

DIAGNOSTIC DE L'INSUFFISANCE RENALE

Amélioration de la mesure de la créatinine par le développement de méthodes et de matériaux de référence



Février 2015

RESUME

La mesure de la concentration de créatinine sérique est l'élément central de l'évaluation biologique de l'insuffisance rénale puisque les résultats obtenus sont utilisés dans le calcul du débit de filtration glomérulaire (DFG) estimé, qui détermine le protocole thérapeutique à mettre en place pour le patient. Un décalage relativement faible entre les laboratoires de biologie médicale (20 $\mu\text{mol/L}$) peut conduire à de grandes différences d'estimation de la fonction rénale, et ce particulièrement dans le cas des valeurs basses de créatinine qui correspondent à des fonctions rénales normales ou peu altérées ou bien chez l'enfant, entraînant de fait une prise en charge inadaptée des patients.

Différentes techniques sont actuellement mises en œuvre dans les laboratoires de biologie médicale et leur étalonnage est réalisé à partir d'étalons de travail spécifiques à chaque fabricant. Cette situation rend impossible toute comparaison des résultats d'analyse fournies par deux laboratoires et masque les biais analytiques qui peuvent entacher certains résultats de mesure.

La réforme de la biologie médicale, actuellement en cours en France, témoigne de la prise de conscience récente d'un besoin de traçabilité métrologique des résultats de mesure dans le domaine de la chimie clinique ainsi que de la nécessaire évaluation des incertitudes de mesure. Elle doit permettre d'améliorer la qualité de la biologie médicale en demandant à ce que soient utilisées des procédures validées dont les résultats sont raccordés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne de traçabilité métrologique ininterrompue.

Le développement de méthode de référence primaire pour la mesure de la créatinine a permis l'assignation de valeur de référence traçables aux échantillons utilisés dans le cadre du Contrôle National de Qualité de l'ANSM ou d'essais d'aptitudes volontaires. La mise sur le marché d'un matériau de référence certifié permet également aux industriels du diagnostic *in vitro* de raccorder métrologiquement leur kit de dosage. Tout cela contribue à accroître la fiabilité du diagnostic de l'insuffisance rénale.



Sommaire

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Avant propos | 4 |
| 2. | Créatine, créatinine et créatininémie | 4 |
| 2.1. | Qu'est-ce que c'est ? | 4 |
| 2.2. | Quelques chiffres | 5 |
| 2.3. | Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique | 5 |
| 3. | Les analyses de biologie médicale | 6 |
| 3.1. | Aspects économiques | 6 |
| 3.2. | La question de la qualité des résultats de mesure en biologie clinique | 8 |
| 3.3. | Le cadre réglementaire et normatif | 9 |
| 3.4. | Situation internationale | 9 |
| 4. | Le dosage de la créatinine | 10 |
| 4.1. | Différentes méthodes de dosage de la créatinine sérique | 10 |
| 4.1.1. | Méthodes colorimétriques | 10 |
| 4.1.2. | Méthodes enzymatiques | 10 |
| 4.1.3. | Spectrométrie de masse avec dilution isotopique (DI-MS) | 10 |
| 4.2. | Dispositifs de diagnostic in vitro disponibles sur le marché | 11 |
| 4.3. | Démarche de contrôle de qualité | 11 |
| 5. | Besoin de traçabilité métrologique pour les mesures de créatinine | 12 |
| 5.1. | Méthode développée au LNE pour la mesure de la créatinine | 12 |
| 5.2. | Apport de la métrologie dans le domaine de la biologie clinique | 13 |
| 5.2.1. | Performances des méthodes d'analyse de routine de la créatinine | 13 |
| 5.2.2. | Matériau de référence certifié | 16 |
| 6. | Annexe : Matériaux de référence certifiés disponibles en 2014 dans la base de données du JCTLM Mai 2011 pour la créatinine dans une matrice sérum | 17 |
| 7. | Références | 18 |
| 8. | Pour aller plus loin | 18 |



1. Avant propos

L'insuffisance rénale chronique est un **problème de santé publique majeur** (Meguid El Nahas et al. *Chronic kidney disease: the global challenge, Lancet; 365 (9456): 331-40, 2005*). De **deux à trois millions de personnes seraient ainsi atteintes par cette pathologie en France**, alors que le nombre de patients en insuffisance rénale terminale est de l'ordre de 65 000, en augmentation croissante. Dans ces cas extrêmes, la dialyse s'avère indispensable pour le patient, avant éventuellement la greffe d'un nouveau rein qui constitue l'ultime recours.

Par ailleurs, parmi les 7 500 patients qui entrent en dialyse chaque année, 35 % n'ont pas bénéficié à temps d'une prise en charge néphrologique, alors qu'un dépistage précoce aurait pu éviter à la maladie d'arriver au stade terminal de l'insuffisance rénale, puisqu'un traitement et un suivi adaptés, ainsi que le respect de règles d'hygiéno-diététiques, peuvent notablement en ralentir la progression.

Au-delà des conditions de vie rendues parfois très difficiles pour les personnes souffrant de cette pathologie, les problèmes d'insuffisance rénale représentent également un coût important pour la collectivité. Il apparait donc essentiel, dans la mesure où des traitements retardant l'évolution de la maladie sont disponibles, de pouvoir effectuer précocement le diagnostic de la maladie rénale chronique.



Le **diagnostic de l'insuffisance rénale** se base sur l'**analyse de la créatinine présente dans le sang**, qui constitue à ce jour le meilleur biomarqueur de cette pathologie souvent asymptomatique.

2. Créatine, créatinine et créatininémie

2.1. Qu'est-ce que c'est ?

La **créatine** est un **dérivé d'acide aminé naturel**, présent principalement dans les fibres musculaires, et dont le produit de réaction avec l'adénosine triphosphate (ATP) assure la réserve d'énergie à moyen terme de l'organisme (phosphocréatine, PCr). En cas de besoin, le PCr va pouvoir, par réaction inverse, reconstituer l'ATP, source d'énergie immédiatement disponible pour l'activité musculaire.

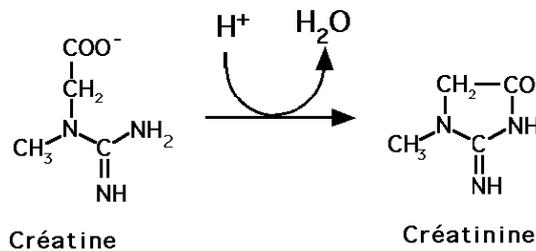


Figure 1 - Catabolisme de la créatine

La **créatinine** (2-amino-3-méthyl-4H-imidazol-5-one) est une substance azotée qui **provient de la dégradation de la créatine** à l'effort (réaction de déshydratation). Cette dégradation de la créatine musculaire est un phénomène permanent ; chaque jour environ 1,7 % de la créatine musculaire totale est transformée en créatinine selon le catabolisme présenté sur la Figure 1. La quantité de créatinine ainsi produite est donc quasiment constante pour chaque individu. Comme il s'agit par ailleurs d'une molécule inerte physiologiquement, qui n'est ni métabolisée, ni utilisée d'une quelconque manière par l'organisme, elle est éliminée régulièrement par les reins dans les urines et il n'en reste qu'une petite partie dans le sang. Dès que

son taux augmente anormalement dans le sang, cela signifie que la fonction rénale (filtration des reins) est déficitaire.

Le **suivi de la concentration de la créatinine dans le plasma**, *i.e.* le sang débarrassé des globules rouges, blancs et plaquettes, est donc un témoin intéressant du fonctionnement des reins et de leur capacité de filtration. Cette analyse est plus communément connue sous le terme de **créatininémie**.

2.2. Quelques chiffres

La créatinine étant un produit de dégradation de la créatine musculaire, les valeurs de créatininémie dépendent par conséquent fortement de la masse musculaire de l'individu concerné. Les femmes, les personnes âgées et les enfants présentent donc des valeurs plus faibles que les hommes (cf. Tableau 1) (K. Sikaris, *Clin. Biochem.* 31 (2010) 121-128).

| | Créatinine |
|--------|--------------------------|
| Homme | 65-120 $\mu\text{mol/L}$ |
| Femme | 50-100 $\mu\text{mol/L}$ |
| Enfant | 30-88 $\mu\text{mol/L}$ |

Tableau 1 - Concentrations normales de la créatinine dans le sang

[K. Sikaris, *Clin. Biochem.* 31 (2010) 121-128]

Les concentration de créatinine correspondant à un **domaine clinique normal** sont comprises entre **40 $\mu\text{mol/L}$ et 120 $\mu\text{mol/L}$** (A. Killard, M. Smyth, *Tibtech* 18, 2000, 433-437). Des valeurs supérieures à 140 $\mu\text{mol/L}$ nécessitent de réaliser des essais cliniques supplémentaires, alors qu'au-delà de 530 $\mu\text{mol/L}$ le diagnostic d'insuffisance rénale est immédiat. La concentration en créatinine dans le sang peut même dépasser les 1000 $\mu\text{mol/L}$ en cas de dysfonctionnement rénal. Les patients doivent alors être soumis à une dialyse régulière et à une surveillance quotidienne de leur créatininémie.

2.3. Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique

Un taux élevé de créatinine dans le sang doit conduire à rechercher sa clairance dans les urines, prélevées sur 24 heures. Ce paramètre, qui représente le nombre de millilitres de sang que les reins sont capables de filtrer et d'expurger de la créatinine en une minute, permet d'estimer la fonction rénale. Plusieurs facteurs, dont l'âge, une alimentation riche en protéines, l'état de santé, mais surtout la capacité d'épuration des reins influent sur la valeur de la clairance. Les valeurs normales de clairance de la créatinine se situent entre 90 et 140 mL/min. Dans un cas pathologique, la clairance de la créatinine se détériore progressivement jusqu'à ce que le malade soit en insuffisance rénale.

Des recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) existent depuis plusieurs années pour aider les praticiens dans le « diagnostic de l'insuffisance rénale chronique (IRC) chez l'adulte » [Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. *Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte. Recommandations pour la pratique clinique.* Paris: ANAES; 2002]. Leur objectif est de permettre une reconnaissance de cette pathologie à son stade débutant afin de concourir à une prise en charge plus précoce des patients en IRC non terminale. Ces recommandations se basent sur l'estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG¹), qui définit cinq stades de sévérité de la maladie rénale chronique (Levey AS, Eckardt K, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. *Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*, *Kidney Int* 2005;67(6):2089-100).

¹ DFG = clairance de la créatinine pour 1,73 m² de surface corporelle

| Stade | DFG (mL/min/1,73 m ²) | Définition |
|-------|--------------------------------------|--|
| 1 | ≥ 90 | Maladie rénale chronique avec DFG normal ou augmenté |
| 2 | Entre 60 et 89 | Maladie rénale chronique avec DFG légèrement diminué |
| 3 | Entre 30 et 59 | Insuffisance rénale chronique modérée |
| 4 | Entre 15 et 29 | Insuffisance rénale chronique sévère |
| 5 | < 15 | Insuffisance rénale chronique terminale |

Tableau 2 - Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique

Pour obtenir des résultats de clairance de la créatinine plus rapidement qu'avec le recueil des urines des 24 heures, plusieurs formules plus ou moins complexes sont proposées à partir d'un **simple dosage de la créatinine sérique**. La formule dite de Cockcroft et Gault, qui a été validée par comparaison avec des clairances mesurées dans les urines des 24 heures, a notamment longtemps été considérée comme la référence. Depuis 2012, la Haute Autorité de Santé (HAS) préconise d'utiliser plutôt l'équation de CKD-EPI pour évaluer directement le DFG, différentes études ayant montré qu'elle conduisait à des résultats plus fiables que ceux obtenus via la formule de Cockcroft et Gault. La **détermination préalable de la créatininémie est cependant commune à ces deux formules**.

3. Les analyses de biologie médicale

3.1. Aspects économiques



Le **dosage de la créatinine représente en France plus de 15 millions d'actes prescrits par an** (*Points de repère, Les actes de biologie médicale : analyse des dépenses en 2008 et 2009, Décembre 2010, numéro 33*), avec une augmentation de 26 % du nombre d'examens ces dernières années. Cela le place au cinquième rang des actes les plus prescrits (voir Tableau 3) et représente un **coût d'environ 40 M€ par an** pour la collectivité. A ces coûts engendrés par les examens de biologie médicale, il convient également d'ajouter ceux relatifs à la prise en charge thérapeutique des personnes concernées par cette pathologie,

qui peuvent être très divers (dialyse, soins, hospitalisation, ...). Au final, le traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale représente **2 % de la totalité des dépenses de santé de l'Assurance Maladie au bénéfice de seulement moins de 0,1 % de la population française** (*Rapport du contrôle de marche des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage de la créatinine : Etat des lieux, notices et traçabilité, Février 2010, AFSSAPS*).

Le dépistage précoce de cette pathologie apparaît donc crucial également du point de vue économique. Chaque stade de l'IRC faisant appel à une prise en charge spécifique, il apparaît primordial que la fiabilité du diagnostic soit accrue, ce qui passe par une **maîtrise de la procédure analytique mise en œuvre pour le dosage de la créatinine dans le sérum**.

| Rang | Libellé de l'acte | Nombre d'analyse (en milliers d'actes) | | | | Part de l'acte en 2009 | Montant remboursable (en millions d'€) | | | | Part de l'acte en 2009 |
|------|---|---|----------------|----------------|----------------|---------------------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------|
| | | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | |
| 1 | Hémogramme y compris plaquette (NFS, NFP) | 29 098 | 30 273 | 31 676 | 32 726 | 9,28% | 297,1 | 285,8 | 299,4 | 309,3 | 10,5% |
| 2 | Glycémie | 20 521 | 20 973 | 21 581 | 21 864 | 6,20% | 55,4 | 56,6 | 58,2 | NR | NR |
| 3 | Transaminases | 13 091 | 15 419 | 16 301 | 16 964 | 4,81% | 83,1 | 91,5 | 96,8 | 92,9 | 3,1% |
| 4 | Ionogramme sanguin | 12 591 | 13 701 | 14 767 | 15 774 | 4,47% | 68,0 | 73,9 | 79,7 | 85,2 | 2,9% |
| 5 | Créatininémie | 13 662 | 14 389 | 15 128 | 15 698 | 4,45% | 36,9 | 38,8 | 40,8 | 42,4 | 1,4% |
| 6 | Vitesse de sédimentation | 14 337 | 14 728 | 15 131 | 15 360 | 4,36% | 38,7 | 39,7 | 40,9 | 41,5 | 1,4% |
| 7 | Exploration d'une anomalie lipidique | 12 636 | 13 316 | 13 946 | 14 583 | 4,13% | 187,6 | 193,6 | 169,7 | 160,0 | 5,4% |
| 8 | Temps de Quick (en cas de traitement par les AVK) | 11 865 | 12 484 | 13 152 | 13 658 | 3,87% | 64,1 | 67,4 | 71,0 | 73,8 | 2,5% |
| 9 | Protéine C-réactive (CRP) | 10 188 | 11 161 | 12 293 | 13 328 | 3,78% | 90,2 | 90,3 | 99,6 | 92,6 | 3,1% |
| 10 | Gamma GT | 8 195 | 10 430 | 11 167 | 11 849 | 3,36% | 44,2 | 54,8 | 45,3 | 48,0 | 1,6% |
| | Ensemble des 10 premiers actes | 146 184 | 156 874 | 165 142 | 171 804 | 49% | 965 | 992 | 1 001 | 946 | 32% |
| | Ensemble des actes | NR | 322 967 | 338 763 | 352 704 | 100% | NR | 2901,1 | 2955,9 | 2957,4 | 100% |

Tableau 3 - Evolution du nombre d'actes de biologie et du montant remboursable de 2006 à 2009

[Points de repère, Les actes de biologie médicale : analyse des dépenses en 2008 et 2009, Décembre 2010, numéro 33]

3.2. La question de la qualité des résultats de mesure en biologie clinique

La justesse des analyses dans le domaine de la chimie clinique est cruciale car elle a un impact direct sur l'établissement de diagnostics médicaux et sur la surveillance des traitements médicaux. Or, contrairement aux autres domaines de la mesure, les résultats des analyses de biologie médicale ne sont pas métrologiquement traçables à des références communes reconnues internationalement. Une majeure partie de la production d'étalons et de matériaux pour le contrôle de la qualité est en effet fournie par les fabricants d'instruments. Ces matériaux ne sont la plupart du temps pas comparables d'un fabricant à l'autre, ce qui provoque des problèmes de comparabilité des données d'un laboratoire à un autre lorsque des instruments provenant de divers fabricants sont utilisés.

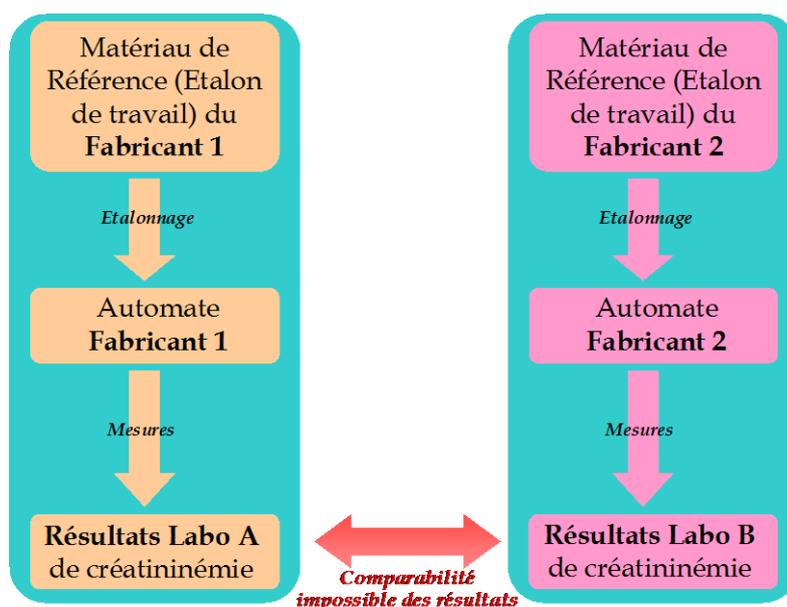


Figure 2 - Chaîne de traçabilité métrologique classique dans le domaine de la biologie clinique

Jusqu'à maintenant la qualité des analyses et en particulier leur justesse étaient évaluées au travers d'essais inter-laboratoires (évaluation externe de la qualité) organisés par les autorités de tutelle dans le cadre du Contrôle National de la Qualité (CNQ de l'ANSM, cf. 4.3) ou sur une base volontaire par l'intermédiaire d'organismes d'essais d'aptitudes². Les incertitudes des résultats d'analyses n'étaient pas évaluées et la justesse était uniquement appréciée par la mesure de l'écart entre le résultat d'un laboratoire et la moyenne obtenue par ses pairs, retenue la plupart du temps comme valeur de référence de l'essai d'aptitude. Or cette moyenne peut être entachée d'une erreur systématique (biais) sans qu'il soit forcément possible de la détecter. Des contrôles internes aux laboratoires venaient compléter ces dispositions. Cette façon de pratiquer était la conséquence de l'absence de valeurs de référence réellement traçables du point de vue métrologique aux unités du Système International (SI). Elle était par ailleurs complètement en contradiction avec les référentiels internationaux mis en place dans le même temps (§ 3.3).

Ces pratiques limitent la confiance qui peut être portée dans les résultats, ce qui a pour conséquences la répétition inutile d'analyses, le manque de données fiables pour les études d'épidémiologie et une comparaison des études cliniques entre elles rendue difficile faute de références communes et d'une évaluation des incertitudes. Par ailleurs la prise de décisions adéquates par les praticiens n'est pas facilitée par cet état de fait, et ce d'autant plus lorsque les valeurs trouvées par le laboratoire sont proches d'une limite déclenchant parfois des décisions thérapeutiques majeures.

Dans le cas de la créatinine, un décalage relativement faible entre les laboratoires de biologie médicale (20 $\mu\text{mol/L}$) peut conduire à de grandes différences d'estimation de la fonction rénale (via le calcul du DFG), et ce

² CTCB (Centre Toulousain de Contrôle en Biologie), PROBIOQUAL, ASQUALAB, ABP, ...

particulièrement dans le cas des valeurs basses de créatinine qui correspondent à des fonctions rénales normales, ou peu altérées, ou bien chez l'enfant.

L'amélioration de la fiabilité des résultats d'analyse de biologie médicale nécessite par conséquent :

- **d'assurer la traçabilité métrologique des mesures à des matériaux de référence d'ordre supérieur reconnus sur le plan international ;**
- **d'évaluer les incertitudes de mesures associées aux résultats de ces analyses.**

3.3. Le cadre réglementaire et normatif

La réforme de la biologie médicale, actuellement en cours en France, doit permettre l'amélioration de la qualité et de l'efficacité de la biologie médicale. L'ordonnance du 13 janvier 2010 portant cette réforme a été ratifiée en mai 2013 et rend notamment **obligatoire l'accréditation par le COFRAC sur la qualité prouvée** de tous les laboratoires de biologie médicale (publics comme privés) selon la norme NF EN ISO 15189 et le calendrier ci-dessous.

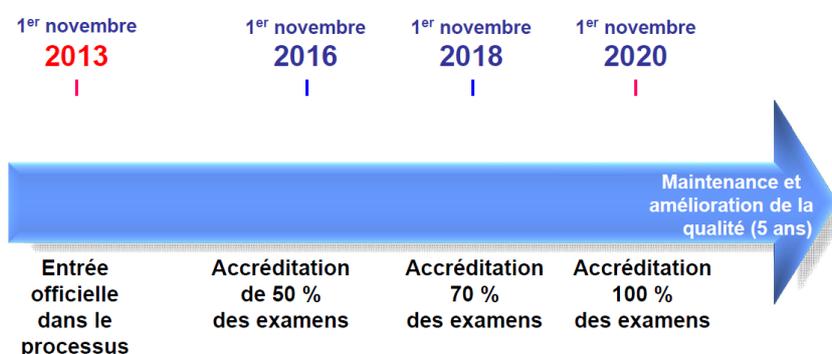


Figure 3 - Calendrier de la mise en œuvre de la réforme de la biologie médicale en France

Ce référentiel implique l'utilisation de procédures validées et dont les résultats doivent être rattachés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne de traçabilité métrologique ininterrompue.

Par ailleurs, la **Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*** demande à ce que "La traçabilité des valeurs attribuées aux matériaux d'étalonnage et de contrôle de la qualité soit garantie par les méthodes de référence ou les matériaux de référence certifiés de niveau supérieur disponibles".

3.4. Situation internationale

Actuellement des démarches sont entreprises pour assurer la traçabilité des analyses à des références reconnues au plan international. Cela permettra la comparabilité des résultats et donnera des fondements scientifiques aux études épidémiologiques. La manifestation la plus visible de ces tendances a été la création en 2002 du JCTLM (*Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine*) par plusieurs organisations internationales :

- le *Comité international des poids et mesures* (CIPM) = les métrologues
- l'*International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) = les chimistes cliniciens ;
- l'*International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) = les organismes d'accréditation.

La France est membre du JCTLM à travers son laboratoire national de métrologie (LNE)..

Le site internet du JCTLM (www.bipm.org/jctlm) tient à disposition des laboratoires de biologie médicale et des fabricants de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* la liste des Matériaux de Référence Certifiés (MRC) disponibles, ainsi que celle des méthodes de référence permettant d'atteindre les meilleures exactitudes, afin de leur permettre d'assurer l'étalonnage de leurs instruments et la traçabilité d'étalonnage de leurs réactifs.



4. Le dosage de la créatinine

4.1. Différentes méthodes de dosage de la créatinine sérique

Différentes méthodes de dosage de la créatinine coexistent (colorimétriques, enzymatiques, chromatographiques, ...). En pratique, deux méthodes sont actuellement réalisées dans les laboratoires de biologie médicale :

- les méthodes colorimétriques avec la réaction de Jaffé (80 %)
- les méthodes enzymatiques (20 %).

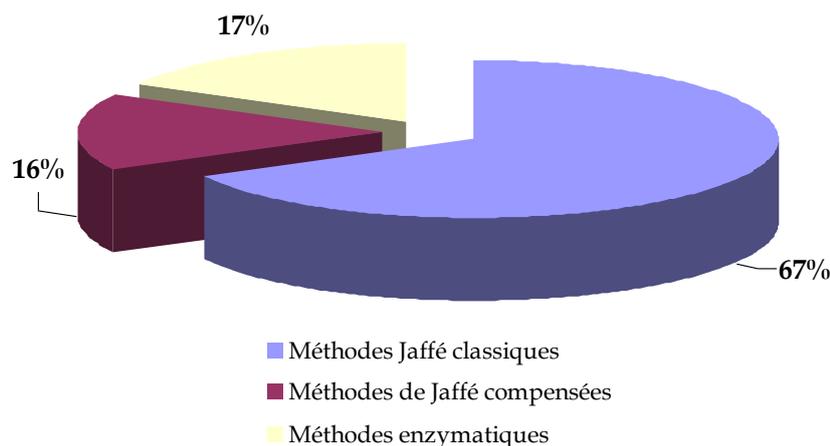


Figure 4 – Répartition des méthodes de dosage de la créatinine utilisées en 2006 dans les laboratoires de biologie médicale

(Rapport du contrôle de marche des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage de la créatinine : Etat des lieux, notices et traçabilité, Février 2010, AFSSAPS)

4.1.1. Méthodes colorimétriques

La méthode de Jaffé est une réaction colorimétrique. En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe jaune orangé. La vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon. Toutefois, des substances « pseudochromogènes » (telles que protéines, glucose, ...) peuvent perturber les résultats en donnant des concentrations de créatinine plus élevées que la réalité. Selon leur concentration, ces composés peuvent provoquer une surestimation de 18 à 20 $\mu\text{mol/L}$ de la concentration de créatinine dosée, soit un biais de l'ordre de 20 à 40 %. A l'inverse, l'augmentation de la bilirubine masque le développement de la coloration et donne des résultats faussement bas.

Les méthodes de Jaffé dites « compensées » sont apparues par la suite sur le marché et tiennent compte de l'impact de ces substances sur le résultat du dosage en effectuant une compensation des chromogènes non spécifiques (correction de -18 à -26 $\mu\text{mol/L}$).

4.1.2. Méthodes enzymatiques

Ces approches plus récentes permettent de s'affranchir de certaines de ces interférences. La méthode la plus répandue consiste en la dégradation enzymatique de la créatinine qui aboutit en fin de chaîne à la production d'eau oxygénée. Cette production d'eau oxygénée est ensuite quantifiée par une dernière réaction enzymatique.

4.1.3. Spectrométrie de masse avec dilution isotopique (DI-MS)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. Le composé organique est ionisé et l'ion obtenu permet la détermination de la masse molaire du composé. Il s'agit d'une méthode de référence complexe considérée comme primaire du

point de vue métrologique lorsqu'elle est mise en œuvre en association avec une approche par dilution isotopique (DI).

Les valeurs obtenues par DI-MS sont dépourvues de tout biais analytique et sont directement traçables à la *mole*, l'unité du SI pour la quantité de matière. Elles peuvent alors être assignées à des matériaux de référence d'ordre supérieur, qui seront utilisés pour étalonner les méthodes de routine, de types Jaffé ou enzymatiques (Figure 11). La mise en œuvre de telles méthodes de référence primaire nécessite cependant un gros investissement en terme de développement et seuls un petit nombre de laboratoires hautement spécialisés répartis à travers le monde (dont beaucoup de Laboratoire Nationaux de Métrologie comme le LNE en France) y ont recours. Le site internet du JCTLM propose une liste de ces laboratoires de référence.

Le lecteur pourra se référer à la référence suivante pour ce qui est de la définition d'une méthode de mesure primaire en chimie (MCGLASHAN Max. – Amount of Substance and the mole, Metrologia, 31 (6), pp 447–455 (1995)).

4.2. Dispositifs de diagnostic *in vitro* disponibles sur le marché

L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) a lancé en 2008 un contrôle de marché des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de dosage de la créatinine. Le rapport, paru en février 2010, fait un état des lieux du marché en France et revient sur l'importance de la traçabilité métrologique de ces mesures.

Cette étude a permis de recenser 60 réactifs (références princeps) proposés par 26 fabricants selon la répartition suivante :

- 21 réactifs enzymatiques répartis sur 17 fabricants ;
- 39 réactifs en méthode Jaffé dont
 - 16 en méthode de Jaffé corrigée ou Jaffé classique et corrigée ;
 - 23 en méthode de Jaffé classique seulement.

Il est à noter qu'au-delà du nombre relativement élevé de réactifs trouvés sur le marché, le nombre de couples réactif-analyseur est lui encore plus important puisque certains réactifs peuvent être adaptés à plusieurs analyseurs (jusqu'à 7). Cela complexifie encore plus l'introduction de la traçabilité métrologique des résultats de mesure obtenus.

4.3. Démarche de contrôle de qualité

L'ANSM (ex-AFSSAPS) organise de façon annuelle un Contrôle National de la Qualité (CNQ) des laboratoires de biologie médicale pour les différents biomarqueurs analysés en routine. Au cours des dix dernières années, le CNQ a concerné la créatinine en 2005, 2007, 2009, 2010, 2011, 2012 et 2013. Les laboratoires de biologie médicale se doivent d'y participer. Ils reçoivent pour cela des échantillons pour lesquels la valeur cible leur est inconnue et ont à fournir leurs résultats d'analyse à l'ANSM, qui peut alors évaluer leurs compétences en comparant la valeur mesurée à la cible.

Dans la plupart des essais inter-laboratoires, la valeur consensuelle à laquelle se comparent les laboratoires est calculée en effectuant la moyenne des résultats obtenus par l'ensemble des participants. Par conséquent, l'évaluation des performances d'un laboratoire est basée sur une comparaison dite « par groupe de pairs » et cela peut conduire à l'incapacité de détecter un biais systématique de l'ensemble des laboratoires ou des méthodes mises en œuvre. Cette approche peut aussi conduire à une conclusion erronée dans le cas où seul un faible nombre de laboratoires fournirait les résultats justes : on pourrait conclure à un défaut de justesse de ces laboratoires en raison de l'écart avec la valeur de référence, qui serait en fait elle-même biaisée.

Seul le recours à une méthode de référence primaire permet de s'affranchir de ces biais de mesure et permet donc d'évaluer la justesse des méthodes utilisées en routine par les laboratoires de biologie médicale. Cela passe par l'assignation, via la méthode de référence, d'une valeur de référence à l'échantillon utilisé pour l'essai d'aptitudes.



5. Besoin de traçabilité métrologique pour les mesures de créatinine

Dès 2002, la nécessité d'assurer la traçabilité métrologique du dosage de la créatinine a été évoquée au cours d'une étude menée aux USA. Cette réflexion était d'ailleurs plus large comme en témoigne la création dans le même temps du JCTLM (cf. § 3.4). Cependant la France n'a disposé d'aucun laboratoire de référence pour le développement des méthodes primaires adéquates à l'établissement d'une traçabilité métrologique des mesures dans le domaine de la biologie médicale jusqu'à la fin des années 2000.

Depuis 2006, le LNE a initié des actions de R&D pour être en mesure d'accompagner les laboratoires de biologie médicale dans leur démarche d'accréditation et les industriels du diagnostic *in vitro* dans la fiabilisation des performances de leurs dispositifs. Les biomarqueurs ciblés jusqu'alors sont ceux pour lesquels les retombées en terme de santé publique et du point de vue économique sont les plus importantes, à savoir glucose, créatinine, cholestérol, triglycérides et HbA1c.

5.1. Méthode développée au LNE pour la mesure de la créatinine

Le LNE a développé, au cours des dernières années, une méthode primaire de référence par DI-GC/MS pour être en mesure d'assigner des valeurs de référence métrologiquement traçables aux échantillons utilisés dans le cadre du CNQ de l'ANSM ou d'essais d'aptitudes volontaires.

Les différentes étapes de cette méthode sont décrites sur la Figure 5. L'utilisation de créatinine marquée au ^{13}C est indispensable à la mise en œuvre de l'approche par Dilution Isotopique (DI). L'optimisation de la méthode a porté sur :

- l'étape de préparation des échantillons critique pour la mise en œuvre de la DI ;
- l'étape de purification sur colonne échangeuse d'ions ;
- les conditions de dérivation préalables à la séparation par chromatographie gazeuse ;
- les conditions chromatographiques.

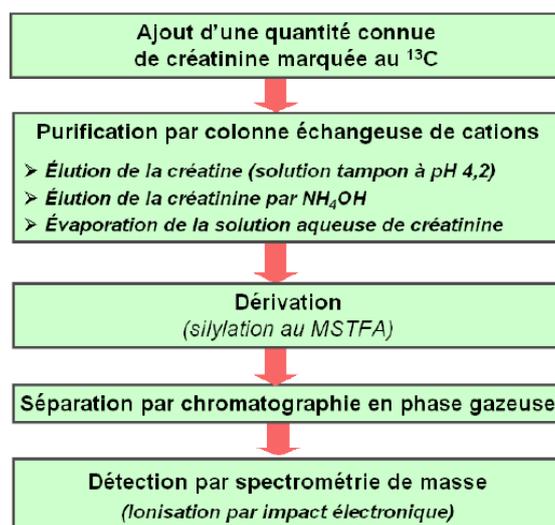


Figure 5 - Les différentes étapes de la méthode de détermination de la créatinine par DI-GC/MS

La justesse de cette méthode a pu être évaluée au moyen de 4 matériaux de référence certifiés³ :

- SRM 967 : Niveau 1 @ 66,5 μM + Niveau 2 @ 346,2 μM (NIST) ;
- ERM252a @ 27,7 μM & ERM253a @ 449 μM (LGC).

³ La liste des matériaux de référence certifiés (MRC) actuellement disponibles et référencés dans la base du JCTLM est donnée en annexes (cf. § 6)

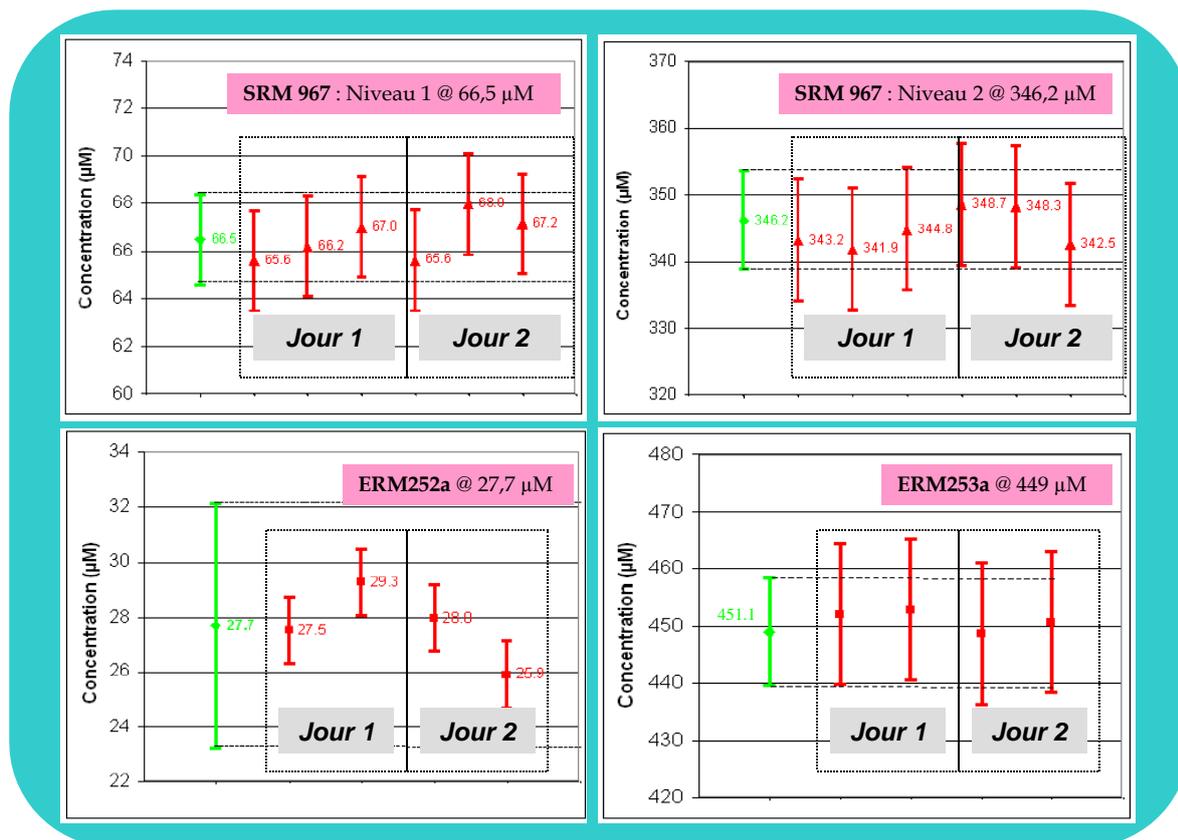


Figure 6 - Résultats obtenus pour la validation de la méthode de référence développée (valeur moyenne mesurée en vert)

La Figure 6 donne les résultats obtenus pour des mesures réalisées en réplicats et sur deux jours. Il apparaît que les écarts normalisés sont dans tous les cas inférieurs à 2, ce qui signifie que les valeurs mesurées ne sont pas significativement différentes des valeurs de référence fournies dans les certificats des matériaux de référence utilisés. La méthode peut être donc considérée comme validée.

A noter que les incertitudes de mesure du protocole utilisé lors de cette étude de validation n'avaient pas été optimisées : elles étaient alors de l'ordre de 2 à 3 %. Des considérations relatives à la pesée de la créatinine non marquée ont permis dans un second temps de diminuer ces incertitudes de mesure à 1,5 % environ, et ce quelle que soit la concentration de l'échantillon.

Les performances atteintes par la méthode développée sont donc du même ordre de grandeur que celles obtenues par les autres laboratoires de référence du domaine.

5.2. Apport de la métrologie dans le domaine de la biologie clinique

Dans le but d'évaluer la qualité des analyses de routine, la méthode développée au LNE a été utilisée pour fournir des valeurs de référence aux échantillons utilisés dans le cadre d'essais d'aptitude volontaires et pour le contrôle national de qualité (CNQ) de l'ANSM. Cette approche permet d'identifier les méthodes les plus justes qui doivent donc être préconisées aux laboratoires de biologie médicale.

5.2.1. Performances des méthodes d'analyse de routine de la créatinine

Dans l'ensemble, les méthodes de routine fournissent de bons résultats pour les concentrations supérieures à 200 µmol/L, qui sont celles rencontrées chez les insuffisants rénaux. Les résultats obtenus dans le cadre du CNQ de l'ANSM sont présentés sur la Figure 7.

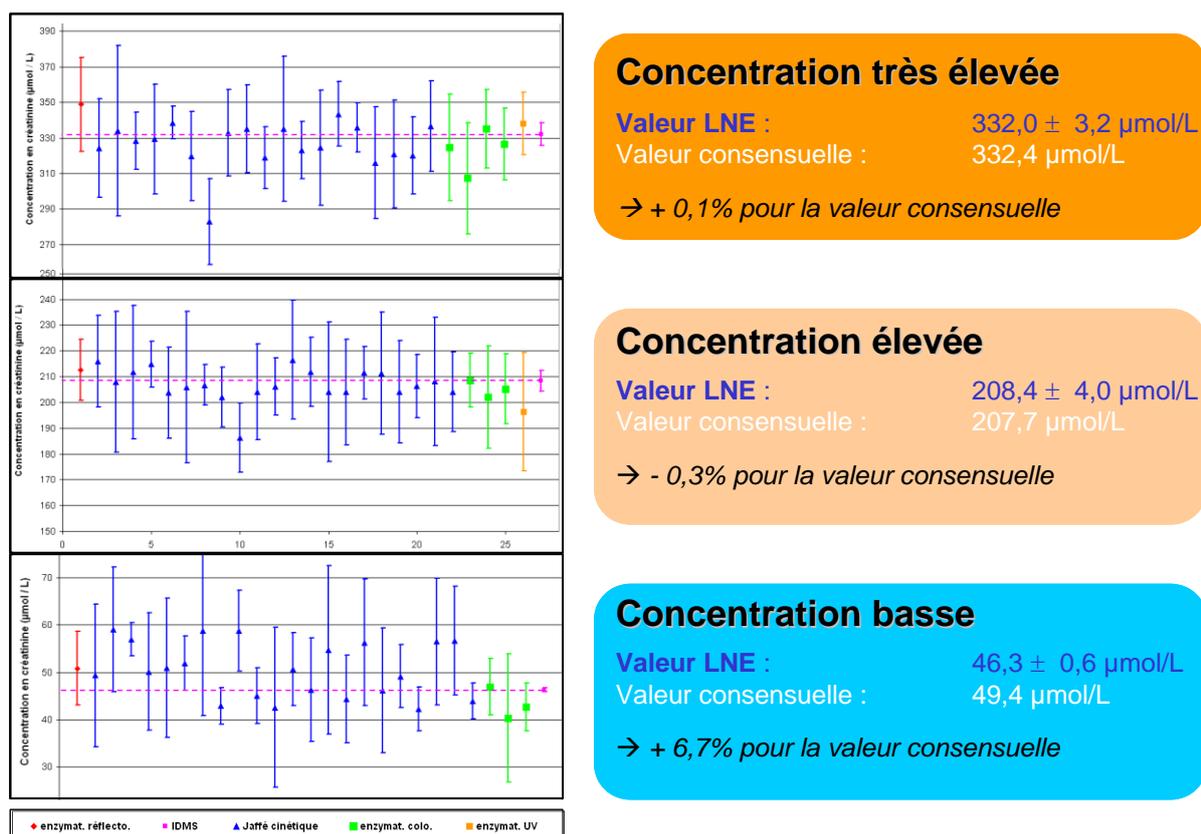


Figure 7 - Plus-value d'une valeur de référence (pointillés roses) par rapport à une valeur consensuelle dans le cadre d'essais d'aptitudes (axe des abscisses = laboratoires participant à l'essai d'aptitudes)

Il apparaît que pour les concentrations élevées et très élevées de créatinine, les performances des méthodes de routine sont très satisfaisantes : l'écart entre la valeur consensuelle (qui correspond à la moyenne des résultats de tout les participants) et la valeur donnée par la méthode de référence DI-MS est très faible. Une seule méthode fournit une valeur significativement différente de celle du LNE. L'analyse des résultats «méthode par méthode» montre que les techniques enzymatiques avec détection spectro-rélectrométrique ont tendance à surestimer la créatininémie d'environ 5 %. Les autres méthodes sont dans l'ensemble juste car leur biais n'excède pas 2 %.

En revanche, des erreurs de justesse importantes ont été observées pour les concentrations basses, voire très basses, qui définissent l'insuffisance rénale débutante, car proches du seuil de décision clinique en pédiatrie (de l'ordre de $50 \mu\text{mol/L}$) ou chez l'adulte (environ $100 \mu\text{mol/L}$).

Le CNQ de l'ANSM a par exemple mis en évidence (cf. Figure 8) une très forte différence entre les résultats fournis par :

- 1) l'ensemble constitué par les méthodes dites « Jaffé classique » et les méthodes enzymatiques avec détection spectro-reflectométrique d'une part ;
- 2) l'ensemble constitué par la méthode dites « Jaffé compensé » et les méthodes enzymatiques avec détection spectro-photométrique d'autre part.

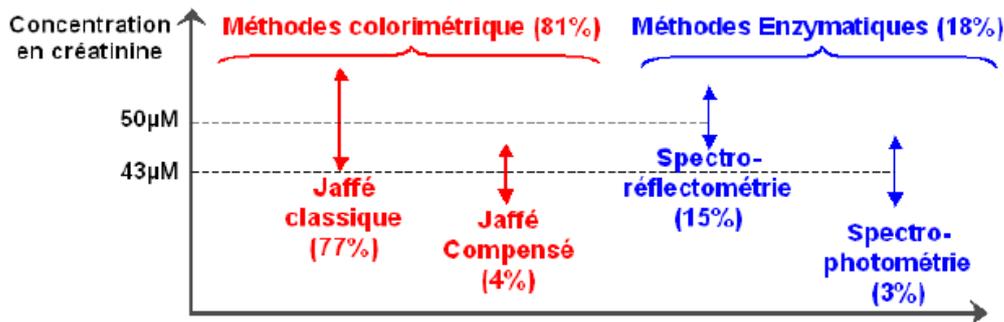


Figure 8 - Résultats du Contrôle National de Qualité (CNQ) de l'ANSM pour les concentrations basses de créatinine

Le graphe porté sur la Figure 9 donne quelques informations supplémentaires sur les performances des différentes méthodes utilisées en routine pour analyser la créatinine sérique. L'écart entre la valeur obtenue par les techniques de routine et la valeur de référence obtenue via la méthode de référence DI-MS (cf. § 5.1) est porté en ordonnée du graphique. Pour chaque méthode, le nombre et le pourcentage de laboratoires utilisant chacun des 3 grands types de méthode sont indiqués.

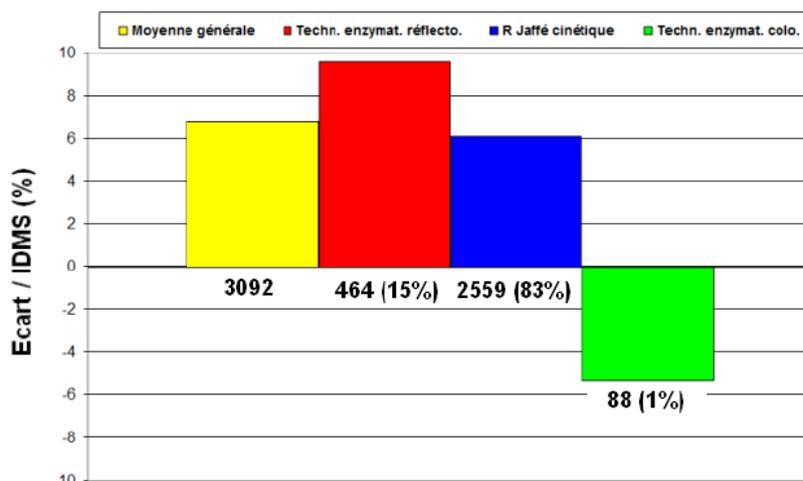


Figure 9 - Résultats du CNQ par principe de méthode pour les concentrations basses de créatinine (environ 45 µmol/L)

Ces résultats confirment que les performances des méthodes de routine sont insuffisantes aux concentrations basses :

- les méthodes enzymatiques avec détection spectro-rélectométrique sur-estiment la concentration en créatinine d'environ 10 % ;
- dans leur ensemble, les méthodes enzymatiques avec détection spectro-photométrique sous-estiment la créatininémie d'environ 5 %, mais l'analyse des résultats par couple automate/réactif montrent que les différents couples n'ont pas un comportement homogène. Il est par ailleurs à noter le faible pourcentage de laboratoires (1 %) ayant recours à cette famille de techniques ;
- les méthodes colorimétriques de type Jaffé (qui sont les plus utilisées avec 80 % des utilisateurs) ont dans l'ensemble tendance à sur-estimer très nettement la créatininémie aux concentrations basses (biais positif de 10 à 25 % dans la majorité des cas).

Par ailleurs, le fait que la **valeur consensuelle** (moyenne de l'ensemble des résultats des laboratoires) soit **environ 7 % plus élevée que la valeur de référence** fournie par la méthode DI-MS de référence montre l'importance de disposer de telles méthodes pour évaluer de façon fiable les performances des laboratoires.



5.2.2. Matériau de référence certifié

Un matériau de référence certifié (MRC) a par ailleurs pu être développé pour répondre aux besoins des organisateurs d'essais d'aptitudes et des industriels du diagnostic *in vitro*. Il concerne plusieurs biomarqueurs d'intérêt (glucose, cholestérol total, triglycérides et créatinine) à chaque fois à deux niveaux de concentration correspondant aux cas sain et pathologique.



Figure 10 - Matériau de Référence Certifié développé par le LNE pour la créatinine, le glucose et le cholestérol

La disponibilité de tels matériaux de référence certifiés rend possible le raccordement métrologique des étalons de travail des fabricants de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Cette nouvelle chaîne de traçabilité (Figure 11) a pour conséquence directe de permettre une comparabilité des résultats de mesure obtenus au moyen d'instruments provenant de différents fabricants et donc de contribuer à une fiabilisation des résultats délivrés par les laboratoires de biologie médicale.

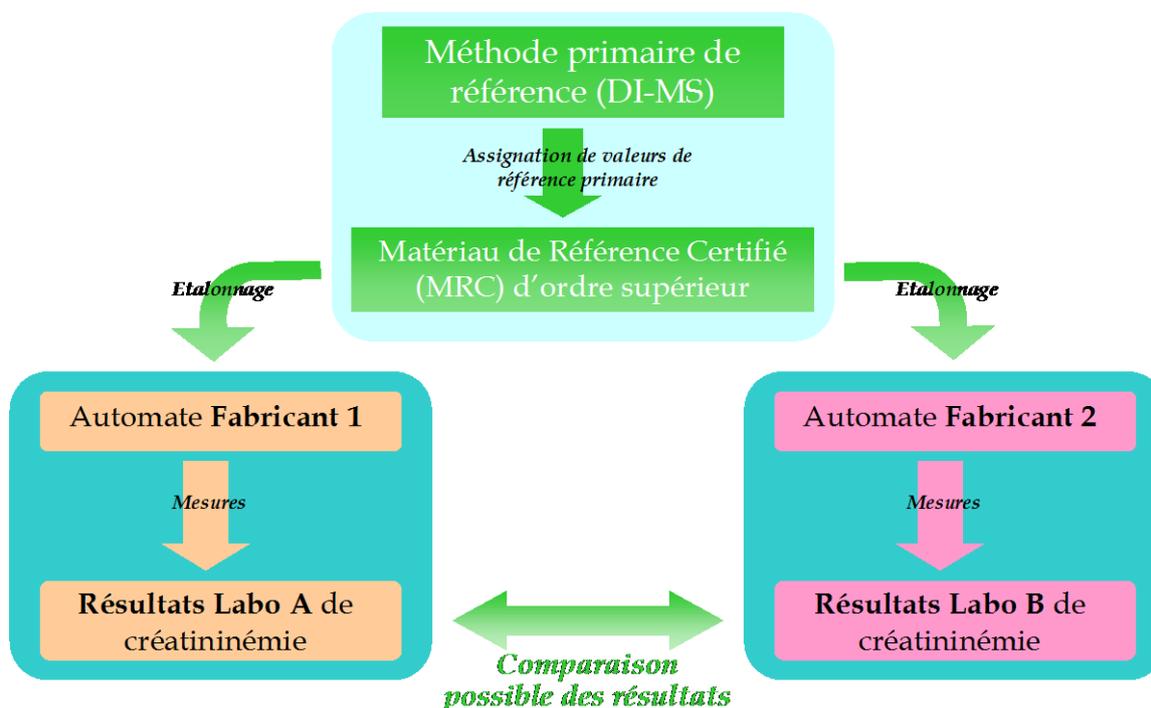


Figure 11 – Nouvelle chaîne de traçabilité à mettre en œuvre dans le domaine de la biologie clinique

6. Annexe : Matériaux de référence certifiés disponibles en 2014 dans la base de données du JCTLM *Mai 2011* pour la créatinine dans une matrice sérum

| Référence | Producteur | Matrice | Concentration | Incertitudes étendues (niveau de confiance à 95%) |
|------------|-----------------|-------------------------|---------------------------------|---|
| DMR 263a | CENAM (Mexique) | Sérum humain congelé | 66,4 $\mu\text{mol/L}$ | 1,6 à 3,2 $\mu\text{mol/L}$ |
| SRM 967 | NIST (USA) | Sérum humain congelé | 7,5 à 39 mg/L | 0,16 à 0,49 mg/L |
| BCR-573 | IRMM (UE) | Sérum humain lyophilisé | 68,7 $\mu\text{mol/L}$ | 1,4 $\mu\text{mol/L}$ |
| BCR-574 | IRMM (UE) | Sérum humain lyophilisé | 105 $\mu\text{mol/L}$ | 1,3 $\mu\text{mol/L}$ |
| BCR-575 | IRMM (UE) | Sérum humain lyophilisé | 404,1 $\mu\text{mol/L}$ | 7,1 $\mu\text{mol/L}$ |
| ERM-DA252a | LGC (GB) | Sérum humain lyophilisé | 3,1 mg/L | 0,2 mg/L |
| ERM-DA253a | LGC (GB) | Sérum humain lyophilisé | 50 mg/L | 2 mg/L |
| ERM-DA250a | LGC (GB) | Sérum humain lyophilisé | 39 mg/L | 2 mg/L |
| ERM-DA250a | LGC (GB) | Sérum humain lyophilisé | 22 mg/L | 2 mg/L |
| SRM 909b | NIST (USA) | Sérum humain lyophilisé | 56,18 à 467,4 $\mu\text{mol/L}$ | 0,55 à 5,3 $\mu\text{mol/L}$ |
| HRM-3002A | HSA (Singapour) | Sérum humain congelé | 57,2 à 366 $\mu\text{mol/L}$ | 1,2 à 4 $\mu\text{mol/L}$ |

Tableau 4 - Matériaux de Référence Certifiés (MRC) pour la créatinine en matrice sérum

7. Références

DELATOUR V., LALÈRE B., DE GRAEVE J. et VASLIN-REIMANN S., "Developpement of reference methods for the measurement of biomarkers in France" , *Ann. Biol. Clin.*, **68**, 6, 2010, 698-699

DELATOUR V., LALÈRE B., DUMONT G., HATTCHOUEL J.-M., FROISSART M., DE GRAEVE J. et VASLIN-REIMANN S., "Development of a reference method for creatinine measurement to improve diagnosis and follow-up of kidney disease" , *Revue française de métrologie*, **26**, 2011, 21-31, DOI: [10.1051/rfm/2011008](https://doi.org/10.1051/rfm/2011008)

PIERONI L., DELANEY P., BOUTTEN A., BARGNOUX A.-S., ROZET E., DELATOUR V., CARLIER M.-C., HANSER A.-M., CAVALIER E., FROISSART M. et CRISTOL J.-P., "A multicentric evaluation of IDMS-traceable creatinine enzymatic assays" , *Clinica Chimica Acta*, **412**, 23-24, 2011, 2070-2075, DOI: [10.1016/j.cca.2011.07.012](https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.012)

BOUTTEN A., BARGNOUX A.S., CARLIER M.C., DELANAYE P., ROZET E., DELATOUR V., CAVALIER E., HANSER A.M., FROISSART M., CRISTOL J.-P. et PIÉRONI L., "Enzymatic but not compensated Jaffe methods reach the desirable specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicentric evaluation" , *Clinica Chimica Acta*, **419**, 2013, 132-135, DOI: [10.1016/j.cca.2013.01.021](https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.01.021)

FLAMANT M., VIDAL-PETIOT E., METZGER M., HAYMANN J.P., LETAVERNIER E., DELATOUR V., KARRAS A., THERVET E., BOFFA J.J., HOUILLIER P., STENGEL B., VRTOVSNIK F. et FROISSART M., "Performance of GFR Estimating Equations in African Europeans: Basis for a Lower Race-Ethnicity Factor Than in African Americans" , *Am. J. of Kidney Disease*, **62**, 1, 2013, 182-184, DOI: [10.1053/j.ajkd.2013.03.015](https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.03.015)

8. Pour aller plus loin

- Site internet du JCTLM : <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>
- Site internet du CNQ ANSM : [http://ansm.sante.fr/Activites/Controle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/CNQ-Dernieres-mises-a-jour/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Controle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/CNQ-Dernieres-mises-a-jour/(offset)/0)
- Rapport ANSM (ex AFSSAPS) :
Rapport du contrôle de marche des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage de la créatinine - Etat des lieux, notices et traçabilité, *Février 2010*
- Rapport ANSM (ex AFSSAPS) :
Dosage de la créatinine, état des lieux, notices et tracabilité – Contrôle de marché 2008-2010, *Février 2010*
- Note de cadrage de l'HAS :
Dosage de la créatininémie, évaluation du débit de filtration glomérulaire et rapport albuminurie/créatininurie dans le diagnostic de l'insuffisance rénale chronique, *Mai 2011*
- Rapport d'évaluation technologique de l'HAS :
Évaluation du débit de filtration glomérulaire, et du dosage de la créatininémie dans le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte, *Décembre 2011*

