

# Autoimmunité et accréditation

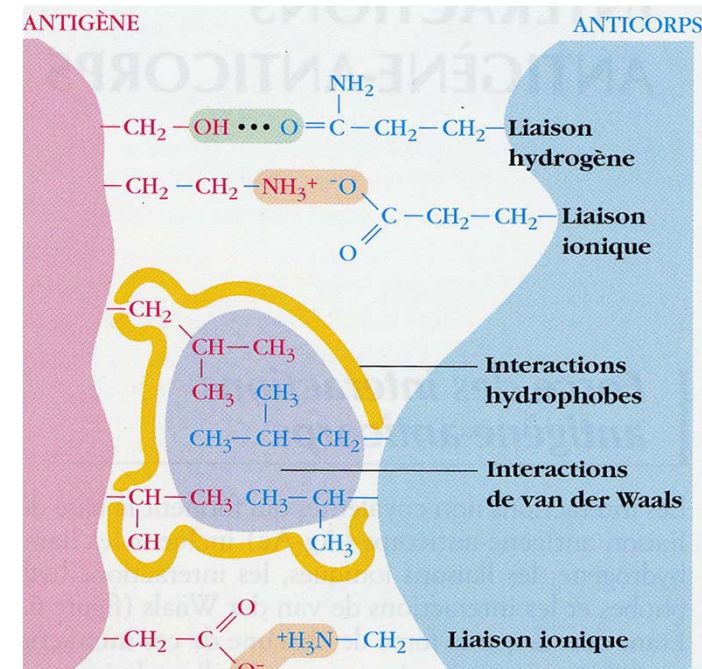
Françoise Fortenfant - Marie-France Taillefer  
11 juin 2010

# Introduction

- Contexte réglementaire
- La démarche d'accréditation :
  - But : amélioration service rendu au clinicien et pas « la qualité pour la qualité »
  - Démarche propre à chaque labo, pas de réponse universelle
- Objectifs de la présentation

# Spécificité du mesurande

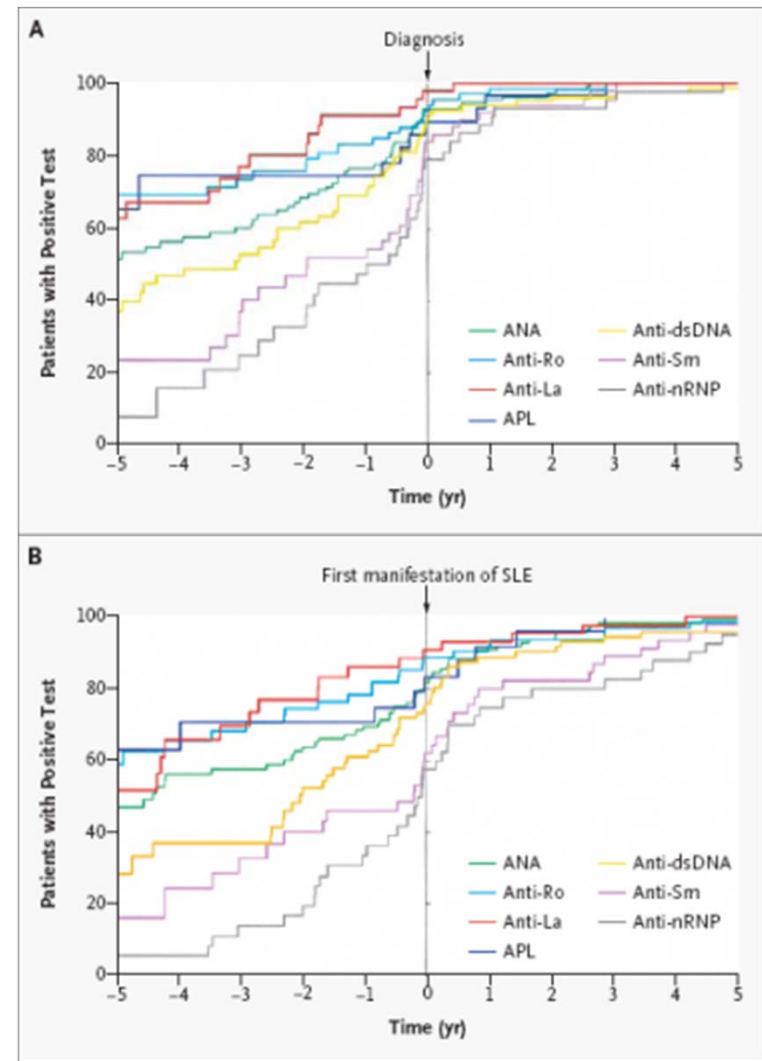
- Mesure des anticorps et plus précisément leur réactivité avec un antigène
- Autoanticorps
- Facteurs liés au malade susceptibles d'interférer avec réaction Ag-Ac (variabilité biologique (intra et inter-individuelles)
  - modification d'affinité, d'avidité liés au traitement, à l'évolution de la maladie
  - facteurs génétiques
  - pathologies associées, ....



Quelle population choisir pour la détermination de la sensibilité !!!

# Spécificité du mesurande

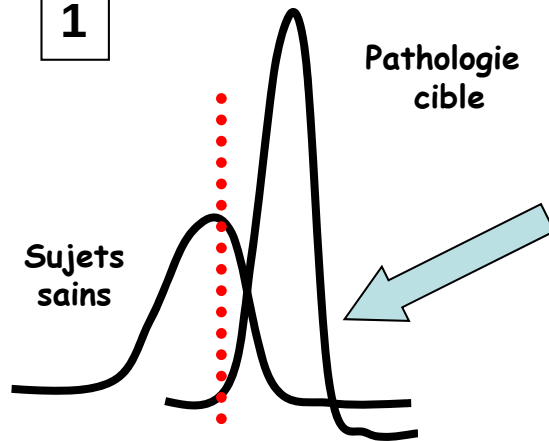
- AutoAc « pathologiques » à différencier des autoanticorps « naturels » du sujets sains.
  - en général polyréactifs, de classe IgM, de faible affinité
  - mais peuvent exister à des taux élevés.
  - Mais dans certains cas Ac prédictifs
- Le laboratoire doit avoir ses propres valeurs de référence ou à défaut vérifier que celles annoncées par le fournisseur correspondent bien à la population explorée *in situ*.



NEJM,2003;349, 1526-33

Problème de la détermination ou de la vérification du seuil

1

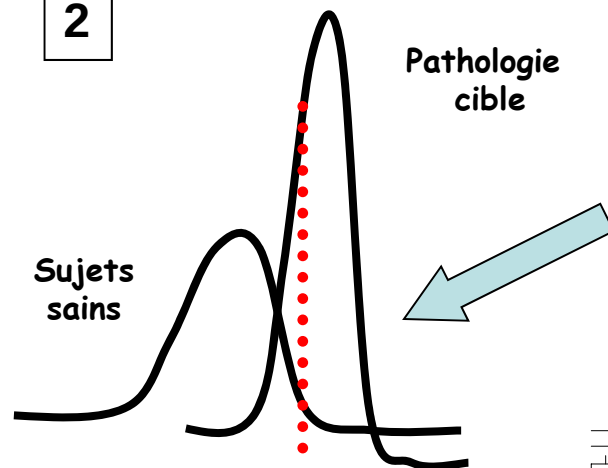


Seuil

A quel stade de la  
maladie ?  
Avant traitement?

|              | Malades | Sains |
|--------------|---------|-------|
| Test positif | VP      | FP    |
| Test négatif | FN      | VN    |

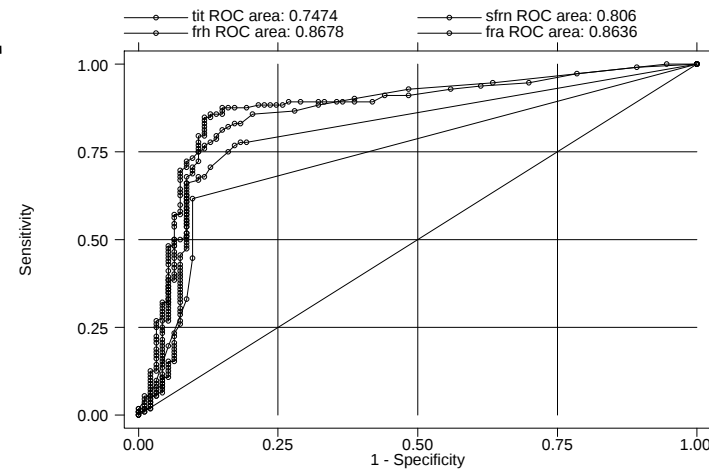
2



+ population  
servant au  
diagnostic  
différentiel?

Sensibilité =  $VP / (VP + FN)$   
 Spécificité =  $VN / (VN + FP)$   
 $L = Sens / (1 - Spec)$   
 $VPP = VP / (VP + FP)$   
 $VPN = VN / (VN + FN)$

Courbes ROC  
!!! Prévalence



|              | Obs | Area          | SE     | 95% conf. Interval |
|--------------|-----|---------------|--------|--------------------|
| WR           | 205 | 0,7474        | 0,0297 | 0,68918 - 0,80563  |
| Nephelometry | 205 | 0,806         | 0,0305 | 0,74630 - 0,86574  |
| FRH          | 205 | <b>0,8678</b> | 0,0277 | 0,81347 - 0,92223  |
| FRA          | 205 | <b>0,8636</b> | 0,028  | 0,80875 - 0,91850  |

# Mesurande et sensibilité

- Complexité du problème dépend de l'autoAc et de la méthode utilisée :
  - Spécifique /Non spécifique d'organe
  - Qualitatif/Quantitatif
- Sensibilité clinique/sensibilité fonctionnelle/sensibilité analytique ?

# Grande variabilité des techniques

- Différents **principes techniques** : influence sur la présentation de l'antigène :
  - ELISA, immunodot, immunofluorescence indirecte, fluorimétrie de flux, immunoblot, chemiluminescence ;
- Dans deux kits avec la même technique (ELISA par exemple), de nombreux paramètres vont varier et influencer sur la qualité du test:
  - nature de l'antigène fixé (recombinant ou purifié, origine...)
  - nature du conjugué
  - nature des calibrateurs utilisés
  - composition du milieu réactionnel
- **Techniques manuelles** : source de variabilité inter-opérateur versus **automates**.
- Variétés des automates disponibles, (thermostatisation, qualité des lavages...).
- .....

Problème de la standardisation !!!

Techniques quantitatives

# La standardisation

- Le raccordement des matériaux de calibration :
  - dans l'idéal, par rapport à un matériel de référence.
  - exceptionnellement le cas en auto-immunité :
    - anticorps anti-ADN et standard Wo/80 de l'OMS
    - anticorps anti-cardiolipides, anti- $\beta$ 2GPI et standards de Sapporo
    - facteurs rhumatoïdes et standard 64/2 du NIBSC ou standard CLB 64/1 de l'OMS.
- Kits commerciaux :
  - traçabilité du raccordement doit être communiquée par le fournisseur.
  - Si pas de standard international validé et reconnu, le fournisseur doit informer sur le matériel utilisé.
  - Vérification de la traçabilité :
    - Dans l'idéal utilisation de ce matériel dans le cadre d'essais intra-laboratoire (ou mieux inter-laboratoires) afin de vérifier la qualité de l'étalonnage *in situ*.
    - En l'absence de matériel disponible : références bibliographiques.

# Absence de standardisation : problèmes pour les CQ

- Pour les CQI :
  - absence de contrôles de qualité commerciaux avec valeurs cibles et fourchettes validées sur différents systèmes analytiques.
  - D'où contrôles de kit ou contrôles maisons
  - Comment valider les CQ quantitatifs « maison » ?
- Pour les CQE : limites à l'exploitation des comparaisons inter-laboratoires
  - pas de comparaisons inter-techniques possibles car pas de valeur « vraie »
  - seule comparaison possible : au sein de groupes de pairs : restreint l'information au fournisseur utilisé.
  - N'existent pas pour tous les paramètres

Comparaisons interlabo ?

Pour valider les CQI, quand il n'existe pas de CQE établis?

# Paramètres techniques

- La fidélité : facilement estimable : calcul des coefficients de variation (CV)
  - de répétabilité
  - de reproductibilité (+/- de comparaisons inter-laboratoires).
- La justesse : peut être évaluée par :
  - comparaison avec une méthode de référence lorsqu'elle existe, ce qui est rarement le cas en auto-immunité.
  - comparaisons avec des groupes de pairs et le calcul du z-score
  - Si données non disponibles : comparaison avec les valeurs des contrôles données par le fournisseur : approche *a minima* de la justesse.
- L'exactitude : évaluation indirecte uniquement (sans standard international et/ou méthode de référence)
  - par la comparaison avec les valeurs du fournisseur pour des matériaux de contrôle ou la comparaison avec des groupes de pairs.

# Contexte réglementaire : Estimation de l'incertitude de mesure

- GBEA §4.1 :
  - « Expression des résultats : L'expression des résultats doit être précise et sans équivoque.....Pour les résultats quantitatifs, le cas échéant, les performances analytiques de la méthode peuvent être indiquées. Les unités du système international (SI) doivent être utilisées quand elles existent. »
- NF EN ISO 15189
  - §5.5.3 : « sources potentielles de variation de résultats »
  - §5.6.2 : « Le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats dans le cas où cela est pertinent et possible. Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte. Les sources contribuant à l'incertitude peuvent inclure l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la sélection des aliquotes d'échantillon, les calibrateurs, les matériaux de référence, les grandeurs d'entrée, l'équipement utilisé, les conditions expérimentales, l'état de l'échantillon et les changements de manipulateurs. »

# Objectifs de la détermination de l'incertitude de mesure

- Tenir compte de l'incertitude de mesure lors de élaboration de recommandations en fonction d'objectifs cliniques
- Faire prendre conscience aux clinicien des notions de variabilité biologique et analytique : aide à l'interprétation des résultats

# Calcul de l'incertitude de mesure

- Modus pour les LABM : 4 catégories de sources d'incertitude :
  - Incertitude liée à l'étalonnage : traçabilité fournie par le fabricant avec l'incertitude de mesure associée
  - Mesure : (incertitude sur dilutions, mesure du signal, facteur de correction, dérive de l'instrument, numérisation des données, ...) fidélité intermédiaire (obtenue à partir du dossier de validation de méthodes ou CQI)
  - Spécimen biologique : variations biologiques intra ( $CV_I$ ) et inter-individuelles ( $CV_G$ )
  - Autres : interférences, ...

$$U_{\text{résultat}} = \sqrt{U_{\text{étalonnage}}^2 + U_{\text{méthode}}^2 + U_{\text{divers}}^2}$$

# Site de Westgard :

<http://www.westgard.com/>

Carmen RICOS : Biological variation database 5th edition : étude bibliographique

|    | Analyte                           | Biological Variation |       | Desirable specification |      |        |
|----|-----------------------------------|----------------------|-------|-------------------------|------|--------|
|    |                                   | CVw                  | CVg   | I(%)                    | B(%) | TE (%) |
| S- | Thyroglobulin                     | 0.2                  | 0.4   | 0.1                     | 0.1  | 0.3    |
| S- | Thyroglobulin antibody            | 8.5                  | 82.0  | 4.3                     | 20.6 | 27.6   |
| S- | Thyroid peroxidase antibody       | 11.3                 | 147.0 | 5.7                     | 36.9 | 46.2   |
| S- | Thyroid stimulating hormone (TSH) | 19.3                 | 19.7  | 9.7                     | 6.9  | 22.8   |
| S- | Thyrotropin receptor antibody     | 4.8                  | ---   | 2.4                     | ---  | ---    |
| S- | Thyroxine binding globulin (TBG)  | 4.4                  | 12.6  | 2.2                     | 3.3  | 7.0    |
| S- | Thyroxine (T4)                    | 4.9                  | 10.9  | 2.5                     | 3.0  | 7.0    |
| S- | C3 complement                     | 5.2                  | 15.6  | 2.6                     | 4.1  | 8.4    |
| S- | C4 complement                     | 8.9                  | 33.4  | 4.5                     | 8.6  | 16.0   |
| B- | CD4 lymphocyte count              | 25.0                 | ---   | 12.5                    | ---  | ---    |
| S- | Rheumatoid factor                 | 8.5                  | 24.5  | 4.3                     | 6.5  | 13.5   |

B : biais

I : fidélité intermédiaire

TE : erreur totale

# Incertitude de mesure

- **Détermination des objectifs**
  - Recommandations internationales d'ordre clinique
  - Sinon, établir pour chaque méthode des objectifs analytiques en utilisant
    - Variations biologiques des analyses : difficile en AI
    - État de l'art, CQE : peut-être à notre portée
- **Méthodologie possible**
  - Sélectionner les analytes pour lesquels l'approche de l'incertitude de mesure est pertinente (et possible)
  - Inventaire des techniques
  - Comparaison des CV, par type de technique
  - Echange d'échantillons : approche du biais
  - Etude statistique

# Incertitude de mesure ce qui peut être fait

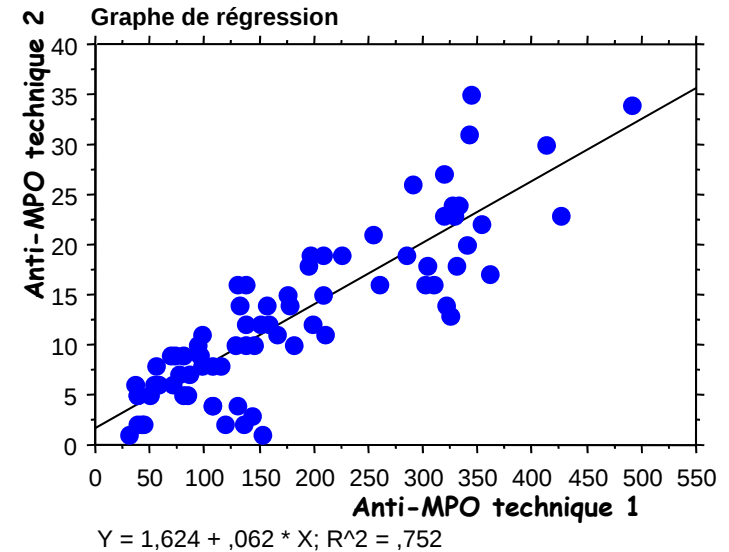
- Approche en estimant sa composante de fidélité (avec le contrôle de qualité interne) et sa composante de justesse (avec le contrôle de qualité externe :

$$\sqrt{ET^2 = (CV)^2 + (B)^2}$$

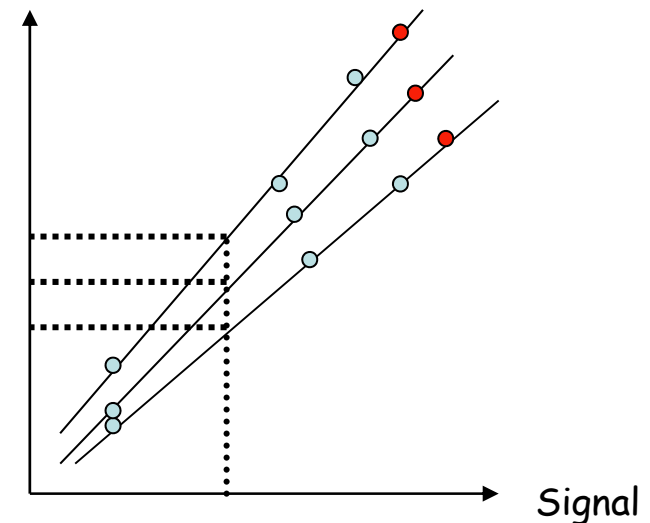
- Le coefficient de variation (CV) du contrôle de qualité interne permet d'obtenir l'estimation de la fidélité : trentaine de valeurs par niveau et par lot de contrôle.
- Le calcul du biais B
  - le plus souvent en l'absence de technique de référence et de standardisation.
  - Ensemble de résultats provenant d'un groupe de pairs :
  - calculer la moyenne des résultats d'un contrôle de qualité au sein de chaque laboratoire.
  - La moyenne des moyennes (ou à défaut la valeur du fabricant) représentera la « valeur vraie ».
  - Biais : différence entre la moyenne du laboratoire et cette « valeur vraie ».
  - On peut obtenir cette valeur en participant à un contrôle de qualité externe, mais il faut qu'il y ait suffisamment de participants utilisant la même technique

# Raccordement

- Lors d'un changement de technique, le raccordement doit être tracé.
- Si pas d'étalon international : la calibration des solutions étalons d'une trousse est effectuée avec les réactifs de cette trousse dans des conditions bien établies, pas transposable d'un kit à l'autre.
- Même si standard international : les résultats quantitatifs obtenus pas ou peu comparables le plus souvent.
  - Inclinaison de la courbe
  - Allure de la courbe
  - Cinétique
- Arguments de logique industrielle : sur automates et notamment techniques multiplexées, pour homogénéisation du rendu de résultat facteur de correction appliqué à l'étalonnage



Unité de mesure



Si indispensable au suivi, doser en parallèle le sérum précédent

Techniques qualitatives

# Réactifs

- Validation lot réactifs
- Conjugués :
  - Marquage CE : problème pour certains réactifs : pour les techniques « de pointe »
  - Achat dissocié lames/conjugué : validation
- Quid des techniques « maison » ? Validation obligatoire :
  - Dossier de validation de méthode complet et non plus « simple » vérification des déclarations fournisseurs
  - Durée de péremption
  - Etablissement des valeurs de références, ...(revue périodique et à chaque changement de technique ou de procédure pré-analytique)
  - Démonstration qu'elles sont au moins égales aux techniques marquées CE disponibles, ....

# CQ pour les techniques qualitatives

- CQI technique qualitative :
  - Il existe des CQ commerciaux, mais pas pour toutes les spécificités
  - Mais quid aspect, titrage en fonction des lames?
- Techniques semi-quantitatives d'IFI
  - Plusieurs niveaux de CQ ? Titres faibles ou élevés?
- Comparaisons interlabo :
  - Pour valider les CQI ?
  - Indispensable quand il n'existe pas de CQE établis
  - Comparaison au sein de groupes utilisateurs ?
- Modalités de conservation des témoins « maison » à valider

# Problème des anticorps rares

- Recherche des autoanticorps rares :
  - Immunodot
  - Petites séries d'ELISA
- Comment évaluer les performances ?
  - études statistiques de comparaisons de ses résultats avec l'aspect en IFI ou avec d'autres tests permettant l'identification de la cible
  - comparaisons inter-laboratoires ?
  - avec accès aux données cliniques, pour explorer les cas discordants.
- Le plus souvent, pas de matériel de contrôle commercial pour ces anticorps rares. : donc contrôle « maisons » provenant d'échantillons issus du diagnostic.
- Problème de la validation de lot,
  - nécessite également des matériaux de contrôles à passer systématiquement à chaque changement de lot,
  - démarche difficile économiquement surtout si changements de lots fréquents.
  - Etude de la démarche qualité du fournisseur tracée par un certificat d'analyse?

# Evaluation de l'incertitude de mesure

1. Analyse des facteurs susceptibles d'influencer le résultat de l'analyse
2. Détermination des principaux facteurs
3. Description des mesures préconisées pour en réduire l'influence.
  - Si certains facteurs sont considérés comme négligeables, le choix doit être justifié de manière précise et argumenté

- **Pour les techniques d'IFI avec titrage :**
  - peuvent être considérées comme des techniques semi-quantitatives
  - estimation de l'incertitude de mesure (surtout si suivi évolutif de la maladie ou la réponse au traitement)
  - Points 1, 2 et 3 + suivi de contrôle de qualité interne par le calcul du coefficient de variation sur le titre rendu ?
  - En pratique :
    - difficile, dans de petites séries, sur une lame, en plus du témoin négatif, plusieurs puits de titrage d'un témoin positif ;
    - Problème du niveau du témoin : proche du seuil, de titre moyen ou élevé ?
    - Doit-on en passer plusieurs ?

# La robustesse

- Paramètre qui donne lieu à diverses interprétations :
  - Définition : aptitude d'une technique à donner le même résultat avec différents utilisateurs, pour différents lots de réactifs et dans différentes conditions opératoires.
- En pratique, évaluée par des essais inter-laboratoires.
- S'il existe des publications sur cet aspect de la technique : références bibliographique
- Sinon : difficile à évaluer.

# Conclusions

- Validation de méthode dans le cadre de la démarche d'accréditation en auto-immunité est complexe mais passionnante.
- Questionnement sur notre pratique biologique quotidienne :
  - source de progrès techniques et biologiques
  - amélioration de la qualité du service rendu aux prescripteurs et aux malades
- Cependant, un travail important reste à faire
  - Avec les industriels afin d'améliorer la standardisation des méthodes.
  - Au sein de sociétés savantes afin de définir des règles de consensus de bonnes pratiques

# Références

- [1] Cofrac, Guide de validation de méthode, Document LAB GTA 04, Juin 2004.
- [2] Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicales : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de technique. Ann Biol Clin 1999;57:685-95.
- [3] Cofrac, Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale, Document LAB GTA 06, Juillet 2005.
- [4] Cofrac, Guide d'évaluation des incertitudes de mesure des analyses de biologie médicale, Document LAB GTA 14, Novembre 2006.

## Contexte réglementaire : validation de méthodes

- « La validation est toujours un équilibre entre les coûts, les risques, les possibilités techniques et le temps. »
- Si coffrets et réactifs utilisés strictement dans les conditions préconisées par le fabricant, méthodes considérées comme « normalisées » : le laboratoire doit uniquement valider (vérifier) la mise en application dans son environnement propre par rapport à des critères et limites acceptables fixées pour correspondre à l'attente des prescripteurs : *spécifications a priori*