DES RÉSULTATS D'ANALYSES À PRENDRE AVEC DES "PINCETTES" : QUELQUES PIÈGES DE L'INTERPRÉTATION EN BIOLOGIE CLINIQUE

N. CIELNIASZEK (1), J-P. CHAPELLE (2), J. COLLETTE (3), C. DEMARTEAU (4), A-M. FERIR (4), F. LUYCKX (5), J. GIELEN (6)

RÉSUMÉ : Comme toute démarche médicale, les résultats des analyses de biologie clinique sont affectés par des sources de variation qui peuvent influencer l'interprétation médicale. Les sources de variation sont traditionnellement subdivisées en deux groupes : variation analytique et variation biologique. Cet article se propose de présenter les sources de variation les plus courantes avec divers exemples. La notion de valeurs de référence sera également discutée, ainsi que le point de vue du clinicien face à l'interprétation d'un résultat de laboratoire.

PITFALLS IN THE INTERPRETATION OF CLINICAL CHEMICAL LABORATORY RESULTS

SUMMARY : Like other medical investigations, laboratory tests are not free from uncertainties or errors which limit their clinical value. Usually two levels of variations are identified : the analytical and biological levels. This paper presents some sources of variations and provides different examples. The concept of reference value is also discussed, as well as the clinician's viewpoint regarding the interpretation of laboratory results.

KEYWORDS : ***Clinical chemistry - Reference values - Quality control - Variability***

INTRODUCTION

Aussi délicate qu'elle puisse être, l'exécution d'une mesure n'a pas de fin en soi ; elle n'a un sens que si l'exploitation du résultat obtenu peut servir à porter un jugement ou à prendre une décision en définissant une quantité ou une qualité.

La variabilité des résultats d'un examen ou d'une analyse est un phénomène bien connu chez l'homme sain ou malade. C'est ainsi, par exemple, que des patients peuvent répondre de manière très différente à une même dose d'un médicament, ou que des mesures répétées de fréquence cardiaque ou de pression artérielle, même à quelques minutes d'intervalle, sont rarement identiques. La répétition d'une même analyse de laboratoire, dans des conditions qui semblent identiques, conduit à des résultats différents par suite de l'action de nombreux facteurs incontrôlés, connus ou non. L'identification et la compréhension de ceux-ci sont essentielles, pour que leurs effets puissent être réduits. Ces facteurs peuvent être classés en deux groupes : la variation analytique et la variation biologique, chacune d'entre elles présentant plusieurs composants (fig. 1).

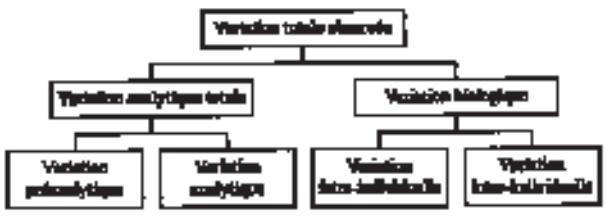

Fig. 1. Décomposition des facteurs de variation.

VARIATION PRÉANALYTIQUE

La variation préanalytique est la somme de toutes les sources de variation allant du prélèvement sanguin jusqu'à l'entrée de l'échantillon dans le système de mesure.

Le tableau I renferme une liste non exhaustive des facteurs de variation préanalytique.

Quelques exemples permettent d'illustrer l'importance de ces facteurs de variation.

Le choix du type de prélèvement influence la qualité d'un résultat de laboratoire. Les analyses sanguines peuvent se réaliser sur du sang complet (veineux, artériel ou capillaire), sur du plasma ou sur du sérum. Des anticoagulants sont

TABLEAU 1. FACTEURS DE VARIATION PRÉANALYTIQUE.

Facteurs liés au sujet
Repas
Heure de prélèvement
Consommation d'alcool
Prise de médicaments
Exercice
Posture
Facteurs liés au prélèvement
Garrot
Séparateur de sérum
Facteurs liés à l'échantillon
Nature de l'échantillon
Anticoagulants
Temps de contact avec le caillot
Transport
Conservation
Dilution
Hémolyse
Bilirubinémie
Lipémie
Clarification (processus servant à délipider un plasma lipémié)

(1) Aspirant spécialiste, (2) Chef de Service associé, (3) Chercheur qualifié, (4) Chef de laboratoire, (5) Chef de laboratoire adjoint, (6) Chef de Service, Département de Biologie Clinique, Service de Chimie Médicale, CHU Liège.

TABLEAU II. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DU PLASMA PAR RAPPORT AU SÉRUM.

AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Gain de temps	Contamination par des cations
Volume plus important	Interférences dans les dosages provoquées par des métaux se liant à l'EDTA et au citrate
Prévention des interférences dues à la coagulation	Interférences dans les dosages immunologiques provoquées par le fibrinogène
Prévention des modifications de concentration induites par la coagulation	Interférences dans la distribution des ions entre le milieu intracellulaire et extracellulaire par l'EDTA ou le citrate

utilisés pour inhiber le processus de coagulation, de manière à garantir une variation aussi faible que possible du paramètre à mesurer par rapport à l'état *in vivo*. Ils agissent soit par fixation des ions calciques (EDTA, citrate), soit par leur activité antithrombine (héparine, hirudine). Il est donc essentiel que le sang soit mélangé avec l'anticoagulant immédiatement après le prélèvement ! Le tableau II résume les avantages et inconvénients de l'utilisation du plasma par rapport au sérum (1).

Parfois, les laboratoires reçoivent des prélèvements qui peuvent être qualifiés d'"incorrects", soit par exemple, parce que le tube contenant l'anticoagulant est insuffisamment rempli ou parce que le prélèvement a été réalisé au niveau d'une voie de perfusion. Les résultats obtenus sont alors loin de représenter la réalité. Les anomalies les plus fréquentes sont un taux d'hémoglobine anormalement bas (dilution de l'échantillon), un taux de digoxine toxique (prélèvement au niveau de la voie de perfusion), un temps de céphaline activée allongé (contamination via une voie héparinée), une demande de dosage de Lithium sur un tube anticoagulé par de l'héparinate de Lithium ou encore des concentrations en sodium et chlorures augmentées (prélèvement au niveau de la perfusion de NaCl). Toutes ces situations nécessitent un nouveau prélèvement, ce qui allonge le délai de transmission des résultats.

L'intervalle de temps entre le prélèvement sanguin et l'analyse est un problème important qui peut avoir une incidence sur les résultats obtenus. Les conditions de conservation de l'échantillon telles que la température de stockage, l'exposition à la lumière ou la séparation du plasma des globules rouges peuvent également diminuer la fiabilité des résultats (2, 3). Par exemple, dans du sang total conservé à température ambiante pendant quatre heures, outre la diminution de la concentration en glucose et l'augmentation de celle en lactate et en ammoniaque, on note une diminution du taux de bilirubine, liée à l'exposition à la lumière. L'étude du temps de conservation du plasma en fonction de la température de stockage met en évidence l'instabilité d'enzymes comme les transaminases et les phosphatases alcalines. Une augmentation des phosphates inorganiques est toujours retrouvée. D'une manière générale, le plasma ou le sérum doit être séparé des cellules aussi rapidement que possible, et certainement endéans les 2 heures qui suivent le prélèvement.

En gazométrie sanguine, les précautions préanalytiques sont également essentielles (4) et dépendent non seulement du traitement de l'échantillon, mais aussi du patient avant et pendant le prélèvement. Avant la prise d'un échantillon, il convient de rassurer le patient afin d'éviter qu'il hyper- ou hypoventile. Si le patient est sous respirateur artificiel, il faut s'assurer que des réglages n'ont pas eu lieu endéans les 30 minutes qui précèdent le prélèvement. Si la mesure est, ou risque d'être différée, il faut prévoir un récipient contenant de l'eau glacée et garantissant la conservation de l'échantillon entre 1 et 5°C jusqu'à l'analyse. En effet, les gaz du sang, le pH, les teneurs en glucose et en lactate varient si l'échantillon reste à température ambiante pendant plus de 5 minutes. Entre 1 et 5°C, les valeurs restent stables durant 2 h au maximum. Il ne faut pas oublier que le sang hépariné reste un milieu vivant et consomme donc de l'oxygène et du glucose tout en produisant du CO_2 et du lactate !

Chez un adulte, le passage de la position couchée à la position debout entraîne une réduction du volume sanguin de 10 % (600 à 700 ml) parce que les liquides libres de protéines traversent les capillaires vers les tissus. Ce changement de position provoque une augmentation subséquente (8 à 10 %) de la concentration plasmatique des protéines incluant les enzymes et les hormones protéiques, mais aussi des composants tels que des médicaments, le calcium ou la bilirubine qui circulent partiellement liés aux protéines. Par ailleurs, l'alitement prolongé entraîne une rétention hydrique et les concentrations des protéines et albumine sériques peuvent décroître respectivement d'une moyenne de 5 et 3 g/l. La pose prolongée d'un garrot influence également la concentration des protéines ou des paramètres liés aux protéines. Le tableau III reprend les exemples les plus significatifs (5, 6).

L'hémolyse est une rupture de la membrane des globules rouges, qui engendre la libération de l'hémoglobine. Lorsque la concentration de celle-ci est supérieure à 20 mg/dl, le sérum prend une coloration rosée. Les interférences

TABLEAU III. EFFETS DE L'HÉMODYNAMIQUE SUR QUELQUES PARAMÈTRES DE CHIMIE.

	Position debout	Garrot (3 min vs 1 min)	Garrot 10 min
Protéines totales	+7 à 9%	+5%	+10 à +23%
TGO	+5%	+9.5%	---
TGP	+14.5%	+1.5%	+20%
PAL	+11%	NS	NS
Cholestérol	+10%	+5%	+22%

NS : non significatif

provoquées par l'hémolyse peuvent être classées en 3 catégories (7) :

- Les globules rouges libèrent du matériel intracellulaire entraînant une modification de la concentration d'analytes dans le sérum ou le plasma. Si l'analyte en question est présent à une concentration plus élevée dans les érythrocytes que dans le plasma, le résultat de l'analyse sera faussement élevé (potassium, LDH, NSE). Si, par contre, la concentration dans les globules rouges est plus basse, le plasma sera dilué et le résultat du dosage sera trop bas (chlorures).

- L'hémolyse provoque une augmentation considérable de l'absorbance dans les courtes longueurs d'onde du spectre visible.

- L'hémoglobine peut interférer avec certaines réactions chimiques, par exemple en inhibant la diazotation lors du dosage de la bilirubine.

La concentration de nombreux analytes est influencée par la prise des repas. Les paramètres les plus sensibles sont le glucose, les triglycérides et l'insuline dont les concentrations augmentent après un repas (8). Un repas riche en protéines accroît la synthèse et la concentration sérique de l'urée. Des habitudes alimentaires à long terme peuvent aussi influencer de manière significative la concentration de certains paramètres biochimiques. Un exemple bien connu est l'effet d'un excès d'acides gras saturés sur la concentration en cholestérol-LDL. Le tableau IV présente quelques exemples de paramètres influencés par le repas et l'alcool (6).

Les interférences provoquées par les médicaments, à l'origine de variations des résultats de laboratoire, sont répertoriées en deux catégories, suivant qu'elles découlent de leur action *in vivo* ou *in vitro* (9). Les premières sont les plus fréquentes. Elles sont dues à des effets directs ou indirects sur des processus physiologiques ou à des effets pathologiques. Par exemple, les glucocorticoïdes diminuent la concentration plasmatique en cortisol en inhibant la sécrétion d'ACTH. Les diurétiques thiazidiques diminuent la kaliémie en augmentant l'excrétion rénale du potassium (10). D'autre part, chez les femmes sous contraceptifs oraux, une augmentation nette de la TGP et des triglycérides ainsi qu'une diminution des phosphatases alcalines et de l'acide folique sont observées. Chez les personnes sous traitements anticonvulsivants, on observe une augmentation très marquée de la concentration de certaines enzymes plasmatiques (GGT, TGP et PAL) et une diminution très sensible de la bilirubine.

TABLEAU IV. INFLUENCE DU REPAS ET DE L'ALCOOL SUR LA CONCENTRATION DU GLUCOSE, DES TRIGLYCÉRIDES, DES PHOSPHATES ET DE LA BILIRUBINE TOTALE.

	Repas	Alcool
Glucose	+10 à 40%	+20 à 50%
Triglycérides	+ 60%	Jusqu'à +100%
Phosphates	+8 à 15%	-8%
Bilirubine totale	+10 à 20%	NS

Les interférences avec les analyses *in vitro* résultent, par exemple, d'inhibition de la production d'un signal ou de l'interaction avec l'analyte en question, entraînant un signal faussement élevé.

VARIATION ANALYTIQUE : CE QU'ON VOUS CACHE

Il est bien établi que chaque résultat de mesure est entaché d'une erreur. En fait, il n'est qu'une estimation de la valeur vraie, laquelle reste toujours inconnue. Les méthodes statistiques relatives au traitement des erreurs sont bien connues et la préoccupation du laboratoire est de maintenir cette variabilité analytique au niveau le plus bas.

Traditionnellement, on distingue deux types d'erreurs : l'erreur aléatoire et l'erreur systématique. On appelle erreur aléatoire les fluctuations des résultats des mesures que l'on ne peut pas contrôler. Les sources de variation responsables de l'erreur dite aléatoire n'ont rien d'aléatoires, chaque effet ayant une cause. Simplement, les causes étant nombreuses, agissant en sens divers et étant indépendantes les unes des autres, la dispersion des résultats se présente comme une distribution gaussienne. Il ne s'agit donc pas de l'effet du hasard mais d'une distribution à laquelle on peut affecter un modèle, celui de la distribution normale.

En pratique, la maîtrise de l'erreur aléatoire est effectuée par des mesures répétées sur des échantillons de contrôle dont la moyenne et l'écart-type ont été déterminés au préalable. Les mesures sur les échantillons de patients sont précédées et suivies de mesures réalisées sur ce matériel de contrôle. Ces procédures constituent le contrôle de qualité interne des laboratoires. L'incidence de l'erreur aléatoire sur l'interpréta-

tion médicale est variable selon les paramètres. Cette incidence et la communication au prescripteur de la dispersion inévitable des résultats des mesures seront discutées dans le chapitre *"Interprétation du clinicien"*.

L'erreur systématique est d'un autre type. Elle représente l'écart systématique entre le résultat de la mesure et la vraie valeur. Une technique peut être très reproductible, affectée d'une erreur aléatoire très faible, et donner des résultats systématiquement trop élevés ou trop bas par rapport à la vraie valeur. La participation à des contrôles externes permet de détecter ces erreurs systématiques. L'utilisation de matériel de calibration adéquat permet, en général, de réduire l'erreur systématique.

Des recommandations internationales en matière de précision et d'exactitude sont fréquemment proposées. A titre d'exemple, le tableau V reprend les recommandations de C.G.Fraser (11) pour quelques tests.

Ces recommandations sur la précision sont établies sur base de la variation biologique intra-individuelle (la règle étant : $CV_a < 1/2\ CV_i$) (CV_a = coefficient de variation analytique, et CV_i = coefficient de variation intra-individuelle) ou sur base de l'état de l'art, tenant compte de 20 % des meilleures performances des laboratoires. La première méthode, basée sur la variation intra-individuelle, paraît justifiée : il est logique que la variation analytique soit inférieure à la variation intra-individuelle. La performance ainsi définie conduit pour certains paramètres à une quasi-impossibilité technique et, pour d'autres, définit une exigence très peu astreignante. Par exemple, atteindre une précision de 0,7 % sur la détermination des chlorures est très malaisé alors que l'on peut mesurer le taux de triglycérides avec une précision de l'ordre de 2 à 3 %. Une recommandation basée sur les meilleures performances des laboratoires est, en général, un peu moins contraignante (par exemple 1% sur la mesure des chlorures), la composante technique étant alors prise en compte. Ces deux manières de définir la précision souhaitable ne tiennent cependant pas compte des besoins de la clinique. Nous examinerons l'avis des cliniciens dans le chapitre *"Interprétation du clinicien"*

TABLEAU V. PRÉCISION ET EXACTITUDE RECOMMANDÉES POUR QUELQUES PARAMÈTRES BIOLOGIQUES.

Test	Précision recommandée en CV% (erreur aléatoire)	Exactitude recommandée en CV% (erreur systématique)
Créatinine	2.2	2.8
Glucose	2.2	1.9
Potassium	2.4	1.6
Chlorures	0.7	0.5
Triglycérides	11.5	15.6
Digoxine	3.8	3.9
Hémoglobine	1.2	1.2
Cortisol	7.6	10.3
PSA	9.1	18.7

L'évaluation externe de la qualité peut être considérée comme un contrôle d'exactitude. En Belgique, la participation aux contrôles externes, organisés par l'Institut de la Santé publique (ISP), attaché au Ministère des Affaires Sociales, de la Santé publique et de l'Environnement, est obligatoire. La méthode d'évaluation de la qualité des laboratoires est basée sur le calcul de deux "scores" : le z-score ([1]) qui représente la situation d'un résultat par rapport à l'ensemble des résultats et l'u-score ([2]) qui est utilisé en définissant des limites fixes acceptables. Les limites sont basées sur la variation biologique en biochimie et sur les résultats des meilleurs laboratoires pour les immunoessais. Le tableau VI reprend quelques valeurs (%) du seuil d'acceptabilité pour certains paramètres biologiques.

TABLEAU VI. VALEURS (%) DU SEUIL D'ACCEPTABILITÉ POUR CERTAINS PARAMÈTRES BIOLOGIQUES.

Test	Seuil d'acceptabilité (ISP) u-score en %
Créatinine	8.3
Glucose	14
Potassium	8
Chlorures	3
Triglycérides	20
Digoxine	24

Cette méthode de calcul peut avoir des effets pervers. Lorsqu'une méthode est très performante, l'écart-type est très faible et une petite variation se répercute sur le z-score. Par exemple, un résultat de potassium rendu à 6,80 mmol/l au lieu de 7,05 mmol/l peut conduire à un mauvais z-score vu la valeur très faible de l'écart-type. Par contre, un résultat de créatinine trouvé à 38,9 mg/l au lieu de 35.6 mg/l donnera un bon z-score, vu la dispersion, mais un mauvais u-score car l'écart est supérieur à 8,3 %.

VARIATION BIOLOGIQUE

Les sources de variation biologique peuvent provenir du sujet lui-même (variabilité intra-individuelle CV_i) ou de la variation entre les sujets (variabilité inter-individuelle CV_g).

([1]) z = (X-M/SD) où M et SD sont respectivement la médiane et l'écart-type des résultats fournis par les laboratoires utilisant la même méthode pour le test X.
([2]) u = (X-M/M) x 100

TABLEAU VII. FACTEURS DE VARIATION BIOLOGIQUE.

Age	Fièvre	Obésité
Agression	Froid	Poids
Aliments	Grossesse	Position debout
Altitude	Grossesse gémellaire	Pression sanguine
Apesanteur	Groupe sanguin	Race
Bruit	Hypoxie	Repas
Caféine	Immobilisation couchée	Rythmes biologiques
Cécité	Etat à jeun	Rythmes circadiens
Chaleur	Jeûne	Rythmes hebdomadaires
Déficit en vitamine B6	Lactation	Rythmes saisonniers
Entraînement	Médicaments	Sexe
Environnement	Ménopause	Tabac
Exercice musculaire	Menstruation	Taille
Exposition à la lumière	Nicotine	

Des tables de moyennes de coefficients de variation (CV_i et CV_g) pour de nombreuses analyses de laboratoire ont été publiées au travers de nombreux travaux (12-14).

Le tableau VII présente une liste de facteurs de variation biologique pouvant influencer les résultats des examens de laboratoire.

La variation biologique intra-individuelle se définit comme la variation aléatoire d'une "valeur physiologique autour d'un point d'équilibre". Cette variation contribue à l'imprécision totale des mesures et doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats. Elle peut être mesurée en collectant une série d'échantillons à partir d'un groupe d'individus comparables, sur une période déterminée (typiquement quelques semaines), dans des conditions telles que les autres sources de variation soient minimisées (9). Les échantillons sont correctement identifiés et conservés de manière optimale. Ils sont alors analysés en double dans une même série. Le problème principal de ce type d'étude est le recrutement d'un nombre suffisant de volontaires; bien souvent, ces variations intra-individuelles sont néanmoins mesurées sur de petites populations.

L'imprécision analytique est calculée à partir des différences entre les analyses réalisées en double et donnée par l'équation suivante où n représente le nombre de paires de données :

$$SD_a = \sqrt{\frac{\Sigma(\text{différence})^2}{2n}}$$

La déviation standard (SD) d'une série de paires de données pour chaque individu peut être calculée. Elle englobe la variation analytique et la variation intra-individuelle (SD_i).

$$SD = \sqrt{SD_a^2 + SD_i^2}$$

Les variations analytique et intra-individuelle étant connues, il est possible de déterminer la variation inter-individuelle (SD_g) en calculant la déviation standard pour toutes les paires de données pour tous les sujets de l'échantillon puisque cette déviation standard est donnée par l'équation :

$$SD = \sqrt{SD_a^2 + SD_i^2 + SD_g^2}$$

Quelques exemples tirés de l'article de Ricos et coll. (14) illustrent la variabilité biologique (tableau VIII).

TABLEAU VIII. VARIABILITÉ BIOLOGIQUE DE QUELQUES PARAMÈTRES DE BIOCHIMIE.

Analyte	Variation (%)	
	Intra-individuelle	Inter-individuelle
Fer	26.5	23.2
Glucose	6.5	7.7
Lactate	27.2	16.7
Potassium	4.8	5.6
Triglycérides	21.0	37.2
Urée	12.3	18.3

Variation intra-individuelle

La variabilité intra-individuelle est celle qui est due à l'individu lui-même au cours du temps; elle inclut tous les phénomènes de régulation, notamment les rythmes biologiques, le vieillissement et le statut nutritionnel.

De nombreux paramètres sanguins présentent des variations cycliques ou circadiennes pendant la journée. Par exemple, la concentration en fer sérique peut varier jusqu'à 50 % de 8h00 à 14h00. Le cortisol présente une variation diurne bien connue. Sa concentration sérique est au plus bas vers minuit; elle augmente rapidement pour atteindre un pic vers 8-9h00 puis décroît au cours de la journée (8). De plus, certaines hormones telle l'hormone de croissance, sont l'objet d'une sécrétion pulsée. La fréquence et la durée de la période de prélèvements doivent être adaptées en fonction de plusieurs facteurs, notamment la durée de vie de l'hormone étudiée et les caractéristiques supposées des "pulses" à détecter : plus la clairance hormonale est rapide, plus la fréquence des pics de sécrétion est élevée et plus les prélèvements doivent être rapprochés (15). Lors d'un monitorage thérapeutique (par exemple, dosage de la digoxine ou du temps de Quick lors d'un traitement par les anti-vitamines K), l'intervalle entre le moment de l'administration du médicament et celui du prélèvement est très important et devrait être connu.

L'obésité est souvent associée à une augmentation des concentrations sériques du cholestérol, des triglycérides et des β-lipoprotéines. Le taux

d'acide urique est aussi augmenté, spécialement chez les sujets de plus de 80 kg (8). D'autres paramètres sont aussi influencés par l'excès pondéral: on peut observer une augmentation des LDH, du glucose, de la créatinine, du cortisol, de l'insuline ainsi qu'une diminution des phosphates, de l'hormone de croissance, de la testostérone.

Variation inter-individuelle

La variabilité inter-individuelle concerne l'ensemble des variations au sein d'une population, mises en évidence lors d'études portant sur des groupes d'individus. Lorsque la population est hétérogène, elle est habituellement subdivisée, de manière à réduire cette hétérogénéité.

Pour beaucoup de paramètres biochimiques, les valeurs de référence ne varient pas avec l'âge. Dans le cas contraire, il est essentiel que les données analytiques soient comparées avec des valeurs de référence appropriées. En général, les individus sont répartis en 4 groupes : les nouveau-nés, les enfants jusqu'à la puberté, les adultes et les personnes âgées. C'est ainsi que l'activité des phosphatases alcalines est plus élevée chez les enfants, particulièrement pendant la puberté, que chez les adultes. Le sexe du patient influence aussi certains paramètres de laboratoire. Il existe des différences évidentes dans les concentrations des hormones entre les hommes et les femmes adultes, mais d'autres analytes sont concernés, souvent parce que leur métabolisme est influencé par ces hormones. Par exemple, la concentration du cholestérol est plus élevée chez les hommes sains que chez les femmes jusqu'à la ménopause, puis la concentration chez la femme tend à augmenter.

La grossesse n'a pas seulement un effet sur la production et la concentration de nombreuses hormones. Elle modifie également d'autres paramètres sanguins : des augmentations sont décrites pour certaines protéines (lipoprotéines, céruloplasmine), pour la vitesse de sédimentation et pour les triglycérides; des diminutions se rencontrent pour l'hémoglobine, le fer sérique et la plupart des électrolytes (15, 16).

L'influence de l'exercice physique sur la composition des fluides corporels est en relation avec la durée et l'intensité de l'activité. La créatine kinase peut varier considérablement sous l'influence de facteurs tels que l'exercice physique, surtout violent, ou les chocs traumatiques, au cours des trois jours précédant la prise de sang. Des variations de la créatininémie (+21 à 26 %) et des TGO (+ 40 à 300 %) peuvent être observées après un effort physique intense (6).

VALEURS "DE RÉFÉRENCE" ET NON "VALEURS NORMALES"

La notion de valeurs de référence a remplacé celle de valeurs normales. Les laboratoires ont l'obligation de fournir aux prescripteurs des valeurs de référence, comme une aide à l'interprétation. Chaque laboratoire est tenu d'établir ses propres valeurs de référence ou de vérifier, sur un échantillonnage suffisant, les valeurs fournies par un fabricant ou issues de la littérature.

Traditionnellement, les valeurs de référence sont établies sur un groupe de sujets en bonne santé en retenant l'intervalle central à 95 %. Pour de nombreux tests, il est tenu compte de l'âge et du sexe. L'intervalle des valeurs de référence représente alors la variation inter-individuelle de chaque paramètre dans la population observée. Cette méthode suppose que les valeurs proviennent d'une distribution gaussienne ou qu'elles peuvent être transformée en distribution gaussienne par un changement de variable. Dans la réalité, les distributions sont souvent dissymétriques et le recours à des méthodes non paramétriques s'impose.

Etablir des valeurs sur une population de référence n'est pas chose aisée. Il est courant d'avoir recours au personnel du laboratoire, à des donneurs de sang ou d'utiliser les bases de données du laboratoire avec de sévères critères d'exclusion. Chaque méthode peut être affectée de biais, variable selon les tests. La question des valeurs de référence en pédiatrie est particulièrement difficile.

Les valeurs de référence ne correspondent pas toujours aux limites de décision médicale. Les cliniciens en sont généralement conscients mais les patients qui prennent connaissance d'un protocole de biologie clinique peuvent s'inquiéter de résultats qu'ils interprètent comme anormaux et significatifs d'un état pathologique.

Sous le titre "Réviser le concept de valeurs de référence : une nécessité" (17), un groupe d'auteurs bien connus pour leurs travaux dans le domaine propose une critique documentée de la notion de valeurs de référence et plusieurs suggestions concernant les informations à mettre à la disposition des prescripteurs grâce aux progrès des techniques d'information et de communication : seuil d'alerte, consultation en ligne des facteurs de variation et des interactions médicamenteuses, historique individuel des patients, intervalle de référence bivarié pour des grandeurs liées. Cette approche nécessiterait néanmoins une bonne collaboration entre le laboratoire et la clinique.

L'INTERPRÉTATION DU CLINICIEN : RÉSULTATS D'UNE ENQUÊTE

Le clinicien est généralement bien informé des variations biologiques mais ne connaît pas les sources de variation analytique, données confinées dans les laboratoires. De plus, il sous-estime souvent l'importance de la phase préanalytique (prélèvement, conservation …). Par l'expérience, il apprend à ne pas tenir compte de petites fluctuations dans les résultats des mesures.

Les publications relatives à la qualité analytique des mesures de laboratoire sont nombreuses mais déjà anciennes. Ces publications ont servi de "guidelines" pour les laboratoires, en proposant une erreur analytique médicalement acceptable. Basées sur les résultats des contrôles de qualité interlaboratoires, ou sur l'intervalle des valeurs de référence, ou calculées à partir de la variation biologique intra- et interindividuelle, ces propositions ne tiennent pas compte de l'avis du clinicien face à une décision médicale ni, d'ailleurs, des difficultés techniques à rencontrer parfois la performance souhaitée (18-21).

En 1985, une approche différente a été menée par Skendzel et coll. (22) avec un questionnaire adressé à certains membres de l'American Medical Association, tirés au sort parmi des généralistes et des spécialistes. La population de cliniciens comprenait 124 généralistes, 83 chirurgiens, 116 hématologues, 203 internistes, 86 pédiatres et 133 pathologistes. Le percentile 50 était retenu comme point de référence. Le questionnaire, composé de 25 questions, comprenait la description sommaire d'une situation clinique et un résultat de laboratoire initial. Les situations cliniques étaient de trois types : tests de routine réalisés chez des sujets en bonne santé et asymptomatiques, tests réalisés chez des patients présentant des troubles divers, analyses réalisées dans le cadre d'un suivi thérapeutique. Le clinicien était chargé d'indiquer le plus petit changement dans le résultat d'une analyse qui le conduira à entreprendre une action telle que demander des examens complémentaires, modifier un traitement ou envisager un autre diagnostic.

A titre d'illustration, voici cinq questions faisant partie de l'enquête ainsi que les conclusions des cliniciens :

Un patient qui ne présente pas de plaintes particulières subit des examens biologiques comprenant la détermination de la TGO plasmatique. *Si les valeurs de référence du laboratoire vont de 15 à 30 UI/l, quelle est la plus petite valeur qui vous amènera rapidement à demander des tests complémentaires ou à entreprendre une exploration pour rechercher la cause de ce résultat ?*

Réponse (percentile 50) : 43 UI/l

Coefficient de variation médicalement utile ([1]) : 26.3%

Précision interlaboratoire (percentile 50) : 7.2%

Une biopsie hépatique est prévue pour confirmer une cirrhose. La valeur de référence du temps de prothrombine est > 12 sec. (> 80 %). *Pour quel résultat de temps de prothrombine annulerez-vous la biopsie ?*

Réponse (percentile 50) : 15 sec (47%)

Coefficient de variation médicalement utile : 15.2%

Précision interlaboratoire (percentile 50) : 3.3%

Le taux de créatinine d'un insuffisant rénal de 55 ans est de 30 mg/l. *Quel est le résultat le plus bas qui vous convaincra d'une détérioration de sa fonction rénale ?*

Réponse (percentile 50) : 35 mg/l

Coefficient de variation médicalement utile ([2]) : 10.1%

Précision interlaboratoire (percentile 50) : 3.5%

Un homme de 41 ans est admis pour ulcère gastrique. Il est transfusé et la valeur de l'hématocrite s'élève à 42%. *Quelle est la nouvelle valeur qui vous amènera à conclure au saignement et à envisager une autre transfusion ?*

Réponse (percentile 50) : 37%

Coefficient de variation médicalement utile : 4.9%

Précision interlaboratoire (percentile 50) : 1.6%

Un homme de 55 ans, hypertendu et insuffisant cardiaque, reçoit des diurétiques. Le potassium sérique est de 3.8 mmol/l. *Quelle est la valeur de potassium à partir de laquelle vous augmenterez le potassium par voie orale ?*

Réponse (percentile 50) : 3.4 mmol/l

Coefficient de variation médicalement utile : 4.8%

Précision interlaboratoire (percentile 50) : 2.1%

La conclusion de l'enquête montre que les cliniciens prennent en compte un changement assez large des résultats et que la précision rencontrée dans les laboratoires est très inférieure à ce seuil de décision. Nous voici donc tous rassurés ! On peut cependant ajouter quelques commentaires concernant ces données qui prennent en compte le percentile 50, à la fois, pour les réponses des cliniciens et les résultats de la précision interlaboratoire : cela signifie que 49 % des médecins prennent une décision sur des écarts de mesure plus faibles et, comme la dispersion n'est pas mentionnée, on n'est pas sûr que les exigences

([1]) L'écart entre la limite supérieure des valeurs de référence (non soumise à une erreur de mesure) et la valeur proposée est exprimée en déviation standard en divisant par 1.645 qui correspond au percentile 95 d'une distribution gaussienne. Le coefficient de variation est le rapport entre la déviation standard et la limite supérieure des valeurs de référence. L'hypothèse nulle est qu'il n'y a pas de différence entre les deux valeurs.([2]) Lorsque les deux valeurs considérées sont entachées d'une erreur de mesure, la variabilité de la différence est doublée. La valeur 1.645 est remplacée par 32 x 1.645 tandis que la moyenne des deux mesures est prise en compte.

cliniques ne sont pas parfois dangereusement proches de la variation analytique observée sur les mesures. La précision interlaboratoire est aussi exprimée pour le percentile 50 c'est-à-dire que 49 % des laboratoires présentent une variabilité plus importante que celle qui est mentionnée.

On peut calculer la différence significative (delta critique) entre deux résultats en tenant compte de la variation analytique et de la variation intra-individuelle pour le test considéré (23).

$$\text{Delta critique} = K\sqrt{CV_a^2 + CV_i^2}$$

K : facteur qui dépend du niveau de probabilité choisi (K=2.77 pour p= 0.05)

CVa : coefficient de variation analytique

CVi : coefficient de variation intra-individuelle

Calcul du coefficient de variation médicalement utile pour la TGO (selon la première question) :

- la différence entre le taux proposé par les cliniciens et la limite supérieure des valeurs de référence est de 13 UI/l

- différence exprimée en déviation standard : 13/1.645 = 7.902

- CV médicalement utile : (7.902/30) x 100 = 26.34 %

Calcul du delta critique pour la TGO

Si le CVa est de 5 %, sachant que le CVi s'élève à 11.6 %, la valeur du delta critique est :

$2.77.\ \sqrt{5^2 + 11.6^2} = 34.99\ \%$

Si le laboratoire améliore ses performances et que le CVa devient 1 %, le delta critique diminue à 32.25 %.

On peut calculer le delta critique pour les tests concernés dans les questions, avec le CVa mentionné (tableau IX).

Si les deux méthodes qui permettent d'estimer une différence significative fournissent des résultats comparables pour la mesure du temps de prothrombine et de la créatinine, on observe une divergence pour la TGO, l'hématocrite et le potassium.

Le cas de la TGO est particulier, car il ne s'agit pas de comparer deux résultats, mais de donner une valeur qui sera considérée comme pathologique. Il ne nous paraît pas opportun de calculer sur ces données un coefficient de variation médicalement utile mais de se rapporter à la signification des valeurs de référence.

Les cas des mesures de l'hématocrite et du potassium se présentent différemment : selon l'avis des cliniciens, une valeur de potassium qui passe de 4.0 mmol/l à 4.2 mmol/l est médicalement significative alors que, si on tient compte du delta critique, la différence n'est significative qu'à 4.56 mmol/l. Sur la mesure de l'hématocrite, selon l'avis des cliniciens, une mesure de l'hématocrite qui, de 35.0 % devient 36.7 % est médicalement significative alors que, si on tient compte du delta critique, la différence n'est significative qu'à 38.1 %.

TABLEAU IX. CV MÉDICALEMENT UTILE ET DELTA CRITIQUE POUR LA TGO, LE TEMPS DE PROTHROMBINE, LA CRÉATININE, L'HÉMATOCRITE ET LE POTASSIUM.

Test	CV médicalement utile (%)	Delta critique (%)
TGO	26.3	38.2
Temps de prothrombine	15.2	14.3
Créatinine	10.1	15.3
Hématocrite	4.9	8.9
Potassium	4.8	14.0

Des différences non significatives risquent-elles d'être prises en compte par le clinicien ?

On voit mal le clinicien, au lit du malade, disposer des données nécessaires et calculer pour chaque paramètre le delta critique. N'est-ce pas plutôt le rôle du laboratoire de fournir l'information, par exemple par un signe montrant qu'un nouveau résultat est significativement différent du précédent ? Cela paraît aisé et réalisable automatiquement par un système informatique.

Si on examine le projet de plus près, on voit vite apparaître des difficultés : la première question à se poser concerne le coefficient de variation intra-individuelle. Cette valeur a-t-elle encore une signification dans des cas pathologiques ? Les évaluations ont été réalisées sur des populations de référence mais qui connaît, par exemple, le coefficient de variation intra-individuelle d'un patient qui montre un taux de 3.000 UI/l de TGO ? Est-il toujours de 11,6 % ? Un autre type de difficulté concerne la durée de vie d'une analyse : pour certains tests, un résultat qui date de deux mois peut être comparé au nouveau résultat. Pour d'autres tests, la comparaison n'a de sens que pour un résultat très proche dans le temps. En outre, la variation analytique varie aussi avec la valeur du paramètre : par exemple, dans l'article de Skendzel, la précision interlaboratoire pour la créatinine est de 7,4 % à la concentration de 10 mg/l et de 3,5 % à 30 mg/l. Enfin, les réponses des cliniciens varient selon les cas cliniques et prennent donc en compte des éléments dont le laboratoire ne dispose pas.

La norme européenne 17025 émise en 1999 concernant les laboratoires d'étalonnage et d'essais établit clairement que l'utilisateur d'un résultat de laboratoire doit être informé de l'incertitude sur les mesures. Sous quelle forme, en Biologie clinique, cette information doit-elle être transmise afin d'être utile ? Dans cette optique, une collaboration étroite et active entre les cliniciens et le laboratoire s'impose et toutes les suggestions seront les bienvenues.

CONCLUSION

Les sources de variation qui affectent le résultat d'une analyse de laboratoire sont très nom-

breuses et variées. Elles comprennent la variabilité préanalytique, allant du prélèvement au système de mesure, la variation analytique, issue de l'appareil de mesure lui-même, et la variation biologique liée à l'individu ou à la population. Les sources de variation préanalytique et intra-individuelles sont généralement bien connues des cliniciens. Par contre, les variations analytiques et inter-individuelles résultent plutôt de nombreux facteurs peu connus et à effets individuels limités. Ils répondent aux lois classiques de la statistique et nécessitent des systèmes de contrôle pour les réduire.

La variation analytique totale est, heureusement, souvent inférieure au seuil de décision des cliniciens par rapport à une valeur de référence. Néanmoins, dans un certain nombre de cas encore difficiles à déterminer, la variation analytique pourrait se rapprocher dangereusement de certaines exigences cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Guder WG, Ehret W, da Fonseca-Wollheim F, et al.— Serum, plasma or whole blood ? Which anticoagulants To Use? *J Lab Med*, 1998, **22**, 297-312.
2. Chevillon I, Larrose C, Moreau N, et al.— Conservation des échantillons de sang avant analyse des paramètres biochimiques les plus courants. *Ann Biol Clin*, 1998, **56**, 200-204.
3. Heins M, Heil W, Withold W.— Storage of serum or whole blood samples ? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, **33**, 231-238.
4. Mollard JF.— Précautions préanalytiques et matériel de prélèvement pour l'analyse des gaz du sang. *Ann Biol Clin*, 2000, **58**, 472-483.
5. Statland BE, Winkel P.— Effects of preanalytical factors on the intraindividual variation of analytes in the blood of healthy subjects : consideration of preparation of the subject and time of venipuncture. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*, 1977, **8**, 105-144.
6. Siest G, Henny J, Schiele F.— *Références en biologie clinique*. Elsevier, Paris, 1990.
7. Sonntag O.— Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1986, **24**, 127-139.
8. Young DS, Bermes EW.—Specimen collection and other preanalytical variables, in Burtis CA, Ashwood ER Ed., *Tietz, fundamentals of clinical chemistry*. Saunders, Philadelphia, 2001, 30-54.
9. Henry JB, Kurec AS.— The clinical laboratory : organization, purposes, and practice, in Henry JB Ed., *Clinical diognosis and management by laboratory methods*. Saunders, Philadelphia, 1996, 3-39.
10. Marshall WJ.— Acquisition of biochemical data, in Marshall WJ, Bangert SK Ed., *Clinical biochemistry : metabolic and clinical aspects*. Churchill Livingstone, New York, 1995, 7-14.
11. Fraser CG, Hyltaft P, Ricos C, et al.— Quality specifications, in Haeckel R. Ed, *Evaluation Methods in Laboratory Medicine*, 1993, 87-99.
12. Sebastian-Gambaro MA, Liron-Hernandez FJ, Fuentes-Arderiu X.— Intra- and inter-individual biological variability data bank. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1997, **35**, 845-852.
13. Fraser CG.— Biological variation in clinical chemistry. *Arch Pathol Lab Med*, 1992, **116**, 916-923.
14. Ricos C, Alvarez V, Cava F et al.— Current databases on biological variation : pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*, 1999, **59**, 491-500.
15. Solberg HE, Gräsbeck R.— Reference values. Advances in clinical chemistry, 1989, 27, 1-79.
16. Lind T.— Clinical chemistry of pregnancy. *Advances in clinical chemistry*, 1980, **21**, 1-24.
17. Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X et al.— Réviser le concept de valeurs de référence : une nécessité. *Ann Biol Clin*, 2001, **59**, 383-392.
18. Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Ricos C et al.— Proposed quality specifications for the acceptability of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1992, **30**, 311-317.
19. Ross JW.— Evaluation of precision, in Werner M Ed., *Handbook of Clinical Chemistry*. Boca Raton, CRC Press, 1982, 391-422.
20. Fraser CG.— The application of theoretical goals based upon biological variation in proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med*, 1988, **112**, 404-415.
21. Elevitch FR.— Proceedings of the 1976 Aspen Conference on analytical goals in clinical chemistry. CAP, Skokie, Illinois, 1977.
22. Skendzel LP, Barnett RN, Platt R.— Medically useful criteria for analytical performance of laboratory tests. *Am J Clin Pathol*, 1985, **83**, 200-205.
23. Costongs GM, Janson PC, Bas BM et al.— Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of clinical chemical laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1985, **23**, 7-16.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. J. Gielen, Service de Chimie médicale, CHU Sart Tilman, 4000 Liège.