

Utilisation du « référence change value » en biologie médicale : à propos de deux exemples : PSA-T et Hémoglobine

Camille Bouverot. ECPM-ESBS, Strasbourg

Stéphane Blachier. Biologiste Médical, groupe Oriade Noviale, Grenoble

Introduction

La première phase de l'interprétation d'un résultat d'analyse de biologie médicale (avant la confrontation aux données médicales) est faite en confrontant les valeurs obtenues à des intervalles dits « de référence » et en analysant l'évolution des résultats dans le temps. Si on considère la phase analytique maîtrisée, la pertinence de cette interprétation dépend :

- des valeurs de référence et ou des seuils de décision utilisés.
- de l'interprétation faite de l'évolution des résultats.

Sur ces deux points les données fournies par les laboratoires sont souvent moins maîtrisées (origine des valeurs de référence), laissant la place à une interprétation basée sur l'expérience et ne reposant pas sur des données statiques éprouvées.

L'interprétation de la variation d'un résultat par rapport à l'antériorité est encore plus subjective comme le témoigne l'étude interne menée auprès de 31 Biologistes de notre groupe et qui montre une grande hétérogénéité dans leur perception d'une évolution dite significative ($p < 0.05$) d'un résultat par rapport à son antériorité. Il est probable que cette hétérogénéité serait encore plus importante si des cliniciens avaient été interrogés (connaissances des données de performances analytiques moins maîtrisées).

Figure 1 : réponses des biologistes à la question suivante « à partir de quel taux considérez-vous qu'une valeur d'hémoglobine à 100g/L a significativement augmenté ($p < 0.05$) ? »

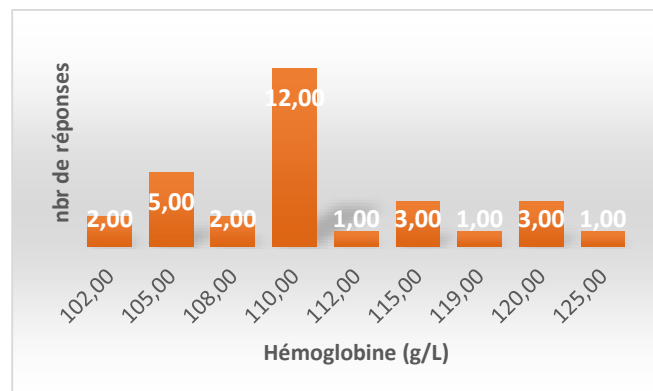
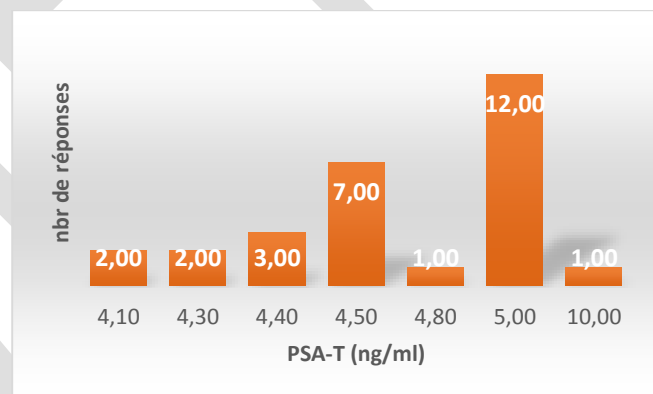


Figure 2 : réponses des biologistes à la question suivante « à partir de quel taux considérez-vous qu'une valeur de PSA-T à 4ng/ml a significativement augmenté ($p < 0.05$) ? »



De ces données nous constatons (en dépit de performances analytique maîtrisées), que l'interprétation basée sur les bornes de référence et sur les critères d'évolution d'un paramètre biologique ne permet pas l'interprétation optimisée du résultat.

Nous avons choisi au travers de deux exemples (PSA total et hémoglobine) d'illustrer le concept du RCV pour voir comment cet indicateur peut apporter de la pertinence dans l'interprétation des résultats et amorcer une réflexion sur son utilisation en pratique courante.

Mot-clés : variation intra-individuelle, variation analytique, Reference Change Value, prostate spécifique antigène, hémoglobine

Sources de variations non pathologiques :

Trois paramètres entrent en compte et peuvent causer une variation (non pathologique) de la concentration de certains paramètres biologiques :

1. Les variations biologiques intra-individuelles (CVi) : ce sont les fluctuations naturelles et physiologiques des constituants biologiques autour d'un point homéostatique qui est spécifique à chaque individu [2]
2. Les variations pré-analytiques (CVp). Les protocoles de standardisation mis en place dans les laboratoires permettent habituellement de considérer les variations pré-analytiques comme négligeables dans le cadre du calcul du RCV[1].
3. Les variations analytiques (Cva) qui sont relatives à la précision de la méthode de dosage utilisée. [1] Chaque laboratoire peut estimer les variations analytiques de ses appareils de mesure et dans ce cadre il convient de vérifier cette précision sur l'ensemble de la plage de mesure.

Intervalle de référence et index d'individualité :

Les valeurs de référence sont basées sur des études statistiques menées sur une population présumée saine et sont généralement fixées au 2.5ème et 97.5ème centile de cette population [2][12]. 5 % de cette population testée et à priori « normale » présente naturellement un taux supérieur à la borne haute basse ou haute de l'intervalle. Se référer uniquement aux intervalles de référence peut donc être source d'erreur d'interprétation (patients faussement anormaux).

Cet intervalle de référence est la résultante des valeurs des individus testés. Chacun possédant un point homéostatique et une dispersion des valeurs autour (Cvi). Selon les paramètres, le point homéostatique et la dispersion peut être plus ou moins importante et différente selon les individus et n'occuper qu'une faible partie de l'intervalle de référence de la population étudiée avec pour conséquence un risque de faux négatif [1].

Ce concept est illustré par l'index d'individualité (II) qui permet de quantifier ce phénomène. Quand la variation biologique intra-individuelle (CVi) pour un analyte est inférieure à la variation entre individus (CVg), on dit que cet analyte a une individualité marquée, son index d'individualité est alors faible.

$$II = \frac{\sqrt{CVa^2 + CVi^2}}{CVg}$$

En pratique, les technologies actuelles permettent de diminuer fortement le poids de la variation analytique par rapport à celui de la variation intra-individuelle, on simplifie donc souvent l'index d'individualité de la façon suivante :

$$II = \frac{CVi}{CVg}$$

On note que la plupart des analytes ont une forte individualité (II<1) [1], la dispersion des valeurs de référence individuelle est grande et peut conduire à ne pas détecter des états anormaux (faux négatifs).

Pour les rares analytes où l'individualité est faible II>1,4 les valeurs de référence individuelles sont homogènes entre individus et globalement superposée à celle de la population de référence, on peut considérer que les intervalles de référence sont une solution plus fiable, dans ce cas pour détecter une anormalité.

La stratification selon certains critères comme le sexe, l'âge, des facteurs comme la grossesse, le tabagisme... peu permettre de réduire l'individualité de certains paramètres et augmenter la pertinence et la fiabilité des intervalles de référence.

Calcul du RCV :

L'intervalle de référence est donc un outil plus ou moins parfait, selon l'individualité des paramètres, pour dépister des états biologiques « anormaux ».

L'interprétation d'un résultat doit également être réalisée en confrontant la valeur obtenue aux résultats précédant. Ainsi, deux résultats significativement différents de plus de la variation intra individuelle et de la variation analytique peuvent avoir une signification, et ceci même s'ils restent tous deux dans l'intervalle de référence. [3].

Pour établir qu'une variation entre un résultat et son antériorité est significative, il faut qu'elle soit supérieure à celle attendue en prenant en compte les facteurs de variations systématiques. Le modèle basé sur le calcul du Reference Change Value (RCV) ou valeur de référence pour un changement, permet de déterminer la probabilité qu'un résultat soit significativement différent de l'antériorité.

Les variations au carré sont additives. On peut donc estimer la variation totale CV_T comme suit :

$$CV_T^2 = CV_A^2 + CV_I^2 \text{ soit } CV_T = (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

$CV = (SD/moyenne) * 100$, SD étant la déviation standard de la série de mesure (l'écart type). [1]

On suppose que cette variation aléatoire autour d'une valeur moyenne, suit un modèle Gaussien. La probabilité que la valeur obtenue se situe dans l'intervalle $\pm Z*CV$ autour de la moyenne (où Z est le z-score bidirectionnel associé à la loi normale) est donnée par les tables de la loi normale. Par exemple, pour qu'un résultat soit significativement différent au seuil de 95 %, la valeur obtenue doit être supérieure ou inférieure à la moyenne $\pm 1,96*CV$. Quand on considère deux résultats successifs, ils ont tous deux une variation à un certain seuil de probabilité égale à $Z*CV$ donc la variation totale est

$$RCV^2 = (Z*CV)^2 + (Z*CV)^2 = 2*(Z*CV)^2$$

$$\text{soit } RCV = 2^{1/2}*Z*CV = 2^{1/2}*Z*(CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}.$$

$$RCV = Z * \sqrt{2(CV_I^2 + CV_A^2)}$$

Pour que deux résultats soient considérés comme différents, il faut que leur différence soit supérieure à la variation totale. Le RCV représente donc la différence limite entre deux résultats au-delà de laquelle la différence est considérée comme significative au seuil fixé.

La variation peut être appréhendée d'un point de vue statistique selon deux modèles : unidirectionnel ou bidirectionnel. Le bidirectionnel prend en compte des variations positives comme négatives, et est donc plus adapté à une utilisation générique, que le modèle unidirectionnel qui suppose qu'on s'intéresse à un seul sens de variation (augmentation ou diminution du taux). La différence entre deux résultats successifs est ainsi appréhendée en valeur absolue dans le modèle

bidirectionnel, comme écart relatif de la nouvelle valeur à celle de l'antériorité.

Lorsqu'on obtient une différence entre deux dosages, inférieure au RCV calculée au seuil de confiance fixé, on peut effectuer le calcul inverse afin de calculer la probabilité que le changement observé soit significatif. C'est-à-dire, selon la formule suivante, calculer le Z-score correspondant à la variation obtenue pour ainsi retrouver la probabilité dans les tables de la loi normale :

$$Z = \frac{\Delta x}{\sqrt{2(CV_I^2 + CV_A^2)}}$$

On note toutefois que le calcul du RCV présente plusieurs limites :

- La variation intra-individuelle est calculée par des études portant sur des sujets sains ; or la variation peut être différente pour les sujets malades, De plus, le calcul suppose que les variations intra-individuelles et analytiques sont purement aléatoires (la courbe décrit une gaussienne), or les résultats obtenus au cours d'une même journée peuvent être auto-corrélés, la variation intra-individuelle n'est donc pas toujours aléatoire. Négliger ce phénomène peut donner lieu à l'effet inverse donc considérer qu'une différence est due à la variation normale et augmenter ainsi le risque de « faux-négatifs », aux conséquences souvent plus importantes que l'inverse. On considère qu'en pratique, ces deux effets se compensent afin de pouvoir appliquer la formule du RCV.
- A partir de quel seuil considérer un changement comme à prendre en compte (significatif) ? le seuil de significativité classique de 95% ($p < 0.005$) est-il adapté à tous les paramètres ? toutes les situations ?
- Le RCV n'intègre pas non plus la durée séparant deux dosages et de ce fait ne prend pas en compte la cinétique dans le temps
- Pour toutes ces raisons le RCV est un modèle imparfait mais sans doute bien plus pertinent que des interprétations basées sur la perception individuelle et subjective de la variation entre deux résultats. Il constitue un outil complémentaire amenant un éclairage dans l'interprétation d'une variation de résultats.

Application au cas du PSA total :

- Variation intra-individuelle du PSA-total :

Dans le cas du PSA, les patients atteints de cancer de la prostate ne semblent pas présenter des variations intra-individuelles (CVi) significativement différentes des individus sains. [7][6] On note également une augmentation de la variation intra-individuelle du taux de PSA avec l'âge [6].

Prenant en compte ces critères, la variation intra-individuelle est estimée à 18,1% dans la méta-analyse de référence [10]. Cette valeur sera utilisée dans le calcul du RCV.

La variation analytique est, quant à elle, déterminée spécifiquement sur nos 2 unités analytiques (Cobas E801, Roche diagnostics).

- Variation analytique (CVa) du PSA total :

Matériel et méthode :

La précision analytique pouvant différer en fonction de la concentration en PSA dosée, il a donc été nécessaire de faire l'analyse sur une large gamme de concentrations. Les variations étant plus importantes pour des taux faibles, l'étude s'est concentrée sur ces derniers. Ainsi, des solutions de 11 concentrations comprises entre 0,03 ng/mL (qui correspond à la limite de quantification de l'appareil de mesure) et 7 ng/mL, ont été réalisées par dilution d'une solution mère correspondant au mélange des sérums de plusieurs patients. Chaque solution a ensuite été répartie en aliquotes de 500µL placés au congélateur. Les expériences ont été menées dans des conditions de reproductibilité strictes afin de minimiser les risques de variation dues à l'opérateur : les échantillons ont été sortis du congélateur 50 minutes avant d'être analysés et ont tous été prélevés et dosés dans des microgodets selon les mêmes conditions. Pour chacune des 11 solutions de concentrations différentes, 28 échantillons de 500 µL ont été analysés sur les 2 modules de dosage Cobas E801 avec le kit de dosage ayant pour référence 07027966190.

Résultats :

La précision analytique (CVa) est calculée pour chaque concentration et est donnée en pourcentage (figure 1.).

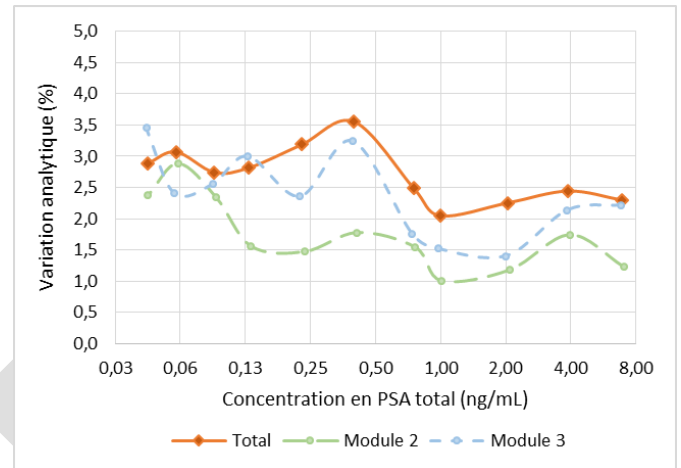


Figure 3. Variation analytique (CVa) du taux de PSA total de 11 concentrations différentes sur deux modules Cobas E801. CVa en pourcentage et concentration en ng/mL, échelle logarithmique en base 2.

La précision analytique observée varie de 2,05 % à 3,56 % selon la concentration. Le maximum est atteint pour une concentration de 0,4 ng/mL et le minimum pour une concentration de 1,0 ng/mL.

- Calcul du RCV

En prenant en compte la variabilité intra-individuelle de la méta-analyse donnée à 18,1%, on peut calculer RCV au seuil de 95 % pour les différentes concentrations testées (figure 2.).

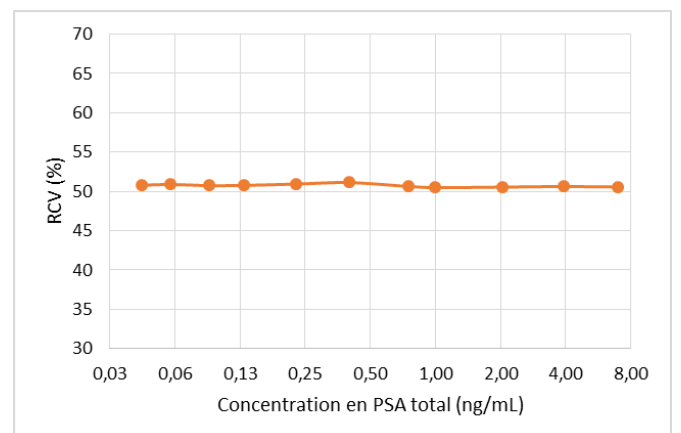


Figure 4. Reference Change Value (RCV) au seuil de 95% du taux de PSA total de 11 concentrations différentes sur deux modules Cobas E801. RCV en pourcentage et concentration en ng/mL, échelle logarithmique en base 2.

La RCV obtenu varie de 50,5 % à 51,1 % selon la concentration.

Discussion des résultats :

L'index d'individualité du PSA total calculé en utilisant les valeurs CV_i, et de CV_g données par la méta analyse de référence est retrouvé à 0.25 traduisant une forte individualité de ce paramètre [10].

Le RCV₉₅ obtenu est très proche de 50 %, ce qui correspond au RCV obtenu dans plusieurs autres études, [6] [8]. Au final le poids de la précision analytique par rapport au coefficient de variation intra individuel est faible (C_{va}/C_{vi}=0.20) et n'impacte que peu la valeur du RCV permettant d'appliquer une seule valeur de RVC pour l'ensemble de la gamme de mesure étudiée.

Afin de calculer le degré de signification d'un résultat à son antériorité, nous avons modélisé dans le middleware du laboratoire (MPL evo2, Roche Diagnostics) le calcul du Z-score. En fonction de ce Z-score, une phrase pré-enregistrée sera affichée sur le compte rendu. On pourra voir par exemple : « *La probabilité pour que la variation observée entre le résultat du jour et l'antériorité soit significative est estimée entre 85 % et 95 % (Calcul de probabilité intégrant la variation analytique du laboratoire et le coefficient de variation intra-individuel selon la formule du Référence Change Value).* »

Concernant Le taux de PSA des patients ayant subis une prostatectomie il semble plus pertinent de ne pas tenir compte de la variation intra individuelle et que seule la variation analytique soit prise en compte ; dans cette hypothèse le seuil de changement significatif (p<0.05) est retrouvé à 10%.

Nous permettons ainsi, à l'appuis de données mesurées d'apporter un complément à l'interprétation d'un résultat et à l'évolution du taux y compris dans la zone dite « normale ».

Application au cas de l'hémoglobine :

- Variation intra-individuelle de l'hémoglobine :

La variation intra-individuelle du taux d'hémoglobine a été fixée à 2,85 % par la méta-analyse de référence [10], la variation inter individuelle est de 6.8% et l'index d'individualité de 0.42 indiquant dans cet exemple également une forte individualité de ce paramètre».

- Variation analytique de l'hémoglobine :

Matériel et méthode :

La variation analytique de l'hémoglobine a été déterminée pour trois valeurs de concentrations couvrant la grande majorité de la plage des taux observés (58-184 g/L). Les variations analytiques correspondantes aux deux premières concentrations (58 g/L et 118 g/L) ont pu être déterminée grâce aux résultats des solutions de contrôle (lots de contrôles 91761101 et 91761102) utilisées quotidiennement pendant 3 mois sur 10 analyseurs de type XN Sysmex. Afin de couvrir tout l'intervalle de mesure de l'hémoglobine nous avons complété notre étude avec une concentration 184 g/L issue du mélange du sang de patients présentant un taux élevé d'hémoglobine dosé sur 4 automates : 30 valeurs ont été obtenues sur chaque automate, soit 120 valeurs au total.

Résultats :

Les lots de contrôles ont permis d'obtenir 450 valeurs pour la concentration 58,1 g/L, les CVa obtenues sur chaque automate sont compris entre 1% et 1,5%. Pour la concentration 117,8 g/L obtenue également à partir des lots de contrôles, 442 valeurs ont été obtenues, les CVa sont compris entre 0,8% et 1,4%. Pour la concentration 184 g/L réalisée manuellement, les CVa sont compris entre 0,8% et 1,1% ont été obtenues sur les 4 automates du plateau technique.

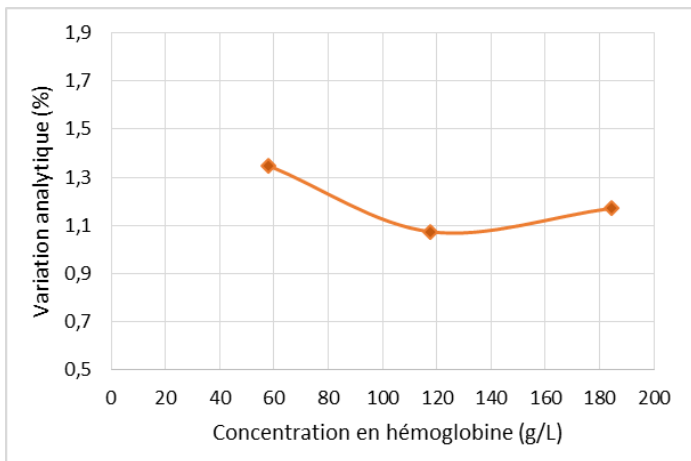


Figure 5. Variation de la précision analytique (CVa) du taux d'hémoglobine à 3 concentrations différentes sur les analyseurs de type XN Sysmex. CVa en pourcentage et concentration en g/L.

- Reference Change Value de l'hémoglobine :

Dans le cas de l'hémoglobine, le poids de la variation analytique par rapport à celui de la variation intra-individuelle est plus important que pour le PSA-T, en effet le rapport $CVa/CVi = 0,47$. La précision analytique est relativement stable sur toute la plage de mesure et ne modifie que très faiblement le RCV95 (figure 4)

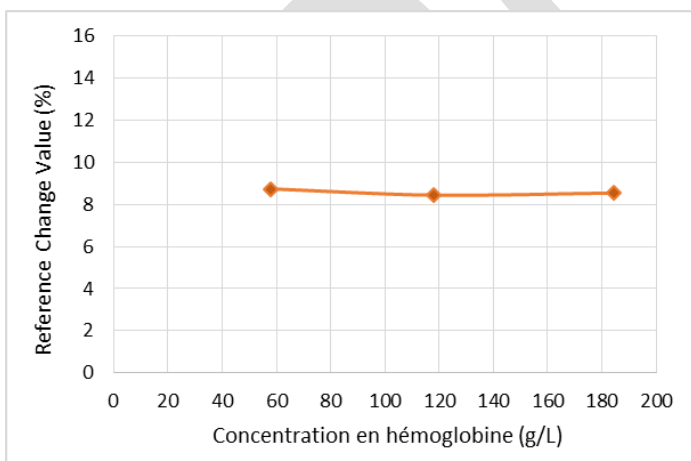


Figure 6. Reference Change Value (RCV) au seuil de 95% du taux d'hémoglobine de 3 concentrations différentes sur les analyseurs de type XN Sysmex . RCV en pourcentage et concentration en g/L.

Les RCV obtenus sont compris entre 8,4 % et 8,7 % en fonction du niveau de concentration. La variation est donc relativement faible et nous choisissons d'appliquer la valeur la plus haute (8.7%) pour toute la gamme de concentration.

- Discussion :

L'individualité de l'hémoglobine étant marquée (<0,6), il paraît d'autant plus pertinent d'utiliser le RCV applicable sur une très large plage de mesure.

En intégrant ce complément d'interprétation, il est alors possible :

- D'interpréter avec plus de pertinence tout changement de taux d'hémoglobine et d'en connaître la significativité (probabilité).
- De détecter dans la zone de normalité une évolution « non attendue » (non liée à l'imprécision de l'instrument ni la fluctuation physiologique) du taux d'hémoglobine et ainsi d'alerter d'un changement d'état avant de sortir des valeurs de référence.

- **Conclusion :**

Comment rendre plus pertinents les résultats de laboratoire ? le RCV est un indicateur, basé sur des données statistiques intégrant la variabilité analytique et la variabilité biologique. Il permet de préciser l'interprétation d'un résultat biologique en indiquant le poids statistique affectant un changement entre deux résultats. Aussi par ce qu'il intègre une incertitude biologique (Cvi) le RCV nous semble plus pertinent à utiliser que l'incertitude de mesure. En complément des valeurs de référence et pour les paramètres à forte individualité, le RCV apporte un complément d'information dans la zone de référence en indiquant un changement d'état pouvant être significatif.

A l'ère de la digitalisation et de l'intelligence artificielle, ces indicateurs trouveront sans doute leur place dans des modèles qui sauront traduire plus simplement leur signification.

- **Références :**

[1] Callum G. Fraser. : FROM PRINCIPLES TO PRACTICE. Chapter 3 : Changes in Serial Results. AACC Press. 2001

[2] Caroline LE GOFF, Service de Chimie Clinique Université de Liège, Chu Sart-Tilman. Les valeurs de référence du Laboratoire. Comment les établir? Les facteurs impactants?

[3] Callum G, Fraser and William A Bartlet. Are reference change values more useful than population-based reference intervals ? AACC Academy. 2013.

[4] PSA libre : l'utilisation en routine est prématurée pour le dépistage du cancer de prostate. VILLERS A, CHAUTARD D. Prog Urol, 2000, 10, 618-621

[5] Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU — Actualisation 2018—2020 : cancer de la prostate.

[6] G ERDEN, G TEZCAN, OA SOYDAS, MM YILDIRIMKAYA. BIOLOGICAL VARIATION AND REFERENCE CHANGE VALUE (RCV) OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN (PSA) LEVELS IN THE SERUM OF HEALTHY YOUNG INDIVIDUALS. Gazi Medical Journal (2009). 20, 4, 152-156.

[7] RG Nixon, MH Wener, KM Smith, RE Parson, AB Blasé, MK Brawer. Day to day changes in free and total PSA : significance of biological variation. Prostate Cancer and Prostatic Diseases (1997) 1. 90-96.

[8] G Soletermos, A Semjonow, P EC Sibling, R Lamerz et al. Biological Variation of Total Prostate-Specific Antigen : A Survey of Published Estimates and Consequences for Clinical Practice. Clinical Chemistry (2005).

[9] Fiche info : Le cancer de la prostate. Dosage du PSA. Roche. 2013

[10] Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. "Current databases on biologic variation: pros, cons and progress." Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500. This database was last updated in 2014.

[11] Professeur Charles Yannick GUEZENNEC. Suivi hématologique du sportif. Troisième Conférence Nationale Médicale Interfédérale CNOSF.

MJ O'KANE, B LOPEZ. Explaining laboratory test results to patients : what the clinician needs to know

BMJ 2015 ; 351 : h5552

[12] Henny J, Arnaud J, Giroud C, Vassault A. intervalles de reference : détermination et vérification Ann Biol clin 2010 ; 68 :305-313