

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Hormone de croissance (hGH)

Hormone de
croissance

08HGH1 et 08HGH2

2008

Michèle NOEL (Afssaps)

Jean-Claude SOUBERBIELLE (Hôpital Necker, Paris)

Opération	08HGH1	08HGH2
Expédition	02/06/08	17/12/08
Clôture	30/06/08	12/01/09
Edition des comptes-rendus individuels	02/09/08	20/04/09
Paramètre contrôlé	hGH	hGH
Echantillon envoyé	GH196	GH197
Nombre de laboratoires concernés*	92	89
Nombre de laboratoires participants**	90	86

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer les analyses concernées par l'envoi

**Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération.

Résumé des opérations de l'année 2008

En 2008, deux opérations de contrôle de qualité portant sur le dosage de l'hormone de croissance (hGH) ont été réalisées. Les laboratoires concernés ont largement participé à ces 2 opérations (participation de 97,8% pour 08HGH1 et de 96,6% pour 08HGH2).

Lors des 2 opérations, réalisées en juin et en octobre 2008, les échantillons envoyés étaient issus de pools lyophilisés de sérums natifs.

En 2008, toutes les trousse de réactifs utilisées sauf une sont désormais étalonnées contre le Standard International SI 98/574, préparation d'hGH recombinante (isoforme 22 kDa).

Les résultats obtenus lors de la première opération en 2008 ont montré une atténuation des discordances inter-techniques.

L'écart inter-réactif observé lors de la deuxième opération est sans doute lié à une interférence. De ce fait, les résultats obtenus ne doivent être utilisés par les laboratoires que pour juger d'éventuelles distorsions de leur réponse par rapport à leur groupe utilisateur.

Enfin, le niveau de connaissance des laboratoires semble s'être amélioré. En effet, une très grande majorité des laboratoires connaît le standard international utilisé pour la calibration de sa trousse et les biologistes suivent largement les recommandations de la SFBC (1) et rendent les résultats en mUI/l.

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. Cette dernière n'est calculée que si l'effectif est suffisant ($n \geq 3$). 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.
- Calcul du CV médian : il correspond à la médiane des CVtr inter-laboratoires « intra-réactif ». La moitié des réactifs fournissent un CVtr inférieur ou égal au CV médian.
- La comparaison des résultats entre eux est effectuée par des tests non paramétriques adaptés (test de Kruskal Wallis). Les résultats sont significativement différents si $p < 0,05$.

Définition de l'échantillon

Des échantillons lyophilisés ont été envoyés lors des opérations 08HGH1 et 08HGH2. Ils ont été fabriqués à partir de pools sériques natifs et ne sont pas surchargés.

Avant l'envoi, l'expert J.C. Souberbielle 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).

tableau I : résultats de l'étude de stabilité.

	GH196		GH197	
	résultat à T0	résultat à T48 heures	résultat à T0	résultat à T48 heures
Médiane (mUI/l)*	3,95	3,90	18,1	17,3

* dosages effectués par l'expert avec la trousse Access BECKMAN [QE].

Réactifs utilisés

La répartition des trousses de réactifs utilisées lors des opérations 08HGH1 et 08HGH2 est donnée dans le tableau II. La figure 1 illustre la répartition des trousses de dosage utilisées lors de l'opération 08HGH1. On n'observe pas de modification importante au cours de l'année. Les trousses utilisées sont 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 CIS bio int. [BN] ; Irma BECKMAN, [BO],
- un traceur non isotopique pour les cinq autres : AIA TOSOH [DL] ; Delfia PERKIN ELMER [KC] ; Access BECKMAN [QE] ; Immulite SIEMENS [SA] ; Liaison DIASORIN [S8]. Ces dernières sont automatisées.

Au total 33,7% des laboratoires ayant répondu lors de l'opération 08HGH1 et 30,5% lors de l'opération 08HGH2 utilisent une technique avec traceur radioactif, confirmant la diminution progressive du nombre d'utilisateurs des techniques isotopiques, amorcée depuis 2000 (54% en 2000 et 39,8% en 2007).

En 2008, une seule trousse de réactif (Delfia PERKIN ELMER [KC]) reste standardisée sur l'ancien Standard International : SI 80/505, une préparation d'hGH hypophysaire. Toutes les autres trousses utilisées lors de l'opération 08HGH1 sont standardisées sur SI 98/574, une préparation d'hGH recombinante (isoforme 22 kDa). La trousse Delfia PERKIN ELMER [KC] n'a pas été utilisée lors de l'opération 08HGH2.

figure 1 : répartition des trousse de dosage utilisées lors de l'opération 08HGH1.

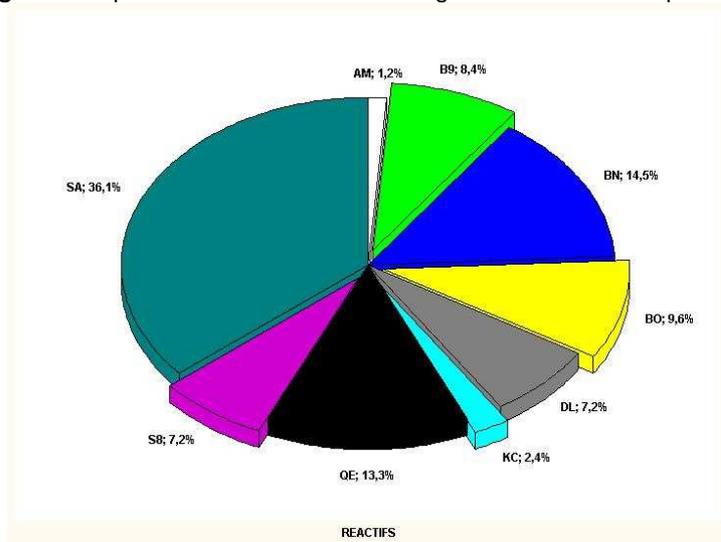


tableau II : réactifs utilisés lors des opérations 08HGH1 et 08HGH2.

Code	technique	trousses, distributeurs	Nombre d'utilisateurs	
			08HGH1	08HGH2
AM	isotopique	IRMA, BRAHMS	1	2
B9		CTK-IRMA, DIASORIN	7	6
BN		RIACT, CIS bio int.	12	11
BO		IRMA GH, BECKMAN	8	6
DL	non isotopique	AIA Pack / STAT AIA Pack, TOSOH	6	7
KC		DELFLIA/ AutoDELFLIA, PERKIN ELMER	2	0
QE		Access, BECKMAN	11	12
S8		Liaison, DIASORIN	6	8
SA		Immulite, SIEMENS	30	30

08HGH1

Echantillon GH196

Résultats des participants

Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 08HGH1 sont donnés dans le tableau III et sur la figure 2.

Par rapport à 2007, le nombre de laboratoires ayant rendu des résultats est stable.

Par rapport aux résultats obtenus en 2005 pour un échantillon de concentration similaire (inférieure à 5 mUI/l), une amélioration de la dispersion inter-laboratoires inter-réactifs est notée (en 2005 : 30,70% versus en 2008 : 12,3%).

Toutefois, les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Pour les trousse avec plus de 4 utilisateurs, on distingue 2 groupes : le groupe 1 constitué des trousse Immulite SIEMENS [SA], CTK-IRMA DIASORIN [B9], AIA Pack TOSOH [DL] et RIACT CIS bio int. [BN], donne des résultats statistiquement plus élevés (environ 20%) que ceux obtenus par les trousse du groupe 2 : Access BECKMAN [QE] et Liaison DIASORIN [S8]. Enfin, la trousse IRMA GH BECKMAN [BO] donne les résultats les plus bas.

L'écart entre la médiane des trouses donnant les résultats les plus hauts AIA Pack TOSOH [DL] et Immulite SIEMENS [SA] et celle donnant les résultats les plus bas (IRMA GH BECKMAN [BO]) est de 37% (expression en % par rapport à la médiane toutes techniques), en amélioration par rapport au résultat obtenu en 2005 (82%).

A part une trousse non automatisée, les trouses utilisées présentent toutes une précision correcte avec des CV inter-laboratoires intra-réactif inférieurs à 10%. La valeur médiane des CV inter-laboratoires intra-réactif est de 6,7%.

tableau III : résultats obtenus lors de l'opération 08HGH1 (résultats exprimés en mUI/l).

Code	Distributeur	Réactif	N	Ntr	Med (mUI)	R (%)	Interquartile (mUI)	Min (mUI)	Max (mUI)	Mtr (mUI)	CVtr (%)
GH196											
..	TOUTES TECHNIQUES		83	79	4,5	100	3,90 - 4,80	2,8	5,3	4,4	12,30
AM	BIOSOURCE	hGH IRMA	1	1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
B9	DIASORIN	HGH-CTK IRMA	7	7	4,7	104	4,50 - 5,10	4,5	5,3	4,8	6,70
BN	CIS BIO INT.	hGH-RIACT	12	12	4,6	102	4,65 - 4,8	4,1	5,3	4,6	7,60
BO	BECKMAN COULTER	IRMA GH	8	8	3,1	70	2,95 - 3,40	2,8	3,8	3,2	10,70
DL	TOSOH BIOSCIENCE	AIA Pack/STAT AIA Pack	6	6	4,8	107	4,70 - 4,90	3,9	5,1	4,7	8,90
KC	PERKIN ELMER INST.	DELFLIA/AutoDELFLIA GH	2	2	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
QE	BECKMAN COULTER	Access Ultrasensitive	11	10	3,8	84	3,70 - 4,00	3,3	4,0	3,8	3,70
S8	DIASORIN	Liaison hGH	6	6	4,0	89	3,90 - 4,00	3,6	4,1	3,9	4,50
SA	SIEMENS	m.Im. 2000/Immulite 2500	30	29	4,8	106	4,60 - 5,00	3,6	5,3	4,8	5,60

Les valeurs trouvées par les utilisateurs de la trousse DELFLIA [KC] sont les suivantes : 3,9 et 3,7 mUI/l et par l'utilisateur de la trousse IRMA Biosource [AM] : 4,0 mUI/l

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

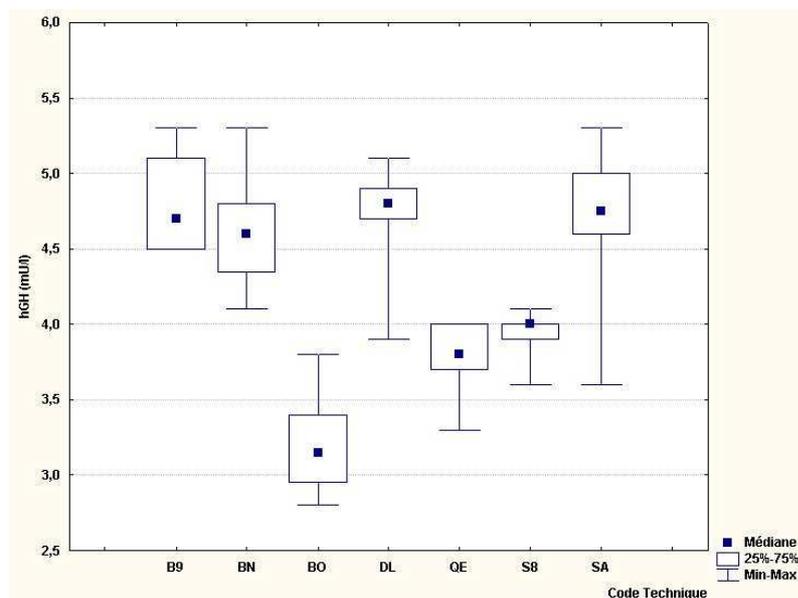
Max : maximum

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 : Résultats obtenus lors de l'opération 08HGH1 avec les réactifs les plus utilisés (n ≥ 4). Les rectangles représentent l'espace interquartile (percentile 25 – percentile 75), ainsi que la position de la médiane (point), les points hauts et bas positionnent respectivement les valeurs maximales et minimales obtenues.



08HGH2 Echantillon GH197

Résultats des participants

Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 08HGH2 sont donnés dans le tableau IV et sur la figure 3.

Les résultats obtenus avec le réactif DIASORIN Irma [B9], 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-techniques obtenues lors de cette opération est inhabituelle. Schématiquement, sur les opérations précédentes, nous avons identifié deux groupes de techniques, le premier (Beckman IRMA [BO], CIS Bio RIACT [BN], Beckman Access [QE], Diasorin Liaison [S8], Perkin Elmer Delfia [KC], Brahms IRMA [AM]) produisant des valeurs environ 30% plus basses qu'un groupe de trois autres techniques (Tosoh AIA [DL], Diasorin CTK-IRMA [B9], Siemens Immulite [SA]). Or, lors de l'opération 08HGH2, les valeurs obtenues avec le dosage Siemens Immulite [SA] sont proches de celles obtenues avec les trousse Beckman Access et IRMA ou CIS Bio RIACT, alors que les valeurs obtenues avec les réactifs commercialisés par Diasorin (Liaison [S8] et IRMA [B9]) sont les plus élevées.

Parmi les explications possibles, une modification de la calibration des réactifs Diasorin (IRMA et Liaison) et Siemens Immulite était envisageable. Elle a été formellement démentie par les deux sociétés. De plus, une étude complémentaire réalisée sur un panel constitué d'une trentaine d'échantillons provenant plusieurs tests de stimulation et couvrant une plage de concentration comprise entre 50 et 0,1 mUI/l, va également à l'encontre d'une modification de la calibration. Après dosage du panel avec les réactifs Beckman Access, Siemens Immulite, Diasorin Liaison et Diasorin IRMA, les résultats obtenus respectivement avec les trousse Diasorin IRMA, Siemens Immulite ou Diasorin Liaison sont en moyenne 35%, 25% et 19% plus élevés que ceux obtenus avec la trousse Beckman Access. Ces résultats sont cohérents avec la « hiérarchie » habituellement observée. Par ailleurs, pendant la même période, cette « hiérarchie » inhabituelle n'a pas été mise en évidence par d'autres organismes d'évaluation externe de la qualité (UK NEQAS, Probioqual).

La deuxième explication envisageable est l'existence d'une interférence, diminuant les résultats de la technique Immulite et augmentant ceux des techniques DiaSorin.

La présence de Pegvisomant dans un ou plusieurs sérums ayant servi à la fabrication des échantillons 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 (mais pas toutes) et, selon la concentration de Pegvisomant et le pourcentage de réaction croisée de la technique de dosage utilisée, induire des élévations ou des diminutions (par effet crochet) de la concentration mesurée de GH. D'après le professeur Martin Bidlingmaier (Université de Munich, Allemagne) spécialiste des dosages d'hormone de croissance et du Pegvisomant, cette molécule est connue pour interférer positivement avec le réactif Liaison et négativement avec le réactif Immulite (interférence avec l'anticorps de capture mais pas avec l'anticorps de détection)

Le dosage de notre échantillon (GH197) a été réalisé par le professeur Martin Bidlingmaier, aucune trace de Pegvisomant n'a pu être détectée. Cette hypothèse n'est donc pas confirmée.

Toutefois, les résultats de l'opération 08HGH2 ne permettent en aucun cas de considérer que la calibration des trousse de dosage de la GH a été modifiée depuis l'opération précédente.

En conclusion, les résultats de cette opération ne permettent pas de comparer les différentes techniques entre elles. Seuls les résultats intra-techniques sont utilisables. Aucune conclusion sur les discordances inter-techniques ne pourra être tirée. Seules les discordances inter-laboratoires pour les utilisateurs d'un même réactif sont interprétables.

En décembre 2008, pour le niveau de concentration contrôlé, les trousse utilisées présentent toutes sauf 2, une précision correcte avec des CV inter-laboratoires intra-réactif inférieurs à 10%. La valeur

médiane des CV inter-laboratoires est de 6,1%, en amélioration par rapport au CV médian obtenu en 2006 : 9,15% avec un échantillon de concentration équivalente (GH193).

tableau IV : résultats obtenus lors de l'opération 08HGH2 (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 (%)
GH197											
..	TOUTES TECHNIQUES		82	74	19,3	100	18,3 - 21,7	0,3	60,0	20,0	17,90
AM	BIO SOURCE	hGH IRMA	2	2	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
B9	DIASORIN	HGH-CTK IRMA	6	6	42,8	222	41,3 - 44,3	40,6	49,9	43,6	7,70
BN	CIS BIO INT.	hGH-RIACT	11	11	18,8	97	18,2 - 19,3	17,5	19,6	18,6	3,50
BO	BECKMAN COULTER	IRMA GH	6	6	14,4	75	13,3 - 16,2	12,9	16,9	14,7	10,90
DL	TOSOH BIOSCIENCE	AIA Pack/STAT AIA Pack H	7	7	20,7	107	19,7 - 21,2	17,0	21,2	20,2	6,10
QE	BECKMAN COULTER	Access Ultrasensitive hGH	12	11	18,4	95	17,5 - 18,4	16,0	19,5	18,4	4,60
S8	DIASORIN	Liaison hGH	8	7	28,0	145	27,0 - 30,0	0,3	31,0	28,5	6,00
SA	SIEMENS	m.Im. 2000/Immulite 2500	30	29	19,6	102	19,0 - 21,3	17,4	60,9	20,2	11,30

Les valeurs trouvées par les utilisateurs de la trousse IRMA Biosource [AM] sont les suivantes : 19,6 et 22,5 mUI/l.

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

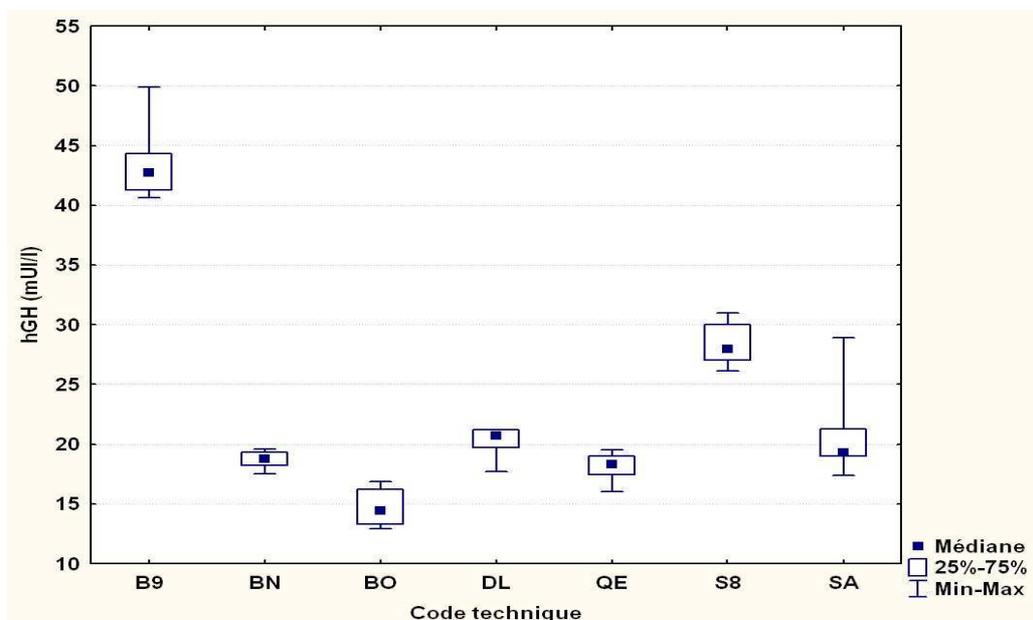
Max : maximum

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 3 : Résultats obtenus lors de l'opération 08HGH2 avec les réactifs les plus utilisés ($n \geq 4$). Les rectangles représentent l'espace interquartile (percentile 25 – percentile 75), ainsi que la position de la médiane (point), les points hauts et bas positionnent respectivement les valeurs maximales et minimales obtenues.



Evolution des « connaissances » en 2008.

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 les résultats sont très largement exprimés par rapport au standard international utilisé pour étalonner leur trousse de dosage (08HGH1 : 96,4% et 08HGH2 : 97,6%). De plus, les laboratoires suivent très majoritairement les recommandations SFBC (1) avec respectivement 52 laboratoires soit 62,6% lors de l'opération 08HGH1 et 50 laboratoires lors de l'opération 08HGH2 soit 60,9% exprimant strictement leurs résultats en mUI/l du SI 98/574. Pour 8 laboratoires soit 9,6% (08HGH1) et 7 laboratoires soit 8,5% (08HGH2), 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, 1 seul laboratoire sur 20 (08HGH1) et 1 laboratoire sur 23 (08HGH2) utilise encore un facteur de conversion erroné, ce qui correspond à une amélioration par rapport aux opérations précédentes.

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

Fin 2008, 8 des 9 trousse de dosage utilisées en France sont calibrées contre le SI 98/574.

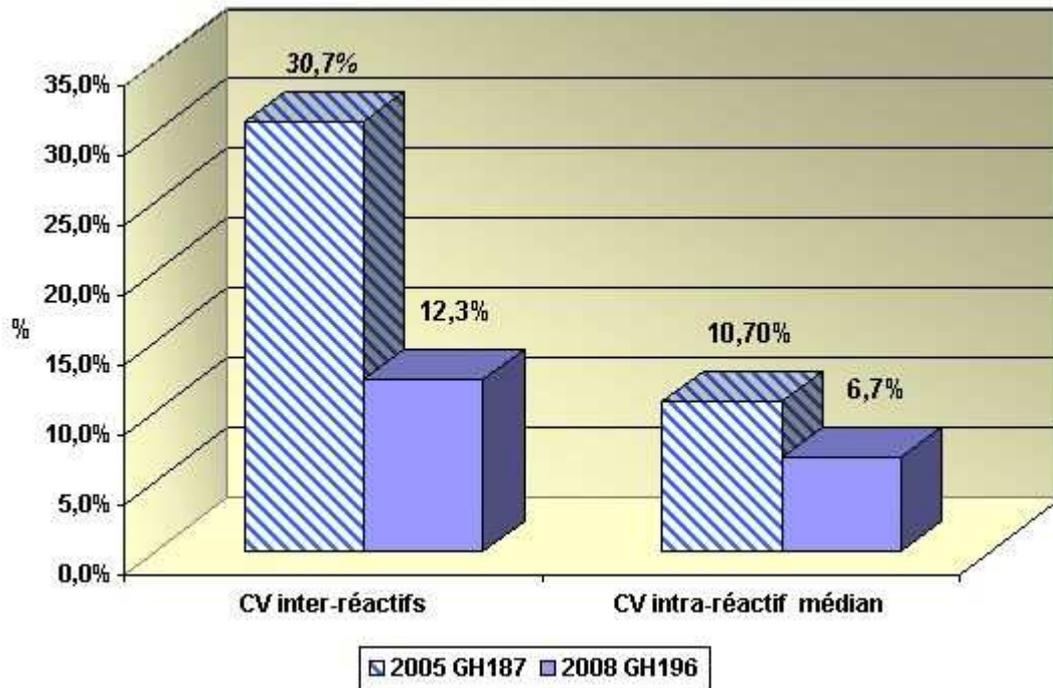
La quasi totalité des laboratoires (96,4 puis 97,6%) connaît le standard international utilisé pour la calibration de sa trousse.

En terme de rendu de résultats nous observons, depuis fin 2007, une augmentation du nombre de laboratoires rendant des « ng/ml » (28% en décembre 2008 versus 17% en juin 2007). 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). On peut noter toutefois que le rendu en « ng/ml » du standard SI 98/574 a été proposé par certains experts internationaux (3), il est donc possible que dans un avenir plus ou moins proche ceci soit également recommandé en France. Ce mode d'expression impliquera la modification de la valeur-seuil historique de « 10 ng/ml ». En effet, cette valeur est issue d'études anciennes qui ont utilisé des dosages de GH calibrés contre le SI 66/217 (1ng = 2 μ UI). Les « 10 ng » correspondaient à une masse de GH hypophysaire (composée par définition de plusieurs formes moléculaires) mal purifiée. En utilisant des dosages calibrés contre le SI 98/574 (1ng = 3 μ UI), une même activité biologique de 20 μ UI, aura pour équivalence massique 6,7 ng,

Les résultats de l'opération 08HGH1 suggèrent, par comparaison avec les résultats obtenus lors de l'opération 05HGH1 avec un échantillon comparable (pool de sérum lyophilisé, concentration faible), une amélioration de la dispersion des résultats inter-réactifs et intra-réactifs (figure 5). Ainsi, la dispersion inter-réactifs passe de 30,7 à 12,3% entre 2005 et 2008. De même le CV intra-réactif médian qui était de 10,7 % en 2005 est de 6,7% en 2008. Cependant, même si elles sont modérées, des discordances persistent. On observe deux groupes de réactifs, le groupe constitué des trousse Immulite SIEMENS [SA], CTK-IRMA DIASORIN [B9], AIA Pack TOSOH [DL] et RIACT CIS bio int. [BN] donne des résultats statistiquement plus élevés (environ 20%) que ceux obtenus par les trousse du deuxième groupe : Access BECKMAN [QE], Liaison DIASORIN [S8] et le réactif IRMA GH BECKMAN [BO] qui semble donner des résultats plus bas et plus dispersés que la plupart des autres réactifs.

Lors de la deuxième opération 2008, même si la présence de Pegvisomant n'a pu être mise en évidence, l'accroissement de l'écart inter-réactifs lié aux résultats discordants des 2 réactifs DIASORIN est vraisemblablement lié à une interférence. Les résultats obtenus lors de cette opération ne peuvent être utilisés pour tirer des conclusions sur les discordances inter-techniques. Seules les discordances inter-laboratoires pour les utilisateurs d'un même réactif sont interprétables.

figure 5 : Evolution de la dispersion des résultats inter et intra-réactifs entre 2005 et 2007 pour des échantillons de concentration inférieure à 5 mUI/l d'hGH.



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. TRAINER P et al Consensus statement on the standardisation of GH assays. Eur J Endocrinol 2006, 155, 1-2.