement réalisés sur automates. De ce fait, la standardisation des trousse de dosage demeure un sujet important, en cours de développement.

Il est à noter que le développement d'une méthode de référence pour doser la 25 OH vitamine D est en cours. De plus, un matériau de référence (SMR972) présentant des valeurs certifiées de 25 OH vitamine D2, 25 OH vitamine D3 et de 3-épi 25 OH vitamine D est disponible. L'harmonisation des dosages est donc réalisable dans les années à venir.

Conclusion

Concernant l'hGH, malgré l'apparition de nouvelles trousse de dosage, les résultats obtenus en 2013 confirment une stabilisation de l'écart inter-techniques. La standardisation n'a pas permis de régler complètement le problème. Un écart de 20 à 40%, selon la concentration contrôlée, est observé. Il peut être lié à un effet matrice connu depuis longtemps, l'utilisation pour la fabrication des étalons d'un milieu autre qu'un sérum humain sans hGH.

Concernant la PTH, la dispersion des résultats obtenus avec les trousse actuellement disponibles est importante. Cette dispersion s'explique d'une part, par l'hétérogénéité moléculaire de la PTH et la spécificité du couple d'anticorps utilisé, et d'autre part, par le manque d'homogénéité des calibrateurs utilisés. Toutefois, la précision des techniques (CV inter-laboratoires intra-technique) est globalement satisfaisante. L'expression des résultats en multiple de la LS des valeurs usuelles préconisée pour les patients dialysés atténue mais ne résout pas la dispersion inter-laboratoires inter-techniques. Ceci est probablement en partie dû à la disparité des populations de référence utilisées pour établir les valeurs usuelles proposées dans les

différentes notices. Les notices des trousseaux manquent parfois de précision, des renseignements manquent, en particulier le pourcentage de croisement pour le fragment 7-84, le raccordement métrologique ainsi qu'une description extensive des populations de référence utilisées pour établir les valeurs usuelles.

Concernant la 25 OH vitamine D, la dispersion inter-techniques des résultats est correcte pour des échantillons sériques non surchargés et dont la concentration est inférieure ou proche des valeurs souhaitables. Cependant, de nombreuses trousseaux ou techniques utilisées présentent une précision intra-réactif améliorable avec des CV inter-laboratoires intra-réactif supérieurs à 10%.