

Étude de stabilité et mise en place d'un contrôle de qualité externe pour les dosages du complément sur plasma EDTA

Stability study and external quality assessment scheme implementation for complement components dosage on EDTA plasma

Benjamin Lopez^{1,2}
Stéphanie Rogeau^{1,2}
Anne-Sophie Deleplancque¹
Emmanuelle Moitrot¹
Ericka Berthe³
Claire Goulvestre⁴
Sophie Hillion⁵
Elisabeth Vinner⁶
Myriam Labalette^{1,2}
Sylvain Dubucquoi^{1,2}

¹ CHU Lille, Institut d'immunologie, Lille, France

² Université de Lille, U995-LIRIC-Lille Inflammation Research International Center, Lille, France

³ CHU Amiens, Laboratoire d'immunologie, Amiens, France

⁴ Hôpital Cochin, Hôpitaux Universitaires Paris Centre (HUPC), Laboratoire d'immunologie, AP-HP Paris, France

⁵ CHU Brest, Laboratoire d'immunologie et immunothérapie, Brest, France

⁶ CHU Lille, Cellule Qualité, Pôle de biologie-pathologie-génétique, Lille, France

Résumé. Tous les contrôles proposés par les fournisseurs d'évaluations externes de qualité (EEQ) pour les dosages du complément sont produits sur sérum, bien que les publications disponibles sur la phase pré-analytique soient en faveur de l'utilisation de plasma EDTA. À l'heure actuelle, certains laboratoires de biologie médicale (LBM) français participent à des programmes d'EEQ sur un échantillon de matrice différente de leur pratique quotidienne. Le but de cette étude est de mettre à leur disposition un programme alternatif d'EEQ sous la forme d'un échange inter-laboratoires (EIL). Les échantillons sont obtenus à partir de pools de plasmas de sujets sains et dilués pour obtenir plusieurs niveaux de contrôles stables. Le protocole a été validé sur les dosages de CH50, C3, C4 et C1-inhibiteur par : (i) une étude de la stabilité lors de la conservation post-centrifugation des aliquotes de plasma EDTA à température ambiante, à 4 °C et à -20 °C ; (ii) la recherche d'un effet matrice lors de la dilution des échantillons ; et (iii) une étude de la stabilité lors de la conservation après dilution. Les résultats de l'étude démontrent la stabilité jusqu'à la 4^e semaine des échantillons préparés selon notre protocole et conservés à -20 °C. Ces résultats sont compatibles avec les contraintes liées à la mise en place d'un EIL. Celui-ci a été initié en janvier 2018. Une synthèse des résultats obtenus au terme de la première année est présentée. Le programme d'EIL pour les dosages du complément sur plasma EDTA sera une aide pour l'accréditation des LBM concernés.

Mots clés : *contrôle de qualité, évaluations externes de la qualité, plasma EDTA, fractions du complément*

Abstract. Although the use of EDTA-containing collection tubes is known to stabilize the complement analytes and to make the results more reliable, no external quality assessment (EQA) scheme based on EDTA plasma samples is available to date in France. Consequently, a number of clinical laboratories currently participate to EQA program on samples whose matrix is different from their routine practice. The aim of this work was to offer a new external quality assessment scheme, as an inter-laboratory exchange (ILE). The ILE samples come from pooled EDTA plasmas of healthy subjects and are diluted to obtain distinct control levels. The protocol has been validated on CH50, C3, C4 and C1-inhibitor measurements, through: (i) a stability study of post-centrifugation storage of EDTA plasma samples at room temperature, 4°C and -20°C; (ii) the demonstration of the linearity of the dilution steps; and (iii) a stability study of the diluted samples. Our results demonstrate a four-weeks stability of the ILE samples prepared and stored according to our protocol. Those results are compatible with the ILE implementation constraints, and the program has been

Article reçu le 17 avril 2019,
accepté le 17 octobre 2019

Correspondance : B. Lopez
<benjamin.lopez@chru-lille.fr>

implemented in January 2018. The one-year ILE implementation experience is also presented. The newly implemented ILE will be useful for the accreditation of the complement activity of French laboratories using EDTA plasma samples.

Key words: quality control, external quality assessment, EDTA plasma, complement components

Les explorations du complément font partie du bilan diagnostique d'un grand nombre de pathologies, allant de déficits immunitaires primitifs aux complications parfois dramatiques, à une variété de pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes associées à un état d'hyper-activation de la cascade [1, 2]. La mesure de l'activité hémolytique de la voie classique (CH50) et le dosage des fractions protéiques C3 et C4 sont nécessaires pour permettre une interprétation minimale d'un bilan du complément [1, 3, 4]. Différentes évolutions techniques survenues au cours des dernières décennies ont permis de faciliter l'accès à ces explorations de première intention, et le nombre de laboratoires de biologie médicale (LBM) non-spécialistes réalisant a crû en conséquence [2, 5]. Ces tests automatisés, parfois en accès ouvert et autorisant la réalisation de grandes séries d'analyses, sont actuellement largement utilisés par les laboratoires de biologie médicale (LBM) [2, 4]. Plus particulièrement, des kits commerciaux basés sur la lyse de liposomes ou sur le principe d'une technique Elisa ont majoritairement remplacé en activité de routine la méthode hémolytique de référence pour la mesure du CH50 (activité fonctionnelle CH50). Pour le dosage des protéines spécifiques de chaque voie d'activation, différents tests Elisa, néphélométriques ou turbidimétriques commerciaux sont également disponibles [1, 2, 4].

La criticité de la phase pré-analytique pour la mesure de l'activité hémolytique ou pour le dosage de fractions du complément est connue de longue date. Dès 1988 Mollnes *et al.* recommandaient, après une analyse détaillée, que le sang soit recueilli sur tube EDTA, placé immédiatement à 4 °C et centrifugé rapidement, avant congélation à -70 °C dans les 8 heures [6]. Le rationnel chimique en faveur du prélèvement sur tube EDTA est le blocage de la cascade d'activation du système du complément par chélation du calcium contenu dans le milieu extracellulaire. L'efficacité de l'EDTA dans le blocage de la génération de produits d'activation du complément a récemment été rappelée par le travail de l'équipe de Yang *et al.* [7], qui a rapporté une stabilité des échantillons jusqu'à la 8^e heure à température ambiante (TA) ou jusqu'à la 24^e heure à 4 °C.

Les exigences de la norme NF EN ISO 15189 imposent la participation des LBM à des programmes de comparaisons inter-laboratoires, par exemple un programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) [8-10]. Si aucun programme d'EEQ adapté n'est disponible, la norme stipule qu'il est de

la responsabilité du laboratoire de mettre en place d'autres approches pour obtenir la preuve objective de la validité des résultats - par exemple par l'échange d'échantillons avec d'autres laboratoires [9]. À l'heure actuelle, tous les contrôles de qualité proposés pour les explorations conventionnelles du complément par les organismes organisateurs d'EEQ sont produits sur sérum. Par conséquent, un certain nombre de laboratoires français participent à des programmes d'EEQ sur une matrice différente de celle analysée quotidiennement.

Le but de cette étude est de décrire la mise en place d'un programme d'échange inter-laboratoires pour la mesure de l'activité fonctionnelle CH50 et les dosages des protéines C3, C4 et C1-inhibiteur sur plasma EDTA. Les résultats d'une étude de stabilité extensive des paramètres du complément sur plasma EDTA et sur les échantillons préparés pour l'échange inter-laboratoires sont détaillés. Une synthèse des résultats obtenus durant la première année suivant la mise en place de cet échange est également présentée.

Matériel et méthodes

Plan de l'étude

Le plan expérimental de l'étude est le suivant : (i) étude de la stabilité des 4 paramètres lors de la conservation post-centrifugation des aliquotes de plasma EDTA, à TA, à 4 °C ou à -20 °C à court terme (tous les jours jusqu'J3) ; (ii) recherche d'un effet matrice lors de la dilution des échantillons ; (iii) étude de la stabilité des 4 analytes (activité fonctionnelle CH50 et concentrations des protéines C3, C4 et C1-inhibiteur) lors de la conservation des échantillons dilués, à court terme (tous les jours jusqu'J3), puis à long terme (toutes les semaines jusqu'à la 4^e semaine), à -20 °C. Les analyses statistiques et représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, San Diego, CA).

Echantillons

Les échantillons employés pour les différents tests réalisés ainsi que pour la préparation des contrôles pour l'échange inter-laboratoires sont issus de l'activité de soin de l'Institut d'immunologie du CHU de Lille. Il s'agit d'échantillons de plasmas EDTA frais provenant des fonds de tubes de

patients prélevés en routine pour les analyses du complément. Les échantillons biologiques sont conservés dans une sérothèque déclarée au ministère de la Recherche, en accord avec les lois de bioéthique (numéro d'enregistrement : DC-2008-642). L'activité des dosages du complément au CHU de Lille est accréditée selon la norme NF EN ISO 15189. Des prélèvements présentant des concentrations physiologiques ou élevées de fractions du complément ont été utilisés pour maximiser la stabilité des protéines du complément. Néanmoins, pour pouvoir intégrer des échantillons présentant différentes concentrations de facteurs du complément à l'échange inter-laboratoire, nous avons procédé à des dilutions avec les diluants commercialisés par la société The Binding Site (TBS), Birmingham, UK).

Méthodes de dosage et réactifs

Tous les tests de cette étude ont été réalisés à l'Institut d'immunologie du CHU de Lille sur l'automate de dernière génération Optilite® (TBS). Les références des kits de dosage pour le CH50, le C3, le C4 et le C1 inhibiteur sont respectivement : NK095.OPT, NK023.OPT, NK025.OPT, NK019.OPT (TBS). La mesure de l'activité fonctionnelle de la voie classique du système du complément (CH50) par une méthode liposomale a été décrite dans les années 1980 [11]. Brièvement, des microsphères formées d'une double couche lipidique (liposomes) sont synthétisées en capturant une glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Les liposomes sont marqués au dinitrophénol (DNP) sur leur membrane externe et l'ajout du substrat contenant des anticorps anti-DNP, du G6P et du NAD permet d'amorcer la réaction. La lyse des liposomes est obtenue grâce à l'activation des composants de la voie classique du complément présents dans le plasma du patient, et le changement d'absorbance mesuré est proportionnel à l'activité du complément de l'échantillon [12]. Des anticorps spécifiques des fractions protéiques C3, C4 et du C1-inhibiteur, sont utilisés pour leur dosage en turbidimétrie. En l'absence de standard international, les kits de mesure de l'activité fonctionnelle CH50 et de dosage du C1 inhibiteur sont étalonnés face à un pool de plasma de sujets sains calibré par un standard interne à la société TBS. Les kits de dosage des fractions C3 et C4 sont quant à eux calibrés par rapport au matériel de référence ERM-DA470k/IFCC, développé pour l'harmonisation du dosage des protéines [13]. Les performances de l'automate Optilite® pour le dosage des fractions C3 et C4 ont déjà été décrites précédemment [14], et la validation du dosage du C1-inhibiteur a fait l'objet d'une publication récente [15]. Selon notre expérience, les coefficients de variation (CV) de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont respectivement inférieurs à 3,0 et 5,0 % pour les 4 paramètres.

Les diluants employés pour obtenir plusieurs niveaux de contrôle à partir d'échantillons avec des valeurs physiologiques de protéines du complément sont ceux commercialisés par la société TBS. Les deux diluants IK709 et IK710 (TBS), respectivement commercialisés pour le CH50, le C3 et le C4, et pour le C1-inhibiteur ont été évalués en parallèle.

Étude de la stabilité

Selon le guide ISO 30, la stabilité d'un échantillon est définie comme la capacité d'un échantillon à maintenir la valeur initiale d'un analyte dans certaines limites, au cours d'un certain laps de temps et selon certaines conditions de stockage. L'instabilité est ainsi calculée comme la différence (absolue ou relative) par rapport à la valeur initialement mesurée (T0) d'une mesure obtenue après un certain intervalle de temps (Tx) [16]. Les résultats des mesures de chaque analyte étudié sont donc exprimés en pourcentage d'écart à la valeur basale (mesurée le premier jour (J0) et considérée comme la référence). Les différents critères d'interprétation d'une étude de stabilité ont été revus récemment par Bastin *et al.* dans une étude comparative sur paramètres biochimiques [17]. Nous avons choisi d'utiliser l'*acceptable change limit* (ACL), critère défini dans la norme ISO 5725, chapitre 6 (révisée en 2017), et basé sur le coefficient de variation (CV) de la fidélité intermédiaire de la technique [17, 18].

Acceptable change limit (ACL)

$$= \pm 2,77 \times CV (\%) \text{ de fidélité intermédiaire}$$

Le *tableau 1* présente les seuils limites acceptables pour l'écart à la valeur basale de chaque paramètre, en se basant sur les CV limites de fidélité intermédiaire retenus pour la vérification de la méthode. Les résultats des analyses de stabilité sont exprimés en nombre et pourcentage de valeurs acceptables pour chaque condition de conservation et chaque délai étudiés. Toute condition aboutissant à au moins une valeur non acceptable était rejetée au terme des analyses.

Recherche d'un effet matrice

La présence d'un éventuel effet matrice lors de la dilution a été recherchée en parallèle avec les deux diluants commercialisés par la société TBS pour l'ensemble des kits de dosage du complément (références IK709 et IK710). Les échantillons ont été dilués aux 2/3, 1/2 et 1/3 avec respectivement 33,3, 50 et 66,7 % de diluant. La recherche d'un effet matrice est basée sur le calcul du taux de récupération (%), selon la formule :

Tableau 1. Limites acceptables de coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaire et bornes d'acceptable change limit (ACL) pour chacun des paramètres.

Paramètre	CV limite acceptable de fidélité intermédiaire ¹	Borne inférieure d'ACL	Borne supérieure d'ACL
CH50 (U/mL)	11 %	-30,5 %	+30,5 %
C3 (mg/L)	10 %	-27,7 %	+27,7 %
C4 (mg/L)	12 %	-33,3 %	+33,3 %
C1 inhibiteur (mg/L)	10 %	-27,7 %	+27,7 %

¹ Les CV limites acceptables de fidélité intermédiaire rapportés ici sont issus des données fournisseurs d'aide à la vérification des méthodes quantitatives de dosages sur Optilite®. Les références des documents sont respectivement 16FRc VM 095.OPT_3 pour le CH50, 16FRc VM 023.OPT_2 pour le C3, 16FRc VM 025.OPT_2 pour le C4, et 16FRc VM 019.OPT_1 pour le C1-inhibiteur, version juin 2018.

Taux de récupération

$$= \left(\frac{\text{valeur mesurée après dilution}}{\text{facteur de dilution} \times \text{valeur mesurée avant dilution}} \right) \times 100 (\%)$$

Des taux de récupération compris entre 80 et 120 % pour chaque paramètre ont été considérés comme satisfaisants [19]. Les taux de récupération ont été analysés pour chaque dilution d'un même diluant, puis comparés entre les deux diluants à l'aide du test non-paramétrique de Mann-Whitney (seuil de significativité : 5 %).

Procédure de préparation des échantillons et protocole de l'échange inter-laboratoires

À partir d'un pool de plasma EDTA de sujets sains, le laboratoire responsable prépare deux échantillons dont les valeurs ne sont pas connues des laboratoires participant à l'échange. Pour ajuster les valeurs à obtenir (choisies à sa convenance), le laboratoire responsable de l'échange dilue ce pool à l'aide du diluant commercialisé par la société TBS (référence IK709). Les échantillons préparés sont immédiatement congelés et conservés à -20 °C. Le transport est également réalisé à cette température, et la stabilité des échantillons lors du transport est contrôlée : le laboratoire responsable de la préparation et de l'envoi fait suivre le même trajet (avec retour) à une aliquote de chaque échantillon et réalise à nouveau les dosages sur ces échantillons pour contrôler leur stabilité par rapport à ceux conservés au laboratoire. La procédure de vérification de la stabilité employée est la même que celle décrite plus haut. Un envoi d'échantillons est réalisé tous les 2 mois (6 envois par an) et chaque envoi comprend deux échantillons (2 niveaux). Comme pour toute procédure d'évaluation inter-laboratoires, les laboratoires destinataires et le laboratoire à l'origine de l'envoi réalisent le dosage en aveugle, dans un délai de 3 semaines après préparation des échantillons. Le laboratoire à l'origine de l'envoi est responsable de la collecte des résultats de chaque participant par courrier

électronique et transmet un compte-rendu faisant part des indicateurs classiques de dispersion à chaque laboratoire.

Les résultats sont exploités par les indicateurs proposés dans le SH GTA 06 édité par le Comité français d'accréditation (Cofrac) [20]. Plus particulièrement, le z-score est obtenu par la soustraction de la valeur théorique (ou « valeur conventionnellement vraie », ici la moyenne de l'ensemble des résultats) au résultat du laboratoire et la division par l'écart-type de l'ensemble des résultats. Ce paramètre n'a donc pas d'unité propre, et les valeurs situées entre 2 et 3 ou -2 et -3 sont considérées comme « douteuses », alors que les valeurs situées au-delà de 3 ou -3 sont identifiées comme « inacceptables » [20, 21]. Chaque laboratoire reçoit donc ses résultats en comparaison de ceux des autres participants, ainsi que les CV obtenus entre les dosages sur les échantillons conservés au laboratoire et les échantillons ayant réalisé le trajet aller et retour. En définitive, et comme recommandé, une synthèse annuelle des résultats est également fournie à chaque participant [22].

Résultats

Stabilité des aliquotes de plasma EDTA

Dix échantillons ont été utilisés pour cette manipulation, 5 présentant des concentrations de fractions du complément dans les valeurs physiologiques et 5 avec une activation du système du complément (CH50 diminué, C3 et/ou C4 diminué). Chaque échantillon de plasma EDTA récupéré au décours des analyses de routine (J0) a été partagé en 9 aliquotes conservées à TA, à 4 °C ou à -20 °C (3 pour chaque condition). Les analyses ont par la suite été répétées sur une nouvelle aliquote tous les jours jusque J3.

Les résultats de cette manipulation sont représentés avec les bornes d'acceptabilité sur la figure 1. À TA, il existe une activation rapide du système du complément avec chute du CH50, qui passe dans des valeurs pathologiques dès J1 pour 50 % des échantillons. Toutes les mesures d'activité fonctionnelle CH50 sont hors des limites acceptables dès J2 et l'activation *in vitro* se poursuit avec des taux allant

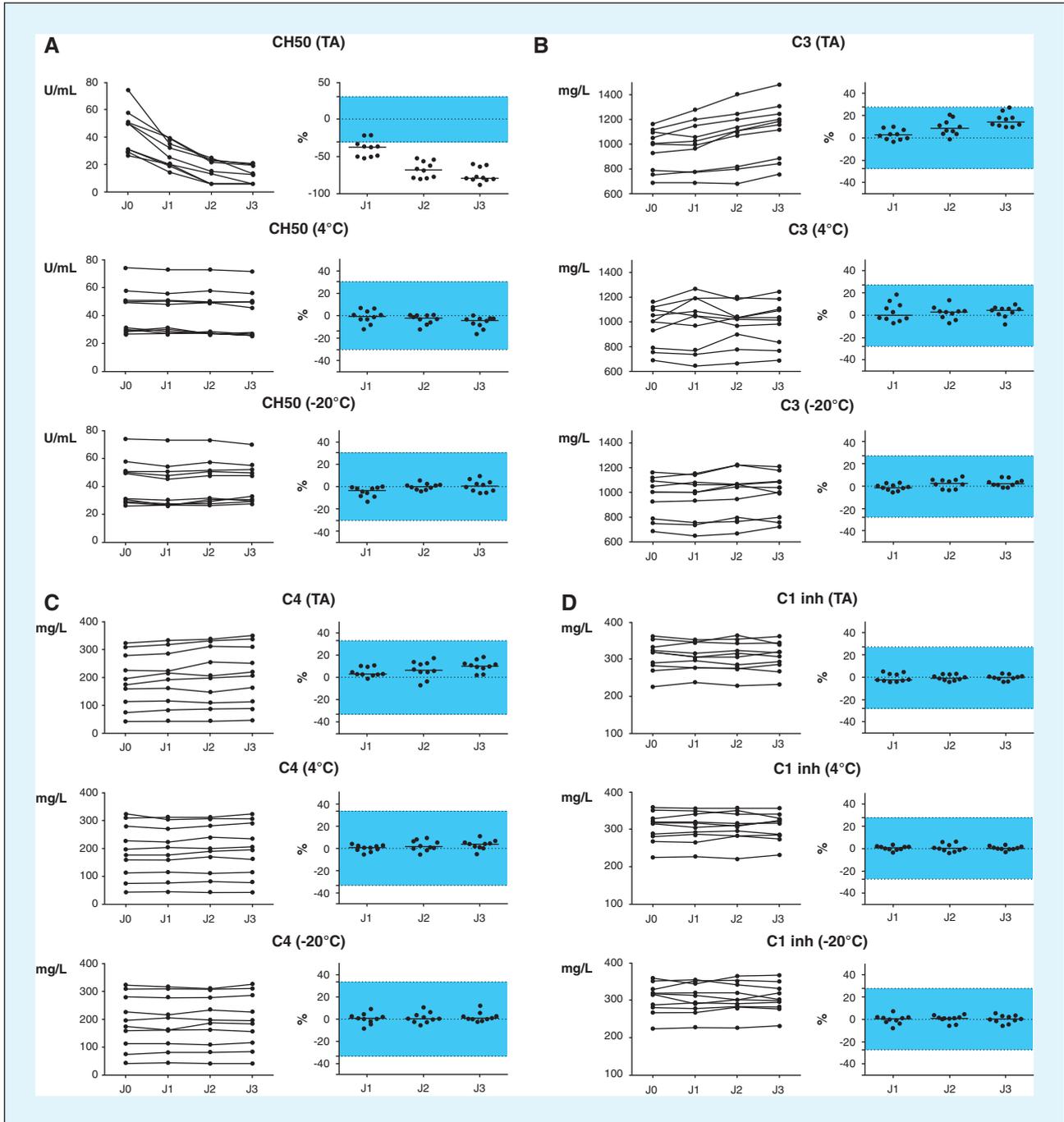


Figure 1. Étude de la stabilité (A) du taux de CH50 et des concentrations (B) du C3, (C) du C4 et (D) du C1 inhibiteur (C1 inh) lors de la conservation des aliquotes de plasma EDTA à température ambiante (TA), 4 °C et -20 °C jusque J3 (n = 10 échantillons). Les valeurs brutes et les variations en pourcentage de la valeur basale (J0) sont représentées. Les bornes d'acceptable change limit (ACL) figurent avec les écarts à la valeur basale et encadrent la zone de couleur pour chaque paramètre. Les lignes horizontales représentent les médianes des jeux de données.

jusqu'à passer sous la limite de quantification à J3. Une augmentation progressive de la fraction C3 est observée en parallèle, bien qu'aucune des mesures ne sorte des limites d'acceptabilité à J3. Les concentrations de C4 et

de C1-inhibiteur semblent moins sujets à l'activation *in vitro* survenant à TA. À 4 °C, les concentrations de C3, C4 et C1-inhibiteur sont stables jusqu'au troisième jour de conservation. Les taux d'activité CH50, bien que toujours

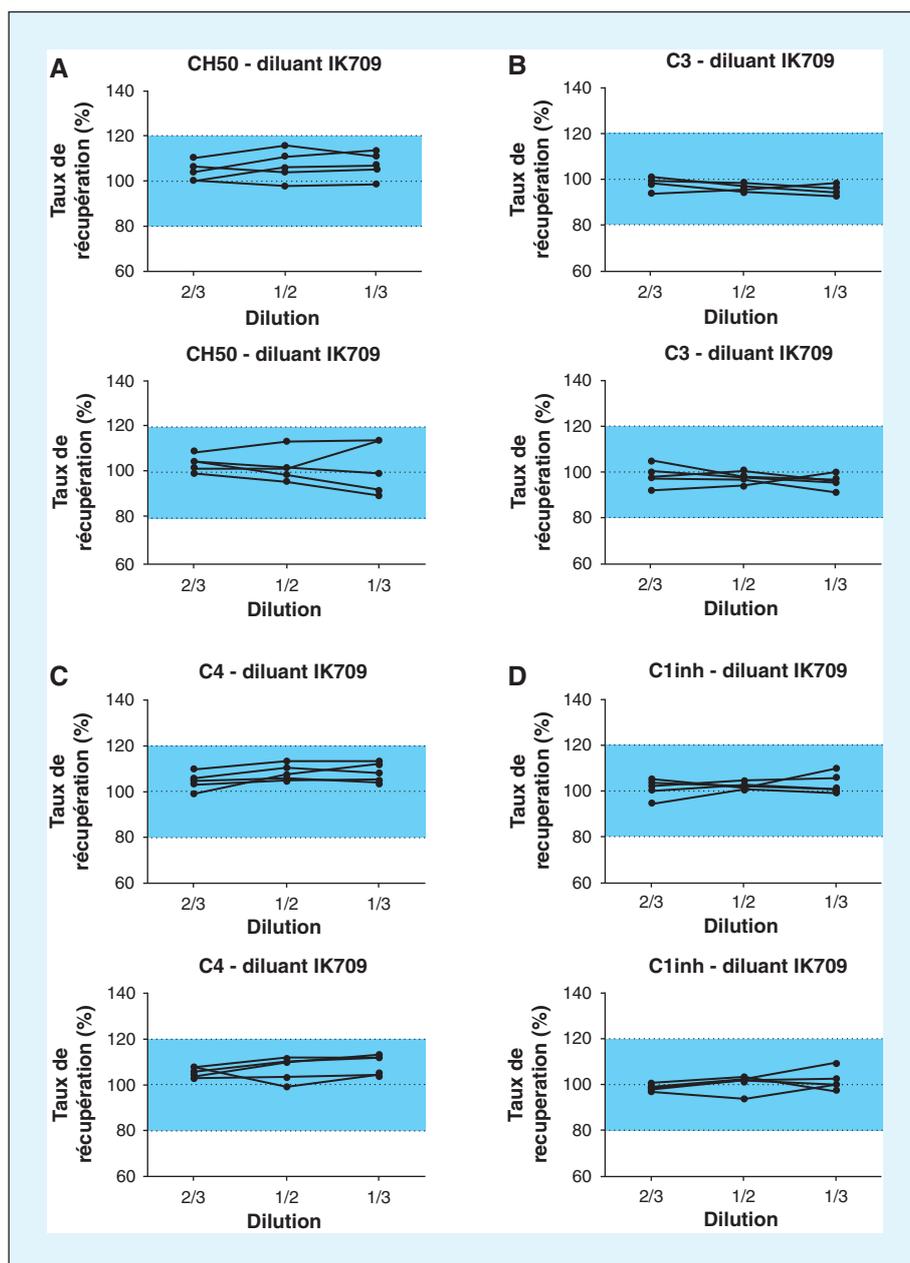


Figure 2. Étude de la linéarité des dilutions (A) du taux de CH50 et des concentrations (B) du C3, (C) du C4 et (D) du C1 inhibiteur (C1 inh) par rapport à la valeur basale (échantillon pur), avec les diluants 1 et 2 (n = 5 échantillons). Les taux de récupération exprimés en pourcentage de la valeur basale pour chaque dilution et chaque diluant sont représentés. Les lignes pointillées représentent les bornes inférieure et supérieure d'acceptabilité (80 % et 120 %) et encadrent la zone de couleur.

dans les limites d'acceptabilité, présentent une diminution lentement progressive à 4 °C (figure 1). À -20 °C, les variations observées pour les 4 analytes sont mineures et systématiquement comprises dans les limites acceptables. Au terme de cette manipulation, la stabilité est donc rejetée pour les conditions de conservation à TA et 4 °C, et validée avec le protocole de conservation à -20 °C.

Recherche d'un effet matrice lors des dilutions

Cette manipulation a été réalisée sur une même journée. Cinq échantillons de plasma EDTA présentant des concentrations de fractions du complément dans les valeurs physiologiques ou élevées ont été utilisés pour cette manipulation.

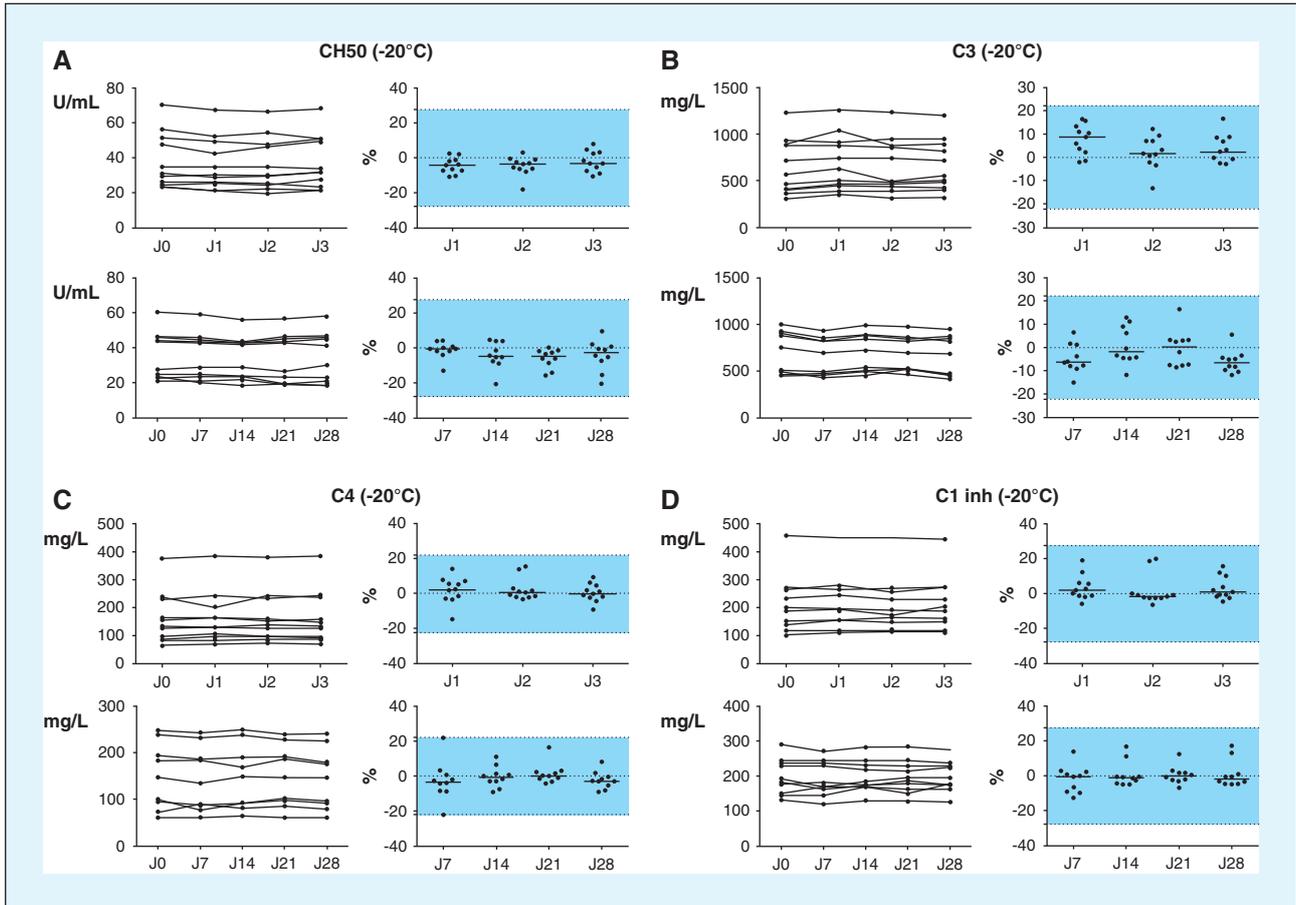


Figure 3. Étude de la stabilité (A) du taux de CH50 et des concentrations (B) du C3, (C) du C4 et (D) du C1 inhibiteur (C1 inh) après dilution des échantillons par le diluant IK709. Les résultats sont présentés jour par jour jusqu'au 3^e jour (n = 11 échantillons), puis semaine par semaine jusqu'à la 4^e semaine (n = 10 échantillons). Les valeurs brutes et les variations par rapport à la valeur basale (J0) sont représentées. Les bornes d'acceptable change limit (ACL) figurent avec les écarts à la valeur basale et encadrent la zone de couleur pour chaque paramètre. Les lignes horizontales représentent les médianes des jeux de données.

Les résultats des tests sont présentés sur la *figure 2*. Pour l'ensemble des 4 paramètres, et quel que soit le diluant utilisé, les dilutions réalisées présentent un taux de récupération acceptable (80-120 % [19]). Aucune différence significative n'est observée entre les taux de récupération obtenus avec les deux types de diluant (p = 0,196). Au terme de cette manipulation le diluant IK709 est retenu pour la préparation des échantillons de l'échange interlaboratoires dans le but de simplifier la procédure.

Stabilité des échantillons à -20 °C après dilution avec le diluant IK709.

La stabilité des échantillons préparés après dilution avec le diluant IK709 a été évaluée à court (tous les jours jusque J3) et à long terme (toutes les semaines jusqu'à la 4^e semaine), avec le protocole de conservation à -20 °C. Les résultats

de ces manipulations sont représentés avec les bornes d'acceptabilité sur la *figure 3*.

Conservation à court terme (jusque J3)

Onze échantillons présentant des concentrations de fractions du complément dans des valeurs physiologiques ou élevées ont été utilisés. Chaque échantillon de plasma EDTA a systématiquement été dilué. Les proportions de diluant IK709, variables, ont été laissées à la discrétion du préparateur, pour obtenir des échantillons dilués de 2 niveaux de concentration. Ces niveaux de concentration ont été définis sur la mesure de l'activité fonctionnelle CH50, qui présente la gamme de mesure la plus étroite des 4 analytes. Après dilution, 5 échantillons présentent des valeurs physiologiques de CH50, et 6 des valeurs inférieures à la borne basse des valeurs de référence. Les échantillons ont été partagés en 3 aliquotes conservées à -20 °C. Les

dosages des 4 analytes ont par la suite été répétés tous les jours jusque J3, en décongelant une nouvelle aliquote chaque jour.

Toutes les variations par rapport à la valeur basale (J0) se distribuent entre les limites d'acceptabilité. Les taux d'activité et concentrations des 4 paramètres sont donc stables jusque J3 lors de la conservation à -20 °C des échantillons dilués dans le diluant IK709.

Conservation à long terme (jusqu'à la 4^e semaine)

Le protocole de la conservation à court terme a été répété sur 10 nouveaux échantillons (après dilution : 5 échantillons avec des valeurs physiologiques de CH50, et 5 autres des valeurs inférieures à la borne basse des valeurs de référence). De la même façon, les échantillons ont été partagés en 3 aliquotes conservées à -20 °C et les dosages des 4 analytes ont été répétés toutes les semaines jusqu'à la 4^e semaine, en décongelant une nouvelle aliquote à chaque fois.

Toutes les variations par rapport à la valeur basale (J0) se distribuent entre les limites d'acceptabilité. Les taux d'activité et concentrations des 4 paramètres sont donc stables jusqu'à la 4^e semaine lors de la conservation à -20 °C des échantillons dilués dans le diluant IK709.

Retour d'expérience sur la première année de mise en place de l'EIL et synthèse des résultats

Le programme d'échange inter-laboratoires pour les dosages du complément sur plasma EDTA a été initié au mois de janvier 2018. Un total de 6 envois a été réalisé entre janvier et décembre 2018 à raison d'un envoi de 2 échantillons tous les 2 mois. Le nombre de laboratoires participant à l'EIL, initialement de 3 (laboratoires d'immunologie des CHU de Lille, Amiens et Brest), a été porté à 4 à compter du 5^e envoi (laboratoire d'immunologie de l'hôpital Cochin, AP-HP, Paris).

Pour cette première année d'expérience, la préparation et les envois ont été systématiquement réalisés par l'Institut d'immunologie du CHU de Lille.

Tous les laboratoires participants utilisent les kits commercialisés par la société TBS sur les automates SPA^{PLUS}® (TBS) et Optilite® (TBS). En raison des faibles effectifs (n = 3 puis 4 participants), la constitution de groupes de pairs organisés par méthode de dosage n'a pas été retenue. Aucune différence n'a été mise en évidence selon la méthode de dosage *a posteriori* (comparaison sur les deux envois de 4 participants, données non publiées). Les résultats de chacun des 2 échantillons des 6 envois sont détaillés dans le *tableau 2* et la *figure 4*. Les CV minimum et maximum obtenus sur l'ensemble des participants pour cette première année sont respectivement de 3,7 % et 40,8 % pour le CH50, de 2,4 % et 18,3 % pour le C3,

de 0,9 % et 13,3 % pour le C4, et de 0,2 % et 11,5 % pour le C1-inhibiteur. En particulier, malgré des résultats très proches et des CV restreints pour les dosages des protéines C3, C4 et C1-inhibiteur, un laboratoire a présenté des résultats régulièrement plus bas que les autres participants pour la mesure de l'activité CH50. Ce biais, responsable de CV globalement élevés sur l'ensemble des laboratoires, s'est corrigé lors du dernier envoi de l'année (*tableau 2* et *figure 4*).

Quel que soit le paramètre étudié, l'étude de la stabilité des échantillons lors des transports mettait en évidence des différences par rapport à la valeur mesurée après conservation standard de l'échantillon comprises entre -10 % et +10 %, à l'exception d'une mesure isolée de CH50 (19,8 %).

Discussion

Le but de ce travail était de mettre à disposition des LBM un programme alternatif d'EEQ pour les dosages du complément (CH50, C3, C4 et C1 inhibiteur) sur plasma EDTA, sous la forme d'un échange inter-laboratoires. Aucun effet matrice n'a été identifié lors des tests de dilution, qui ont permis d'obtenir plusieurs niveaux de contrôles. Nous avons réalisé une étude de stabilité extensive, validant la stabilité jusqu'à la quatrième semaine des 4 paramètres, sur aliquotes de plasma EDTA dilués et conservés à -20 °C. Suite à la réalisation des différents tests, l'échange inter-laboratoires a été mis en place à compter du mois de janvier 2018. Au terme de la première année de fonctionnement, 4 laboratoires avaient souscrit à ce nouvel échange inter-laboratoires. Six envois de 2 échantillons de concentrations variables ont pu être réalisés, avec des contrôles de stabilité satisfaisants lors des transports, validant le fonctionnement du programme.

L'EDTA est considéré comme le meilleur agent permettant de limiter l'activation *in vitro*, bien qu'une activation du C1q ait été décrite lors de la recalcification nécessaire aux différents dosages [23, 24]. Le plasma citraté présente quant à lui des performances jugées inférieures pour la stabilisation des échantillons, comme démontré par l'étude des produits d'activation du complément [2, 6]. Il est néanmoins encore utilisé par certains laboratoires pour les dosages courants des paramètres du complément. L'efficacité supérieure de l'EDTA dans le blocage de la génération de produits d'activation du complément a récemment été rappelée par le travail de l'équipe de Yang *et al.* [7]. Ces résultats sont en accord avec les données antérieures de Mollnes *et al.* et Støve *et al.*, qui avaient rapporté une stabilité des analytes même en cas de conservation en sang total à TA, jusqu'à la 6^e heure [6, 25]. Il a été rapporté que l'ajout de futhan (nafamostat mesilate ou FUT-175, un inhibiteur de protéases) à une concentration de 0,1 g/L

Tableau 2. Synthèse des six envois de l'année 2018. Sont renseignés le nombre de participants, la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (CV) pour chacun des 2 échantillons de chaque envoi.

	18/11*	18/12	18/21	18/22	18/31	18/32	18/41	18/42	18/51	18/52	18/61	18/62
CH50 (U/mL)												
Nombre de participants	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4
Moyenne	22,8	39,6	28,5	55,1	27,3	24,0	56,3	17,1	21,8	38,0	54,5	25,5
ET	0,8	2,2	4,7	9,4	6,3	7,4	3,3	1,9	4,1	15,5	5,0	2,5
CV (%)	3,7	5,6	16,6	17,2	23,0	30,8	5,8	11,1	19,0	40,8	9,2	9,6
C3 (mg/L)												
Nombre de participants	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4
Moyenne	443	733	653	1263	532	621	1091	431	460	977	1042	523
ET	68,4	78,7	119,3	153,2	40,6	40,6	26,2	13,1	21,7	108,0	47,5	23,7
CV (%)	15,4	10,7	18,3	12,1	7,6	6,5	2,4	3,0	4,7	11,1	4,6	4,5
C4 (mg/L)												
Nombre de participants	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4
Moyenne	107	179	123	237	115	120	238	87	103	201	187	355
ET	3,0	1,5	6,1	15,6	6,1	5,5	7,8	4,9	13,8	9,8	3,6	21,0
CV (%)	2,8	0,9	4,9	6,6	5,3	4,6	3,3	5,7	13,3	4,9	1,9	5,9
C1-inh (mg/L)												
Nombre de participants	2	2	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
Moyenne	145	238	na**	na	165	136	291	132	164	321	97	148
ET	6,4	11,3	na	na	7,8	5,7	0,7	12,0	18,9	17,7	1,9	8,0
CV (%)	4,4	4,8	na	na	4,7	4,2	0,2	9,1	11,5	5,5	1,9	5,4

*nomenclature : année/numéro de l'envoi et numéro de l'échantillon ; **na : non applicable en raison du nombre restreint de participants.

permettrait d'améliorer encore le blocage de l'activation *in vitro* [26, 27]. La manipulation de ce réactif, qui nécessite une reconstitution rapide et un ajout au sang total au décours immédiat du prélèvement reste difficilement applicable en pratique de routine clinique et interdit par ailleurs la réalisation de tests fonctionnels (type CH50). Son utilisation semble actuellement limitée aux protocoles de recherche ciblés sur la production d'anaphylatoxines [2, 24].

Notre protocole de préparation des échantillons est basé sur la dilution de plasmas présentant des concentrations physiologiques ou élevées de protéines du complément et une absence d'activation. Notre hypothèse de départ était ainsi de permettre par cette approche la préparation d'échantillons de concentration voulue – y compris de faibles valeurs pour chacun des paramètres – tout en optimisant la stabilité en raison de l'absence d'activation initiale de la cascade. Ce choix, en association à l'utilisation d'EDTA et à une congélation rapide, a été guidé par la nécessité de maximiser la stabilité des échantillons préparés pour l'échange inter-laboratoires. Il faut signaler que l'*International complement standardization committee* a publié en 2013 le détail des conditions de préparation et de conservation d'un standard international pour le dosage des produits d'activation du complément [28]. L'activation des sérums était initiée par l'ajout d'IgG et de zymosan et efficacement stoppée par l'adjonction d'EDTA et de futhan. Les concentrations de produits d'activation du système du complément obtenus (complexes C1rs-C1 inhibiteur, C4a,

C4bc, C4d, Bb, C3bBbP, C3a, C3bc, C3dg et C5a) étaient ainsi remarquablement stables lors de la conservation, et ce malgré plusieurs cycles de congélation-décongélation [28]. L'ajout extemporané de futhan, particulièrement intéressant dans ce contexte de contrôle d'une activation pré-existante, reste néanmoins particulièrement contraignant pour la préparation ponctuelle d'échantillons à tour de rôle par les laboratoires participant à un EIL. La récupération d'échantillons issus de l'activité de routine n'aurait alors pas été possible, et c'est la raison pour laquelle nous avons souhaité éviter cette méthode.

Pour valider notre approche, nous avons contrôlé l'absence d'effet matrice lors de dilutions d'échantillons de plasmas EDTA à l'aide des diluants commercialisés par la société TBS pour les dosages du complément – diluants dont la composition n'est pas rendue publique (références IK709 et IK710). Ce travail nous a ainsi permis de valider l'absence d'effet matrice en mettant en évidence des taux de récupération acceptables jusqu'à 67 % de diluant. La gamme de dilutions validée autorise donc la préparation d'échantillons dans des valeurs largement pathologiques pour l'ensemble des paramètres, point crucial pour les mesures d'exactitude puis d'incertitude à partir des résultats d'évaluation externe de la qualité [20]. Peu d'éléments sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation d'échantillons dilués pour le dosage des paramètres du complément. Yoon *et al.* ont récemment rapporté les résultats d'épreuves de dilution sur le dosage de l'activité fonctionnelle CH50 par une autre

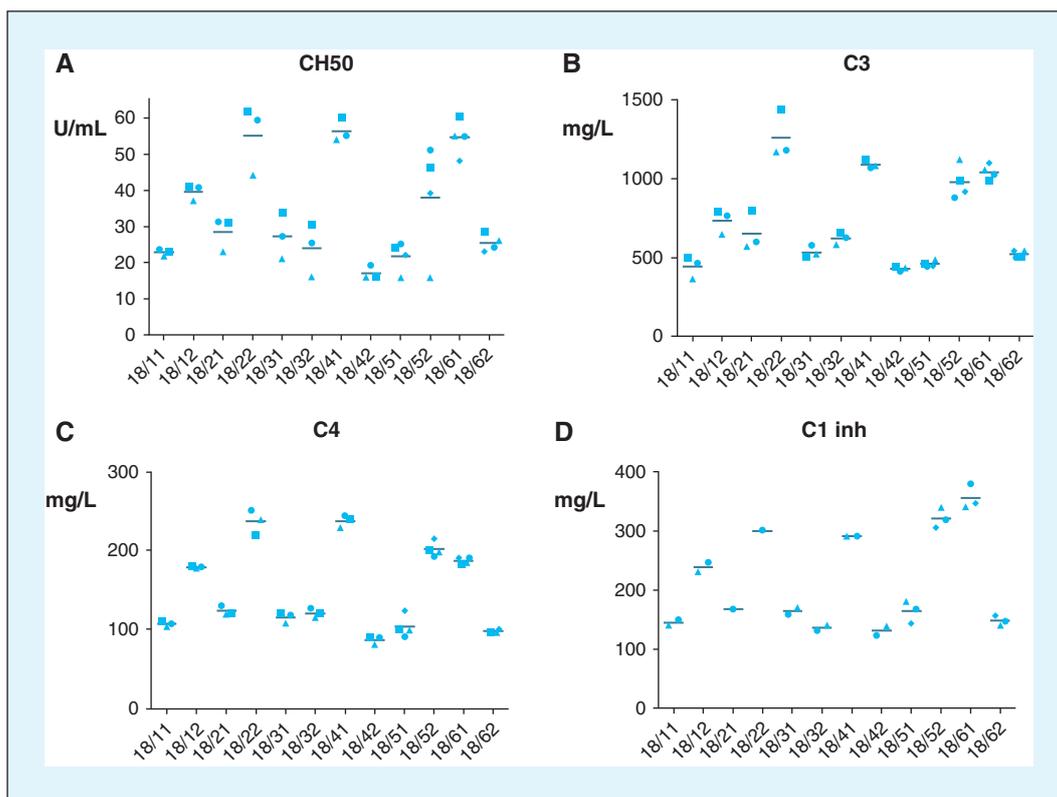


Figure 4. Représentation graphique des valeurs (A) de CH50, (B) de C3, (C) de C4 et (D) de C1 inhibiteur (C1 inh) rendues par chaque laboratoire participant au cours des 6 envois de 2 échantillons de l'année 2018. L'axe des abscisses indique l'identifiant de l'échantillon (nomenclature : année/numéro de l'envoi et numéro de l'échantillon) et l'axe des ordonnées la valeur des paramètres mesurés. Chaque centre participant est représenté par un symbole différent, les lignes représentent les médianes des résultats.

technique liposomale (Wako, Osaka, Japon), lors de la redéfinition de valeurs de référence [19]. Les procédures de dilution avaient pour but de passer outre la gamme de mesure restreinte du kit employé, les valeurs de sujets sains se situant régulièrement hors de la gamme. Les auteurs décrivaient ainsi des taux de récupération satisfaisants lors de l'utilisation de sérums auto- ou hétérologues inactivés par la chaleur, alors que l'utilisation de sérum salé isotonique était associé à des taux de récupération incomplets [19].

Les échantillons préparés pour l'échange inter-laboratoires selon notre protocole sont stables à -20°C jusqu'à la 4^e semaine, même pour des valeurs faibles des différentes protéines du complément. Ces résultats permettent d'assurer la validité de l'échange inter-laboratoires lors d'un transport conventionnel d'échantillons biologiques à -20°C , plus économique qu'un transport à -80°C en carboglace. Le délai maximum spécifié aux laboratoires participants pour réaliser le dosage a donc été fixé à 3 semaines.

Au terme des différentes manipulations, la procédure d'échange inter-laboratoires a été mise en place à compter du mois de janvier 2018 avec 3 laboratoires participants, rejoints par un quatrième pour les deux derniers envois de l'année. À l'heure actuelle, tous les laboratoires par-

ticipant au programme utilisent une méthode liposomale pour la mesure de l'activité fonctionnelle CH50, et des kits turbidimétriques pour le dosage des protéines spécifiques. Les kits de la société TBS sont largement utilisés en France et validés pour les deux types de matrice (sérum et plasma EDTA). Malgré l'uniformité actuelle des méthodes de dosage des participants, cet échange est ouvert à des LBM qui travaillent avec d'autres méthodes ou fournisseurs de réactifs.

La première année de fonctionnement a permis de valider les conditions de préparation des échantillons, puisque sur les 12 échantillons fournis en 6 envois aux laboratoires participants, 7 présentent des valeurs basses d'activité fonctionnelle et de concentrations de protéines du complément. Les conditions de transport, par l'intermédiaire du réseau de transport d'échantillons du CHU de Lille, sont également satisfaisantes au vu des résultats de redosage des échantillons ayant réalisé le trajet aller-retour (CV compris entre -10 et $+10\%$). Un seul échantillon a présenté un CV élevé après transport (alors que le second échantillon du même envoi était strictement comparable au premier dosage). Lors de l'envoi remis en question, les résultats rendus par le laboratoire receveur étaient parfaitement

cohérents avec ceux des autres participants, ce qui n'est pas en faveur d'un biais lié aux conditions de transport. L'erreur est en définitive considérée comme ponctuelle et aléatoire et l'envoi n'a pas été invalidé.

L'analyse des résultats d'un échange inter-laboratoires repose (i) sur la comparaison des résultats de chaque participant à la valeur « conventionnellement vraie » du paramètre considéré dans l'échantillon et (ii) sur la définition de critères d'acceptabilité des performances analytiques [22, 29, 30]. Aucun matériel international de référence n'est actuellement disponible pour les dosages du complément sur plasma EDTA. Pour estimer la valeur théorique de chaque paramètre à mesurer par les différents laboratoires dans le cadre de l'EIL, nous nous sommes donc appuyés à chaque fois sur l'ensemble des résultats disponibles [22, 30]. Il n'existe pas non plus à l'heure actuelle de recommandation précise pour la définition de critères d'acceptabilité et l'interprétation de données d'EIL dans le cadre d'un faible nombre de participants (< 5 laboratoires). La méthodologie adoptée lors de la mise en place initiale de cet échange inter-laboratoires est basée sur l'état de l'art, et implique le calcul des moyennes, écarts-types, CV et z-scores correspondant aux résultats de chacun par rapport à ceux des autres participants [20, 31]. Le faible nombre de laboratoires ayant participé à l'échange reste la principale limite de ces indicateurs, essentiellement basés sur une hypothèse de distribution normale. Des alternatives ont été proposées dans la littérature, basées sur des paramètres statistiques plus robustes et moins sensibles à la distribution de la population de résultats [22, 30]. Ces indicateurs ne sont néanmoins pas recommandés à l'heure actuelle par le Cofrac. Le choix de la méthodologie nécessaire à l'analyse et à l'interprétation des résultats d'un EIL, plus particulièrement la recherche de potentielles valeurs aberrantes, le choix de l'indicateur à exploiter et la définition de limites d'acceptabilité cohérentes implique de nombreuses notions statistiques d'un maniement parfois complexe, en particulier dans le contexte d'effectifs aussi restreints que ceux-ci [22, 30]. Ces principes sont néanmoins d'une grande importance pour permettre d'exploiter correctement les résultats et de répondre aux objectifs de performances analytiques de ces programmes [31, 32].

Conclusion

Suite à une procédure de validation extensive, notre programme d'échange inter-laboratoires pour les dosages du complément sur plasma EDTA est dorénavant disponible. Ce nouveau programme d'évaluation externe de la qualité représente une aide conséquente pour l'accréditation des laboratoires concernés.

Remerciements. Les auteurs remercient Messieurs Jérôme Dhainaut et Marc Trotin, du secteur des analyses extérieures du CHU de Lille, pour la programmation et la supervision des transports d'échantillons.

La société The Binding Site a participé à l'élaboration de cet échange inter-laboratoires par le don de kits de dosages de CH50, C3, C4 et C1-inhibiteur à titre gracieux.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

- Rosain J, Dragon-Durey M-A, Frémeaux-Bacchi V. Complément, exploration (CH50, C3, C4, facteur B). *EMC - Biologie Médicale* 2015 ; 10 : 1-6.
- Prohászka Z, Nilsson B, Frazer-Abel A, Kirschfink M. Complement analysis 2016: clinical indications, laboratory diagnostics and quality control. *Immunobiology* 2016 ; 221 : 1247-58.
- Frémeaux-Bacchi V, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Blouin J, *et al.* Exploration du complément : actualités 2012. *Rev Francoph Lab* 2012 ; 2012 : 31-7.
- Frazer-Abel A, Sepiashvili L, Mbughuni MM, Wilrich MAV. Overview of laboratory testing and clinical presentations of complement deficiencies and dysregulation. *Adv Clin Chem* 2016 ; 77 : 1-75.
- Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007 ; 44 : 3838-49.
- Mollnes TE, Garred P, Bergseth G. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin Exp Immunol* 1988 ; 73 : 484-8.
- Yang S, McGookey M, Wang Y, Cataland SR, Wu HM. Effect of blood sampling, processing, and storage on the measurement of complement activation biomarkers. *Am J Clin Pathol* 2015 ; 143 : 558-65.
- Arnaud J, Adjidé V, Vassault A. Comparaisons inter-laboratoires/évaluation externe de la qualité. *Ann Biol Clin (Paris)* 2010 ; 68 : 227-36.
- NF EN ISO 15189 : Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. Afnor, 2012.
- Document SH REF 02 - Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. Révision 05. Cofrac, 2016.
- Bowden DW, Rising M, Akots G, Myles A, Broeze RJ. Homogeneous, liposome-based assay for total complement activity in serum. *Clin Chem* 1986 ; 32 : 275-8.
- Yamamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchiyama S, *et al.* Automated homogeneous liposome-based assay system for total complement activity. *Clin Chem* 1995 ; 41 : 586-90.
- Zegers I, Keller T, Schreiber W, Sheldon J, Albertini R, Bliirup-Jensen S, *et al.* Characterization of the new serum protein reference material ERM-DA470k/IFCC: value assignment by immunoassay. *Clin Chem* 2010 ; 56 : 1880-8.

14. Ghillani P, Dufat L, Sterlin D, Musset L. Analytical performances of Outilite(®) turbidimeter (The Binding Site): a new dedicated analyser for specific proteins determination. *Ann Biol Clin (Paris)* 2017; 75 : 29-37.
15. Tange CE, Kaur A, Verma N, Hickey A, Grigoriadou S, Scott C, *et al.* Quantification of human C1 esterase inhibitor protein using an automated turbidimetric immunoassay. *J Clin Lab Anal* 2019; 33(1) : e22627.
16. ISO Guide 30. Reference materials - Selected terms and definitions. 2015.
17. Bastin P, Favresse J, Strel C, Maisin D, Fillée C, Gruson D. Assessment of in vitro stability: a call for harmonization across studies. *Clin Chem Lab Med* 2017; 56(5) : e121-4.
18. ISO 5725-6. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values, 1994.
19. Yoon JG, Park BG, Kwon SS, Song J, Kim H-S. Automated CH50 liposome-based immunoassay: consideration in dilution and validation of reference interval. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54 : e309-12.
20. SH GTA 06 - Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. 00 ed. Cofrac, 2012.
21. Visser RG. Interpretation of interlaboratory comparison results to evaluate laboratory proficiency. *Accreditation Qual Assur* 2006; 10 : 521-6.
22. Coucke W, Soumali MR. Demystifying EQA statistics and reports. *Biochem Medica* 2017; 27 : 37-48.
23. Lachmann PJ. Preparing serum for functional complement assays. *J Immunol Methods* 2010; 352 : 195-7.
24. Prohászka Z, Kirschfink M, Frazer-Abel A. Complement analysis in the era of targeted therapeutics. *Mol Immunol* 2018; 102 : 84-8.
25. Stöve S, Klos A, Bautsch W, Köhl J. Re-evaluation of the storage conditions for blood samples which are used for determination of complement activation. *J Immunol Methods* 1995; 182 : 1-5.
26. Watkins J, Wild G, Smith S. Nafamostat to stabilise plasma samples taken for complement measurements. *The Lancet* 1989; 1(8643) : 896-7.
27. Pfeifer PH, Kawahara MS, Hugli TE. Possible mechanism for in vitro complement activation in blood and plasma samples: futhan/EDTA controls in vitro complement activation. *Clin Chem* 1999; 45 : 1190-9.
28. Bergseth G, Ludviksen JK, Kirschfink M, Giclas PC, Nilsson B, Mollnes TE. An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products. *Mol Immunol* 2013; 56 : 232-9.
29. Jones GRD, Albaredo S, Kessler D, MacKenzie F, Mammen J, Pedersen M, *et al.* Analytical performance specifications for external quality assessment – definitions and descriptions. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55 : 949-55.
30. Kristensen GBB, Meijer P. Interpretation of EQA results and EQA-based trouble shooting. *Biochem Medica* 2017; 27(1) : 49-62.
31. Scherrer F, Boisson RC, Cartier R, Cohen R, Eynard JC, Poggi B, *et al.* Réflexion sur le choix des limites acceptables dans les programmes d'évaluation externe de la qualité. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007; 65 : 677-84.
32. Sciacovelli L, Zardo L, Secchiero S, Plebani M. Quality specifications in EQA schemes: from theory to practice. *Clin Chim Acta* 2004; 346 : 87-97.