

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

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

**hGH – PTH –
25 OH Vitamine D 11GPV1**

2011

Edition : janvier 2012

Michèle NOEL (Afssaps)
Jean-Claude SOUBERBIELLE (Hôpital Necker, Paris)

Opération	11GPV1
Expédition	31/08/2011
Clôture	26/09/2011
Edition des comptes-rendus individuels	14/12/2011
Paramètres contrôlés Echantillons envoyés	hGH, PTH, 25 OH Vitamine D GH201, PTH111, VITD111
Nombre de laboratoires concernés*	927
Nombre de laboratoires participants**	889

* 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 de l'opération

En 2011, 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. La PTH et la 25 OH vitamine D étaient contrôlées pour la première fois dans le cadre d'une opération réalisée par l'Afssaps. Les laboratoires concernés ont largement participé (participation de 95,9%).

Lors de cette opération, réalisée en septembre 2011, les échantillons envoyés pour contrôler l'hGH et la PTH étaient issus d'un pool lyophilisé de sérums natifs. L'échantillon permettant de doser la 25 OH vitamine D était constitué d'un pool sérique surchargé en 25 OH vitamine D3.

Concernant l'hGH, en 2011, toutes les trousse de réactifs utilisées pour doser l'hGH, sauf une sont désormais étalonnées contre le Standard International SI 98/574, préparation d'hGH recombinante (isoforme 22 kDa). Malgré l'apparition de nouvelles trousse de dosages, les résultats obtenus en 2011 ont confirmé, pour un échantillon de concentration voisine de 20 mUI/l (seuil décisionnel pour le diagnostic de déficit en hormone de croissance chez l'enfant), une atténuation des discordances inter-techniques. Enfin, tous les laboratoires, sauf un, connaissent le standard international utilisé pour la calibration de leur trousse et les biologistes suivent largement les recommandations de la SFBC (1).

Concernant la PTH, la dispersion inter-laboratoire inter-technique 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 pour les patients dialysés), l'écart inter-technique est atténué.

Concernant la 25 OH vitamine D, les résultats obtenus sur un échantillon enrichi en vitamine D3 présentant une concentration proche de la limite supérieure des valeurs souhaitables sont relativement homogènes. Les moyennes obtenues par 7 des 11 techniques utilisées lors de cette opération sont proches.

hGH

Echantillon GH201

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 (moyenne tronquée obtenue avec la même trousse) un intervalle à l'intérieur duquel un résultat est considéré comme « acceptable ». Une LA de 15% a été utilisée lors de l'opération 11GPV1.

Définition de l'échantillon

Un échantillon lyophilisé a été envoyé lors de l'opération 11GPV1. Il a été fabriqué à partir d'un pool sérique natif non surchargé.

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).

En 2011, la concentration de l'échantillon se caractérisait par des valeurs proches du seuil définissant le déficit en hGH de l'enfant (20 mUI/l).

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

	GH201	
	résultat à T0	résultat à T48 heures
Médiane (mUI/l)	18,8	19,2

Réactifs utilisés

La répartition des trousses de réactifs utilisées lors de l'opération 11GPV1 est donnée dans le tableau II. La figure 1 illustre la répartition des trousses de dosage utilisées. On note l'apparition d'une nouvelle trousse de dosage hGH Elecsys, ROCHE [RD]. Les 11 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 CISbio [BN] ; Irma BECKMAN, [BO],
- un traceur non isotopique pour les sept autres : AIA TOSOH [DL] ; Delfia PERKIN ELMER [KC] ; Access BECKMAN [QE] ; Elecsys ROCHE [RD] ; Immulite SIEMENS [SA] ; Isys IDS [SC] ; Liaison DIASORIN [S8]. Ces dernières sont automatisées.

Au total, 20% des laboratoires ayant dosé l'hGH lors de l'opération 11GPV1 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 20% en 2011).

En 2011, 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 11GPV1 sont standardisées sur 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 11GPV1.

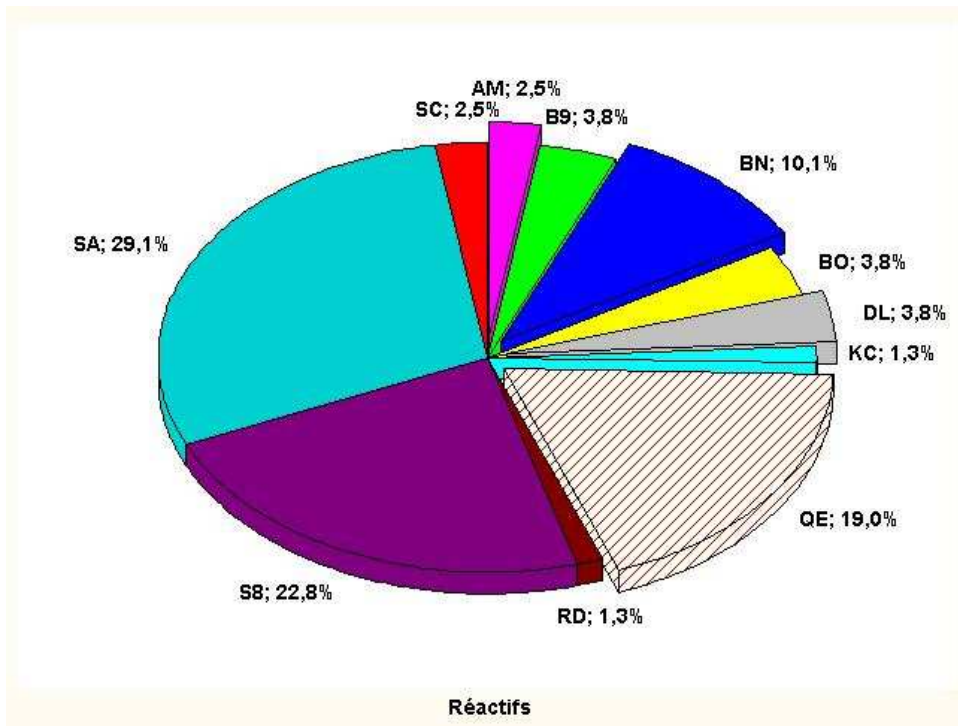


tableau II : réactifs utilisés pour doser l'hGH lors de l'opération 11GPV1.

Code	technique	trousse, distributeurs	Nombre d'utilisateurs
			11GPV1
AM	isotopique	IRMA, BRAHMS	2
B9		CTK-IRMA, DIASORIN	3
BN		RIACT, IBA CISbio	8
BO		IRMA GH, BECKMAN	3
DL	non isotopique	AIA Pack / STAT AIA Pack, TOSOH	3
KC		DELFLIA/ AutoDELFLIA, PERKIN ELMER	1
QE		Access, BECKMAN	15
RD		Elecsys, ROCHE	1
S8		Liaison, DIASORIN	18
SA		Immulite, SIEMENS	23
SC		Isys, IDS	2

Résultats des participants

Le nombre de laboratoires ayant rendu des résultats est stable, sans modification majeure depuis 2009. Le dosage de cet analyte a été réalisé par 9,0% des participants.

Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 11GPV1 sont donnés dans le tableau III et sur la figure 2.

Par rapport aux résultats obtenus en 2010 pour un échantillon de concentration similaire proche de 20 mUI/l (la médiane toutes techniques donnée à titre indicatif est de 20 mUI/l), la dispersion inter-laboratoires inter-réactifs est équivalente (en 2010 : 12,5% versus en 2011 : 11,6%).

Les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Pour les trousse avec plus de 2 utilisateurs, les trousse Immulite SIEMENS [SA] et AIA Pack TOSOH [DL], donnent des résultats statistiquement plus élevés que ceux obtenus par les trousse Access BECKMAN [QE], Liaison DIASORIN [S8] et IRMA GH BECKMAN [BO].

L'écart entre la médiane de la trousse donnant les résultats les plus hauts AIA Pack TOSOH [DL] et celle donnant les résultats les plus bas (IRMA GH BECKMAN [BO]) est de 38% (expression en % par rapport à la médiane toutes techniques), identique au résultat obtenu en 2010 (37%).

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 4,7%, en amélioration par rapport au résultat de 2010 (6,2%) et de 2009 (7,0%).

tableau III : résultats de l'hGH obtenus lors de l'opération 11GPV1 (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 (%)
GH201											
AM	BIO SOURCE	hGH IRMA	2	2	16,4	80	NC	14,3	18,5	16,4	N.C.
B9	DIASORIN	HGH-CTK IRMA	3	3	22,0	107	NC	21,4	24,0	22,5	6,10
BN	IBA(CIS BIO INT.)	hGH-RIACT	8	7	21,2	103	20,15 - 21,95	15,8	22,4	21,3	4,40
BO	BECKMAN COULTER	IRMA GH (Immunotech)	3	3	16,3	79	NC	15,0	16,3	15,9	4,70
DL	TOSOH BIOSCIENCE	AIA Pack hGH / Stat AIA Pack	3	3	24,1	117	NC	23,9	27,3	25,1	7,60
KC	PERKIN ELMER INST.	DELFLIA / AutoDELFLIA hGH	1	1	17,8	86	NC	N.C.	N.C.	17,8	N.C.
QE	BECKMAN COULTER	Access Ultrasensitive hGH	15	14	17,9	87	17,6-19,1	17,2	22,3	18,1	4,50
RD	ROCHE	hGH Elecsys	1	1	24,7	120	NC	N.C.	N.C.	24,7	N.C.
S8	DIASORIN	Liaison hGH	18	17	20,0	97	19,3-20,05	17,4	21,3	19,9	4,70
SA	SIEMENS	Immulite 2000 / Immulite 2500	23	23	23,0	112	21,5-24,6	19,9	26,5	23,1	7,60
SC	IDS-ISYS	hGH Isys	2	2	20,6	100	NC	20,1	21,0	20,5	N.C.

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

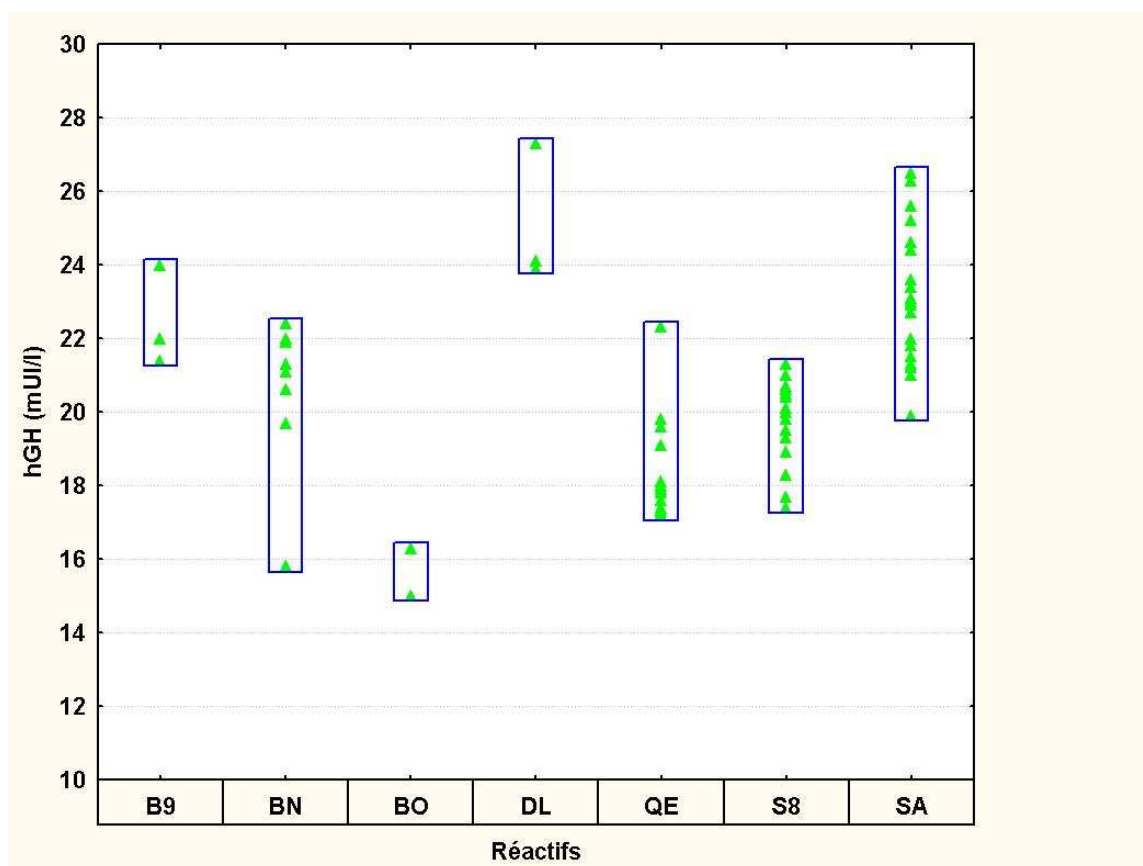
Max : maximum

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 individuels obtenus lors de l'opération 11GPV1 pour l'hGH avec les réactifs les plus utilisés (n ≥ 3). Les rectangles représentent la dispersion intra-réactif, les triangles représentent les résultats individuels.



Evolution des « connaissances » en 2011.

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 sauf un sont exprimés par rapport au standard international utilisé pour étalonner leur trousses de dosage (11GPV1 : 98,7%). De plus, les laboratoires suivent majoritairement les recommandations SFBC (1) avec 47 laboratoires soit 59,5% exprimant strictement leurs résultats en mUI/l du SI 98/574. Pour 12 laboratoires soit 15,2%, le rendu des résultats se fait en mUI/l et en ng/ml du SI 98/574. Enfin, les laboratoires rendant uniquement leurs résultats en ng/ml utilisent tous un facteur de conversion correct.

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 trousses 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 2011, 10 des 11 trousses de dosage utilisées en France sont calibrées contre le SI 98/574.

Le standard international utilisé pour la calibration de la trousses utilisée est connu de 98,7% des laboratoires.

En termes de rendu de résultats, 17,7% 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 (4). Nos résultats montrent que cette condition n'est pas encore totalement réalisée en France.

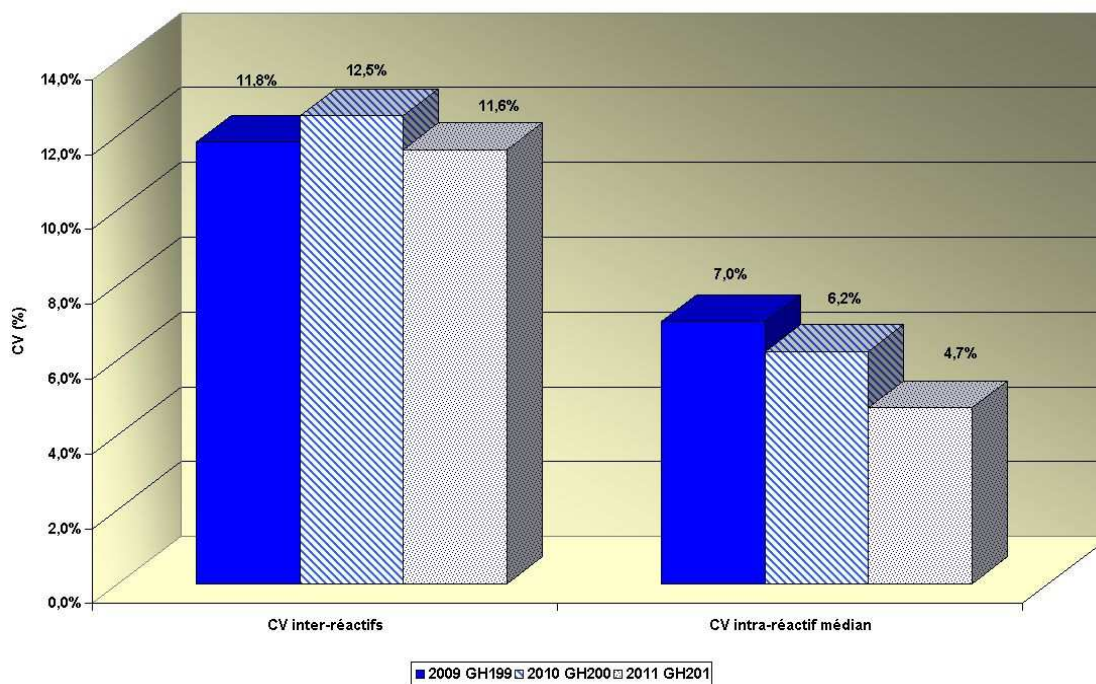
Lors de l'opération 2011, un échantillon de concentration voisine de 20 mUI/l était contrôlé. La comparaison des résultats avec ceux obtenus en 2010 et en 2009 avec un échantillon de concentration comparable suggèrent une stabilité de la dispersion des résultats inter-réactifs et une amélioration de la précision des trousseaux (figure 3). Ainsi, le CV intra-réactif médian qui était de 7,0 % en 2009 est de 6,2% en 2010 et de 4,7% en 2011.

On peut toutefois noter (tableau IV) que si dans le cadre d'une recherche de déficit en hormone de croissance (DGH) chez un enfant, les résultats obtenus pour un échantillon de concentration similaire à celui testé avaient été utilisés pour prendre une décision thérapeutique, les valeurs rendues par 31 laboratoires étaient inférieures à la cible thérapeutique (<20 mUI/l) et ceux de 48 laboratoires supérieures à la cible (≥20 mUI/l). Ceci doit inciter les biologistes à discuter de leurs résultats avec les cliniciens et à les informer des problèmes liés à l'incertitude de mesure.

tableau IV : Nombre de résultats inférieurs ou supérieurs au seuil définissant le déficit en GH de l'enfant (20 mUI/l) des différentes trousseaux de dosages

	AM	B9	BN	BO	DL	KC	QE	RD	S8	SA	Toutes techniques
hGH <20 mUI/l	2	0	2	3	0	1	14	0	8	1	31
hGH ≥20 mUI/l	0	3	6	0	3	0	1	1	10	21	48

figure 3 : Evolution de la dispersion des résultats inter et intra-réactifs entre 2009 et 2011 pour des échantillons de concentration voisine de 20 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.
4. 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 PTH111

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.

Définition de l'échantillon

Un échantillon lyophilisé a été envoyé lors de l'opération 11GPV1. Il a été fabriqué à partir d'un pool sérique natif non surchargé.

Avant l'envoi, l'expert J.C. Souberbielle a vérifié sur 5 flacons, la concentration en PTH, ainsi que la stabilité à 4°C après reconstitution (tableau V). Il était recommandé de doser l'échantillon dans les 4 heures suivant la reconstitution. Les résultats après 4 heures ne sont pas statistiquement différents (test de Wilcoxon). Une légère diminution (moins 6%, médiane = 227 ng/l) est observée après 24 heures.

En 2011, la concentration de l'échantillon se caractérisait par une valeur élevée largement supérieure aux valeurs usuelles. Selon la trousse utilisée, la cible est comprise entre 2 et presque 5 fois la limite supérieure des valeurs usuelles indiquées dans les notices.

tableau V : résultats de l'étude de stabilité (dosages effectués par l'expert avec la trousse Cobas ROCHE)

	PTH111	
	résultat à T0	résultat à T4 heures
Médiane (ng/l)	240	241

Réactifs utilisés

Au total 14 trousse sont utilisées, ce sont tous des immunodosages de type « sandwich » automatisés pour la plupart. Quatre trousse sont très peu utilisées : la trousse Duo PTH Irma IBA CISBIO [AN], 1 utilisateur ; la trousse N-Tact PTH SP DIASORIN [B9], 4 utilisateurs ; la trousse PTH Elisa INGEN [NI], 1 utilisateur et la trousse Vitros PTH ORTHO [P5], 1 utilisateur.

La répartition des trousse de réactifs les plus utilisées ($n \geq 6$) lors de l'opération 11GPV1 est donnée dans le tableau VI et sur la figure 4.

Les 10 trousse les plus utilisées sont toutes sauf une ([R8] LIAISON 1-84 PTH, DIASORIN) des dosages dit de seconde génération. Ces dosages reconnaissent le fragment 1-84 à 100% et les fragments « non 1-84 » entre 48 et 107% (données notices).

figure 4 : répartition des trousse de dosage les plus utilisés (n≥6) pour doser la PTH lors de l'opération 11GPV1.

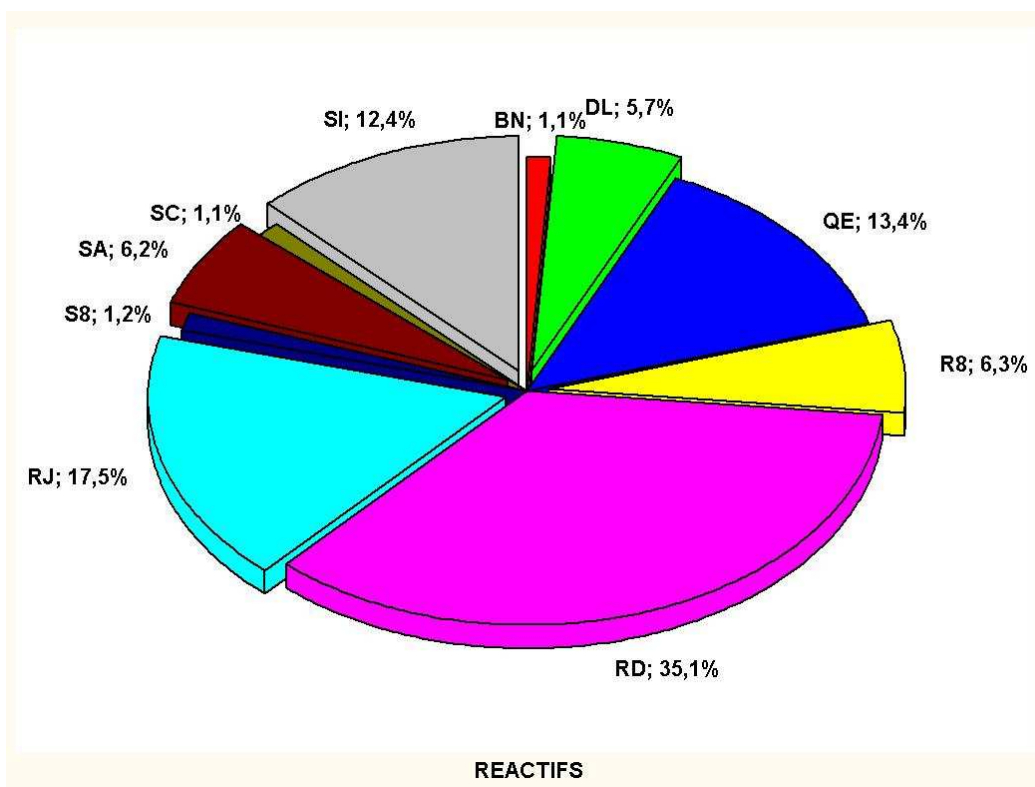


tableau VI : réactifs les plus utilisés (n≥6) pour doser la PTH lors de l'opération 11GPV1.

Code	trousse, distributeurs	Nombre d'utilisateurs
		11GPV1
BN	ELSA PTH, IBA CISBIO	7
DL	STAT-AIA PACK intact PTH, TOSOH	36
QE	Access Intact PTH, BECKMAN	88
R8	LIAISON 1-84 PTH, DIASORIN	41
RD	Cobas PTH, ROCHE	225
RJ	ARCHITECT Intact PTH, ABBOTT	111
S8	LIAISON N-Tact PTH, DIASORIN	8
SA	IMMULITE PTH intacte, SIEMENS	40
SC	PTH Intacte ISYS, IDS	6
SI	ADVIA Centaur PTH intacte, SIEMENS	81

Résultats des participants

Le dosage de cet analyte a été réalisé par 73,3% des participants. Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 11GPV1 sont donnés dans le tableau VII et sur les figures 5 et 6.

La distribution des résultats est d'allure plurimodale. La dispersion inter-laboratoires globale est importante (CVTr = 18,4%). L'écart entre la moyenne de la trousse donnant les résultats les plus élevés ([RJ], Architect ABBOTT) et celle donnant les résultats les plus faibles ([R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN) est important (115% expression en % par rapport à la moyenne toutes techniques). De plus,

les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Pour les trousse avec plus de 5 utilisateurs, les trousse [RJ], Architect ABBOTT et [R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN, donnent des résultats statistiquement différents de ceux obtenus par les autres trousse.

Les deux tiers des trousse (7/10) 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 7,3%.

Les néphrologues recommandent de rendre les concentrations de PTH des patients dialysés non pas en valeur absolue mais en multiple des Limites Supérieures des valeurs usuelles de la trousse de dosage utilisée. Le tableau VIII propose pour les trousse les plus utilisées : la limite supérieure (LS) des valeurs usuelles fournies dans les notices des fabricants et la valeur moyenne obtenue par chaque trousse exprimée en multiple de la LS. L'expression en multiple de la LS atténue l'écart inter-trousse d'un facteur 2. Ainsi, après expression en multiple de la LS, la trousse [RJ] Architect Intact PTH ABBOTT donne des résultats 2,4 fois plus fort que les trousse donnant les résultats les plus faibles ([BN] ELSA PTH IBA CISBIO et [S8] Liaison N-Tact PTH DIASORIN) alors que lorsque les résultats sont exprimés en ng/l la trousse [RJ] Architect Intact PTH ABBOTT donne des résultats 4,4 fois plus fort que la trousse donnant les résultats les plus faibles ([R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN).

tableau VII : résultats de la PTH lors de l'opération 11GPV1 (résultats exprimés en ng/l). En raison de la dispersion des résultats, la moyenne toutes techniques est donnée à titre indicatif.

code	distributeur	nom	Nbrt	Moytr	CVtr
		Toutes techniques	652	220,97	18,4
DL	TOSOH Biosciences	ST AIA-PACK intact PTH	36	191,56	6,3
BN	IBA CISBIO	ELSA-PTH	7	149,86	12,7
QE	BECKMAN COULTER	Access Intact PTH	88	187,68	7,3
R8	DIASORIN S.A.	Liaison 1-84 PTH	41	73,81	6,9
RD	ROCHE Diag.	Cobas PTH	225	219,67	4,9
RJ	ABBOTT Diag.	Architect Intact PTH	111	322,79	7,3
S8	DIASORIN S.A.	Liaison N-Tact PTH	8	143,63	23,4
SA	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	PTH intacte Immulite	40	273,17	6,4
SC	IDS	PTH intacte Isys	6	251,82	25,2
SI	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	Intact PTH ADVIA Centaur	81	187,74	8,3

Pour 1 laboratoire dosage effectué avec Duo PTH Irma IBA CISBIO [AN], résultat : 174 ng/l,

Pour 4 laboratoires dosages effectués avec N-Tact PTH SP DIASORIN [B9], résultats : 81 – 106 – 109 - 133 ng/l.

Pour 1 laboratoire dosage effectué avec PTH Elisa INGEN résultat : 304 ng/l,

Pour 1 laboratoire dosage effectué avec Vitros PTH ORTHO [P5] résultat : 195 ng/l,

tableau VIII : résultats de la PTH lors de l'opération 11GPV1 (résultats exprimés en multiple de la limite supérieure des valeurs usuelles indiquées dans les notices).

	distributeur	nom	Limite Supérieure (LS) des Valeurs Usuelles (ng/l)	Moytr exprimée en multiple LS
DL	TOSOH Biosciences	ST AIA-PACK intact PTH	79,6	2,41
BN	IBA CISBIO	ELSA-PTH	76,0	1,97
QE	BECKMAN COULTER	Access Intact PTH	88,0	2,13
R8	DIASORIN S.A.	Liaison 1-84 PTH	36,8	2,01
RD	ROCHE Diag.	Cobas PTH	65,0	3,38
RJ	ABBOTT Diag.	Architect Intact PTH	68,3	4,73
S8	DIASORIN S.A.	Liaison N-Tact PTH	72,9	1,97
SA	SIEMENS MED.SOL. DIAGN	PTH intacte Immulite	67,0	4,08
SC	IDS	PTH intacte Isys	55,0	4,58
SI	SIEMENS MED.SOL. DIAGN	Intact PTH ADVIA Centaur	72,0	2,61

figure 5 : échantillon PTH111, histogramme de distribution des résultats de la PTH « toutes techniques ».

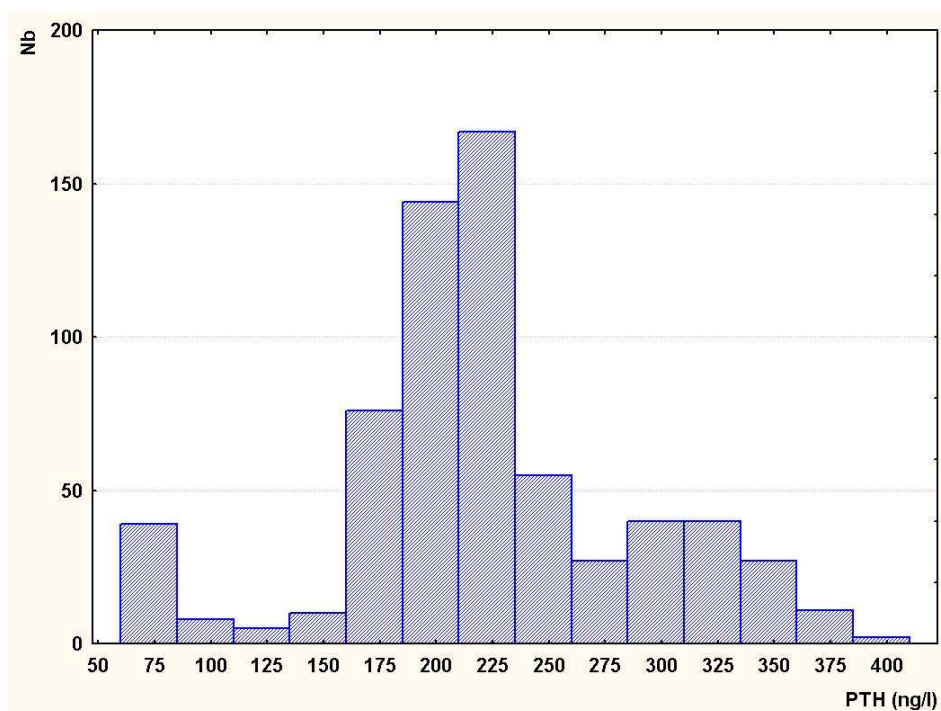
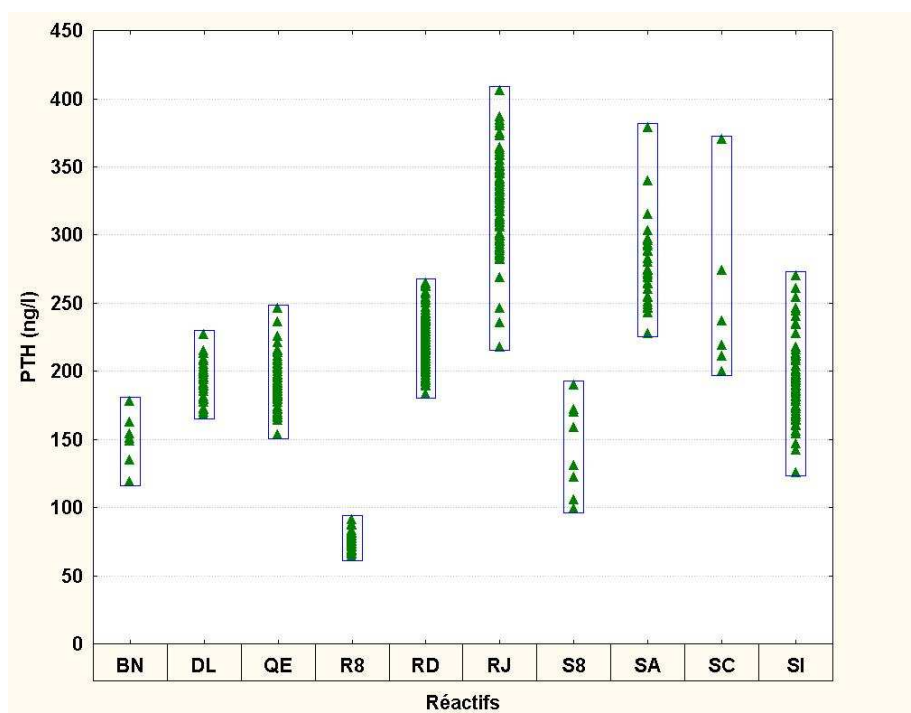


figure 6 : Résultats individuels obtenus lors de l'opération 11GPV1 avec les réactifs les plus utilisés ($n \geq 6$). Les rectangles représentent la dispersion intra-réactif, les triangles représentent les résultats individuels.



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 et la réabsorption tubulaire distale du calcium.

La PTH exerce ses actions via un récepteur couplé à des protéines G. On sait que les premiers acides aminés de la partie N-terminale de la PTH sont indispensables à cette interaction. Dans la circulation la PTH est rapidement fragmentée. La PTH circulante est donc constituée d'un mélange de l'hormone intacte, la PTH 1-84, et de différents types de fragments : N-terminaux actifs (1-34) et divers fragments C-terminaux inactifs.

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, lithiase rénale....) et chez les insuffisants rénaux chroniques (IRC) pour le suivi thérapeutique de l'hyperparathyroïdie secondaire.

La clairance rénale des fragments de dégradation est variable et peut être très augmentée chez les IRC. Ils peuvent alors interférer sur la mesure de la PTH. La réaction croisée avec les fragments non 1-84 est généralement testée avec le fragment de PTH 7-84. La réaction croisée avec ce fragment est comprise entre 40 et 100% pour les dosages dits de seconde génération. D'une façon générale, si les anticorps utilisés ne croisent pas avec le fragment 7-84, les résultats obtenus sont moindres. Ainsi la trousse [R8] Liaison 1-84 PTH DIASORIN, seul dosage dit de 3^e génération utilisé lors de l'opération 2011 qui annonce 0% de croisement, donne les résultats les plus faibles. Cependant, les données des notices ne permettent pas toujours de connaître le pourcentage de croisement avec le fragment 7-84. Seules 7 sur les 14 trousseuses utilisées lors du contrôle donnent ces précisions.

La variabilité inter-technique très importante notée lors de l'opération est également liée au manque d'homogénéité des calibrateurs utilisés. Il n'existe pas actuellement de standard international universellement reconnu. En effet si le standard 79/500 est actuellement la seule préparation internationale, il s'agit d'un extrait peptidique qui contient vraisemblablement divers fragments de PTH et dont la composition exacte n'est pas connue. De plus, ce standard n'est pratiquement plus disponible. Une préparation de hPTH (1-84) recombinante fabriquée par le National Institute for Biological Standards and Controls a également été proposée comme standard international de référence. A ce jour, les standards primaires utilisés par les sociétés sont, en règle générale, des standards synthétiques et le raccordement métrologique des trousseuses n'est indiqué que pour 7 des 14 trousseuses utilisées lors de l'opération 11GPV1. 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 de références, la spécificité des dosages et le raccordement métrologique au matériel de référence, suite à laquelle l'Afssaps 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, notamment lors du suivi thérapeutique de l'hyperparathyroïdie secondaire chez les insuffisants rénaux chroniques (IRC) avec un risque de sous- ou de surdosage thérapeutique susceptible d'induire des effets néfastes pour le patient.

De nouvelles recommandations internationales éditées par le KDIGO (1) 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.

L'expression des résultats en multiple de la valeur supérieure des valeurs usuelles améliore mais ne résout pas la dispersion des résultats posant le problème de l'homogénéité des populations utilisées pour réaliser ces valeurs usuelles (2).

Bibliographie

1. 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.
2. Cavalier E, Delanay P, Vranken L et al Interpretation of serum PTH concentrations with different kits in dialysis patient according to the KDIGO guidelines : importance of the reference (normal) values. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 0: 1-7.

25 OH Vitamine D

Echantillon VITD111

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.

Définition de l'échantillon

Un échantillon lyophilisé a été envoyé lors de l'opération 11GPV1. Il a été fabriqué à partir d'un pool sérique surchargé en 25 OH vitamine D3 (Sigma).

Avant l'envoi, l'expert J.C. Souberbielle a vérifié sur 5 flacons, la concentration en 25 OH vitamine D, ainsi que la stabilité à 4°C après reconstitution (tableau IX). Les résultats après 48 heures ne sont pas statistiquement différents (test de Wilcoxon).

En 2011, la concentration de l'échantillon se caractérisait par une valeur dans la zone haute des valeurs usuelles.

Tableau IX : résultats de l'étude de stabilité (dosages effectués par l'expert avec la trousse Liaison DIASORIN [S8]).

	VITD111	
	résultat à T0	résultat à T48 heures
Médiane (nmol/l)	136	134

Réactifs utilisés

Au total 11 trousse ou techniques sont utilisées avec deux trousse ou techniques peu répandues : le dosage par LC/MSMS], 1 utilisateur et la trousse Elisa Euroimmun BIOADVANCE [NB], 4 utilisateurs. Les autres techniques sont très largement automatisées, quelques laboratoires seulement utilisent des techniques radio-immunologiques ($n=16$) et des techniques par HPLC ($n=6$).

La répartition des trousse de réactifs les plus utilisées ($n \geq 6$) lors de l'opération 11GPV1 est donnée dans le tableau X et sur la figure 7.

figure 7 : répartition des trousse de dosage les plus utilisées (n≥6) pour doser la 25 OH-Vitamine D lors de l'opération 11GPV1.

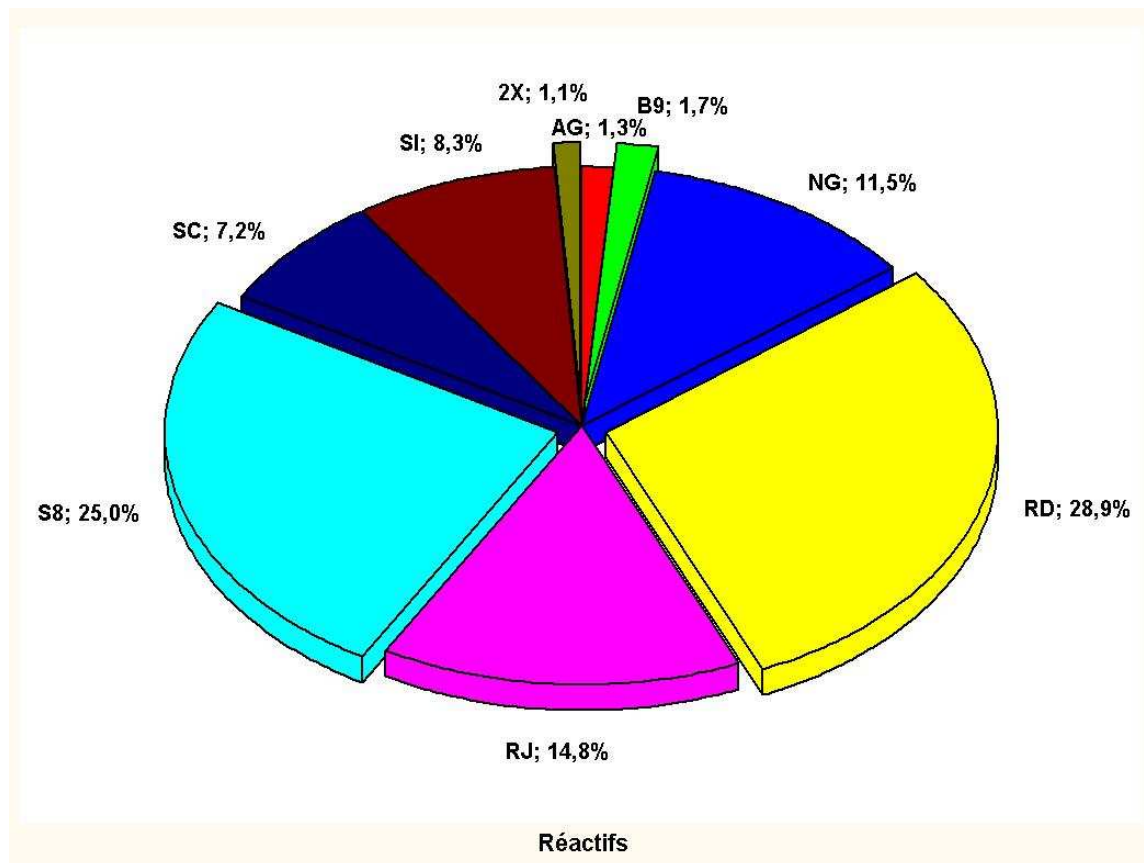


tableau X : réactifs les plus utilisés (n ≥ 6) pour doser la 25OH-Vitamine D lors de l'opération 11GPV1.

Code	trousses, distributeurs	Nombre d'utilisateurs
		11GPV1
2X	techniques par HPLC	6
AG	25OH RIA, IDS	7
B9	25-OH vitamine D RIA, DIASORIN	9
NG	25 OH Vitamine D EIA, IDS/INGEN	58
RD	Cobas vitamine D total, ROCHE	148
RJ	ARCHITECT 25 OH vitamine D, ABBOTT	56
S8	LIAISON 25 OH vitamine D, DIASORIN	125
SC	25 OH ISYS, IDS	37
SI	ADVIA Centaur vitamine D total, SIEMENS	35

Résultats des participants

Le dosage de la 25 OH vitamine D a été réalisé par 54,6% des participants. Les principaux résultats statistiques concernant l'opération 11GPV1 sont donnés dans le tableau XI et sur les figures 8 et 9.

La distribution des résultats montre un étalement important des résultats sur la droite. On note en particulier les résultats particulièrement élevés obtenus avec une trousse peu utilisée : Elisa Euroimmun BIOADVANCE [NB]. La dispersion inter-laboratoire globale est correcte (CVTr = 11,25%). L'écart entre la moyenne de la technique donnant les résultats les plus élevés ([2X], dosage par HPLC) et celle donnant les résultats les plus faibles ([RJ] ARCHITECT ABBOTT) est de 72% (expression en % par rapport à la moyenne toutes techniques). Les résultats diffèrent significativement selon la trousse utilisée (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$).

Les deux tiers des trousse utilisées (6/9) 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 8,0%.

tableau XI : résultats de la 25 OH vitamine D obtenus lors de l'opération 11GPV1 (résultats exprimés en nmol/l).

code	distributeur	nom	Nbnt	Moytr	CVtr
		Toutes techniques	485	118,79	11,25
B9	DIASORIN S.A.	25-OH vitamin D 125I RIA kit	9	136,56	10,91
AG	IDS	25 OH RIA	6	114,90	1,52
2X		DOSAGE PAR HPLC	6	186,83	25,55
NG	IDS/INGEN	25 OH Elisa	58	113,06	13,87
RD	ROCHE Diag.	Elecsys Vitamin D total	148	117,49	6,04
RJ	ABBOTT Diag.	Architect 25 OH Vitamin D	56	101,78	4,78
S8	DIASORIN S.A.	Liaison 25-OH vitamin D Total	125	126,62	8,41
SC	IDS	25 OH Isys	37	112,56	7,97
SI	SIEMENS MED.SOL. DIAGN.	AD VIA Centaur / Centaur CP Vitamine D	35	160,92	8,09

Pour 1 laboratoire dosage effectué par LC-MS/MS, résultat : 172 nmol/l,

Pour 4 laboratoires, dosage effectué avec la trousse Elisa Euroimmun BIOADVANCE, résultats : 219 – 239 – 239 - >300 nmol/l.

figure 8 : échantillon VITD111, histogramme de distribution des résultats de la 25 OH vitamine D « toutes techniques ».

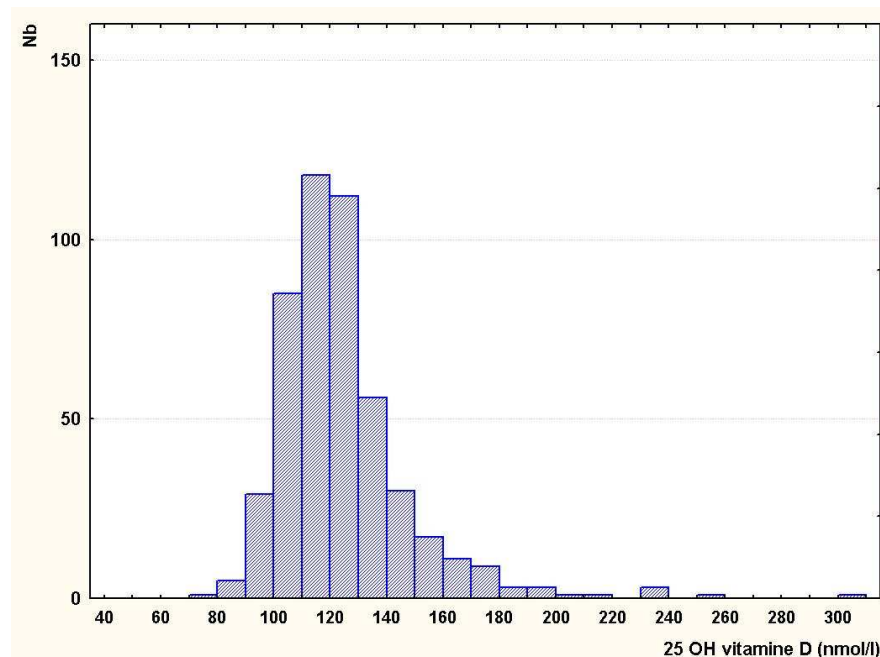
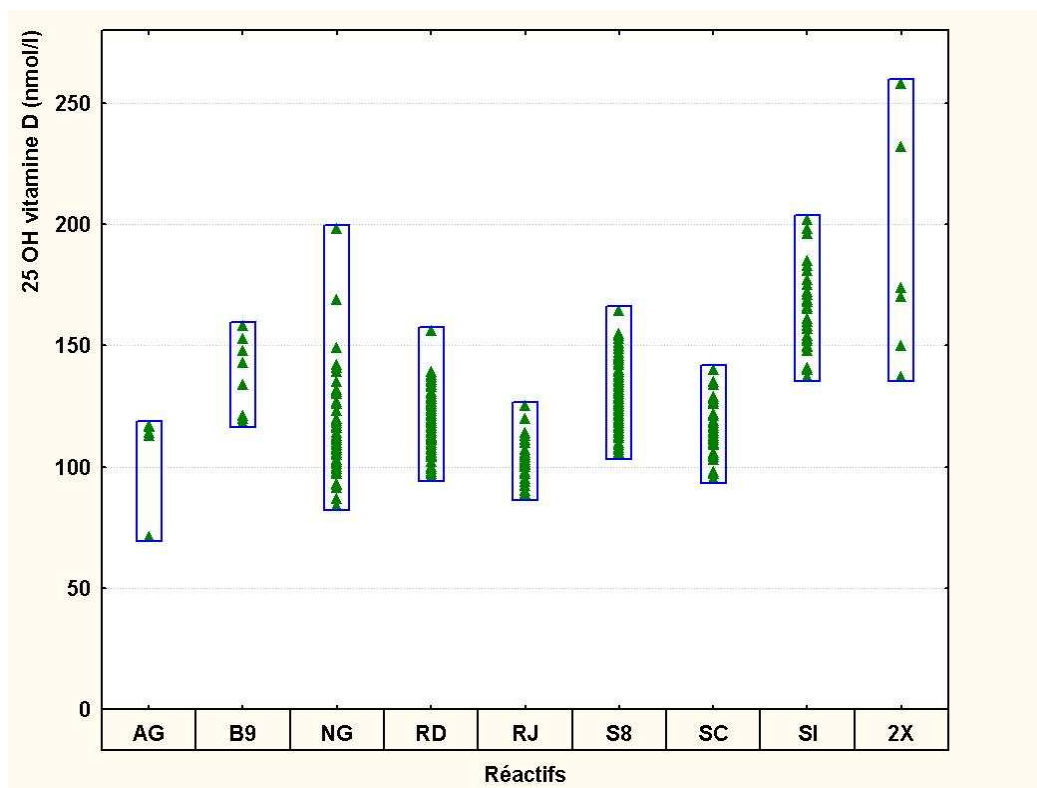


figure 9 : Résultats individuels obtenus lors de l'opération 11GPV1 avec les réactifs les plus utilisés (n ≥ 6). Les rectangles représentent la dispersion intra-réactif, les triangles représentent les résultats individuels.



Commentaire

La vitamine D3 est une pro-hormone synthétisée par la peau à partir du 7-déhydrocholestérol, sous l'influence des rayons UVB, et apportée en faible quantité par des aliments d'origine animale. Il existe une autre vitamine, la vitamine D2. Cette dernière n'est pas produite par la peau et les sources alimentaires d'origine végétale sont très peu nombreuses. Pour être efficace, la vitamine D doit d'abord être transformée dans le foie en 25 OH vitamine D (forme de stockage) puis dans les reins en 1-25 (OH)₂ vitamine D (forme active). Le dosage de la 25 OH vitamine D permet de déterminer le statut global de la vitamine D.

Ces 10 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 nombreuses autres pathologies ou fonctions de l'organisme (neuromusculaire, système immunitaire, cardio-vasculaire, cancer...) sont de mieux en mieux documentés, provoquant une augmentation du nombre de demandes de dosages de vitamine D. En parallèle, la mise à disposition de ce dosage par un grand nombre d'automates a permis sa « démocratisation ». Ce dosage ne fait plus partie du domaine de l'analyse « ultra-spécialisée » réservé à quelques équipes expérimentées. Cependant, le dosage de vitamine D pose encore de nombreux problèmes liés notamment au fait que la vitamine D est une molécule hautement hydrophobe et qu'elle existe sous deux formes principales, la 25 OH vitamine D2 (ou ergocalciférol) et la 25 OH vitamine D3 (ou cholécalciférol).

Lors de cette opération, deux types de techniques de dosage sont utilisées, les immuno-dosages (réalisés ici par 98,6% des laboratoires) et les techniques séparatives (HPLC ou spectrométrie de masse : 1,4% des laboratoires).

La nature hydrophobe de la 25 OH vitamine D est susceptible d'induire un effet « matrice » lorsque les échantillons proposés par les évaluations externes de la qualité ne sont pas des échantillons sériques natifs (échantillons commutables). Pour cette première opération, la composition des échantillons était strictement définie. Il s'agissait d'une matrice sérique supplémentée en 25 OH vitamine D3, forme

reconnue à 100% par toutes les trousse et techniques, à une concentration située à la limite supérieure des valeurs souhaitables (le statut vitaminique souhaitable est compris entre 75 et 150 nmol/l). Cette concentration est rarement proposée par d'autres évaluations externe de la qualité. Un effet matrice étant possible, une comparaison stricte des résultats des différentes trousse et techniques entre elles n'est pas possible (1). Toutefois les résultats obtenus montrent que lorsque l'échantillon ne contient que de la 25 OH vitamine D3 dans des concentrations usuelles, les résultats sont peu dispersés, 7 des 9 trousse donnent des résultats moyens très proches (entre 100 à 140 nmol/l). On note en particulier que les résultats obtenus avec la nouvelle trousse Roche se situent dans cette zone. Trois autres techniques (dosage par HPLC, trousse Elisa Euroimmun BIOADVANCE et trousse ADVIA CENTAUR SIEMENS) donnent des valeurs largement supérieures aux autres.

Les résultats de cette opération peuvent également permettre d'apprécier la dispersion intra-technique. Ainsi, les techniques non automatisées (HPLC, technique ELISA sur plaque, technique radio-immunologique) présentent une dispersion plus importante (CV >10%) que les techniques automatisées. Les résultats obtenus par HPLC sont particulièrement dispersés.

Bibliographie

- 1 Carter GD, Jones JC, Berry JL Tha anomalous behaviour of exogenous 25-hydroxyvitamin D in competitive binding assays. Journal of steroid and molecular biology 2007; 103: 480-482.

Conclusion

Concernant l'hGH, malgré l'apparition de nouvelles trousse de dosage, les résultats obtenus en 2011 confirment une atténuation de l'écart inter-technique. Toutefois, la standardisation ne permet pas de régler complètement le problème. Un écart incompressible de 30% 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 (présence de nombreux fragments de dégradation) 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 trousse manquent parfois de précision, des renseignements manquent, en particulier le pourcentage de croisement pour le fragment 7-84 et d'autres formes moléculaires ainsi qu'une description extensive des populations de référence.

Concernant la 25 OH vitamine D, les techniques les plus utilisées ont donné des résultats relativement homogènes sur cet échantillon enrichi en vitamine D3 et dont la concentration est proche de la limite supérieure des valeurs souhaitables. Les deux tiers des trousse ou techniques utilisées présentent une précision correcte avec des CV inter-laboratoires intra-réactif inférieurs à 10%. Les résultats obtenus par la technique HPLC sont beaucoup trop dispersés. Un contrôle effectué sur un échantillon natif sera nécessaire pour contrôler ces premiers résultats.