

CHAPITRE 2.2.4.

INCERTITUDE DES MESURES

INTRODUCTION

Les Recommandations de l'OMSA pour la validation fournissent des informations détaillées et des exemples à l'appui de la Norme de validation publiée au Chapitre 1.1.6 Validation des épreuves diagnostiques pour les maladies infectieuses des animaux terrestres du présent Manuel terrestre. L'expression « Norme de validation de l'OMSA » dans le présent chapitre doit être comprise comme renvoyant à ce chapitre.

L'estimation de l'incertitude des mesures, parfois appelée imprécision des mesures, est une exigence commune aux laboratoires de diagnostic s'appuyant sur des normes de qualité internationales telle la norme ISO/CEI 17025-2005, Prescriptions générales concernant la compétence des Laboratoires d'étalonnages et d'essais (ISO/CEI 17025). Le procédé de mesure pour la détection d'un analyte dans un échantillon diagnostique n'étant pas entièrement reproductible, il n'existe de ce fait pas de valeur exacte qui puisse être associée à l'analyte mesuré. Le résultat est donc exprimé avec le plus de précision possible sous forme d'une estimation accompagnée d'un niveau d'imprécision associé. Cette imprécision constitue l'incertitude des mesures. Elle se limite au processus de mesure. Il ne s'agit pas de savoir si la mesure est appropriée et adéquate à l'usage qui en sera fait. Il ne s'agit pas non plus d'une alternative à la validation du test, mais elle est considérée à juste titre comme un élément de ce processus (voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.1.1).

A. NECESSITE DE DETERMINER L'INCERTITUDE DES MESURES

Pour garantir le respect des exigences de la norme ISO/CEI 17025-2005, les organes nationaux d'accréditation des laboratoires de diagnostic demandent des estimations de l'incertitude des mesures pour les méthodes de test qui produisent des résultats quantitatifs tels que densité optique, pourcentage de positivité ou d'inhibition (PP, PI), titres, valeurs seuils (Ct), etc. Cela inclut des tests où les résultats numériques sont calculés puis exprimés sous forme de résultats positifs ou négatifs par rapport à une valeur seuil. Aux fins de cette estimation de l'incertitude des mesures en sérologie et pour la RT-PCR, les mesures statistiques adéquates sont les valeurs moyennes ± 2 écarts-types (ET), ce qui équivaut pratiquement à l'intervalle de confiance à 95 % (IC), à l'écart type relatif (ETR = ET/moyenne des répliques) et au coefficient de variation (CV = ETR x 100 %). Le concept d'incertitude des mesures ne s'applique pas directement aux résultats strictement binaires (positifs ou négatifs).

1. Échantillons servant à déterminer l'incertitude des mesures

La répétabilité est le degré de concordance intra-cycle et inter-cycles entre les résultats de tests répétés sur un échantillon selon la même méthode de test et dans un laboratoire donné. Au cours de la mise au point de l'essai, la répétabilité est estimée en évaluant la variation des résultats de plusieurs cycles indépendants pour un minimum de trois échantillons (cinq de préférence) représentatifs de l'activité de l'analyte à l'intérieur de la plage de fonctionnement de l'essai (voir la Norme de validation de l'OMSA, Sections A.2.5 et B.1.1, ainsi que le Chapitre 2.2.6 *Sélection et utilisation des échantillons et panels de référence*, Section 3.1). Généralement, la variation des résultats entre les cycles est exprimée comme un écart type relatif (RSD) ou un coefficient de variation (CV). Le point important est que les études de répétabilité peuvent être utilisées pour définir la précision attendue de l'essai dans la détection d'une gamme de concentrations de l'analyte.

L'utilisation de contrôles internes de la qualité ou du procédé sur une plage de résultats attendus fait désormais partie intégrante des opérations quotidiennes de contrôle qualité et d'assurance qualité des installations accréditées (voir Norme de validation de l'OMSA, Sections a.2.6 et B.5.1, ainsi que Chapitre 2.2.6, Section 1.4). Ces

résultats fournissent un contrôle permanent des différents aspects de la répétabilité, dont des variations intra-cycle et inter-cycles, intra-opérateur et inter-opérateurs ainsi qu'intra-lot et inter-lots qui, lorsqu'elles font l'objet d'une analyse statistique, deviennent l'expression du degré de robustesse (précision) du procédé de test. Le suivi des paramètres du contrôle de qualité de l'essai en termes de répétabilité apporte la preuve que l'essai fonctionne ou non comme attendu. Afin que les échantillons témoins permettent des déductions valides quant à la précision de l'essai, ils doivent être manipulés exactement de la même manière que les échantillons de test, pour chaque cycle de l'essai, y compris lors des étapes de préparation de l'échantillon telles l'extraction ou la dilution des échantillons de sérum pour un dosage immuno-enzymatique (ELISA).

La variation des résultats des échantillons de contrôle peut également être utilisée comme estimation de ces sources cumulées d'incertitude ; elle est appelée approche « descendante ». Cette approche admet que les composantes de précision apparaîtront lors de la dernière mesure. Ainsi, le suivi de la précision des mesures dans le temps montrera effectivement les effets combinés de l'imprécision associée aux différentes étapes.

L'imprécision ou l'incertitude du processus de mesure associée au résultat du test gagne en importance lorsque la valeur du test approche la valeur du seuil diagnostique. Cela provient du fait que l'interprétation quant au statut du résultat du test (positif, négatif ou douteux) se fait en relation avec le seuil de l'essai (comme décrit dans les exemples qui suivent). Dans ce contexte, les échantillons faiblement positifs, tels ceux utilisés dans les études de répétabilité ou tels les témoins faiblement positifs, sont particulièrement appropriés à l'estimation de l'incertitude des mesures. La raison en est que l'incertitude des mesures, qui est fonction de la précision de l'essai, est particulièrement problématique aux points critiques (seuils), généralement proches de la limite inférieure de détection de l'essai. Le présent chapitre décrit l'utilisation de l'incertitude des mesures par rapport aux valeurs seuils, qu'elle soit recommandée par les fabricants de kits de test ou décidée dans le laboratoire diagnostique.

2. Exemple du calcul de l'incertitude des mesures dans les méthodes de sérologie par ELISA

Pour la plupart des titrages d'anticorps, il est important de se rappeler que les tests sont en grande majorité des mesures de l'activité d'un anticorps relativement à un seuil par rapport auquel une interprétation dichotomique de résultat positif ou négatif est appliquée. C'est important, car cela permet de décider si l'utilisation de l'incertitude des mesures est appropriée. En sérologie, l'incertitude est souvent plus importante au seuil entre les mesures positives et négatives. Les résultats qui entrent dans cette zone sont donc décrits comme intermédiaires, douteux, suspects ou ambigus (voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.4).

Un ensemble limité de données provenant d'un ELISA compétitif pour la détection des anticorps contre le virus de l'influenza aviaire est utilisé comme exemple d'une approche sérologique « descendante ». Un échantillon témoin faiblement positif a été utilisé pour calculer l'incertitude de la mesure au niveau du seuil.

2.1. Méthode d'expression de l'incertitude des mesures

Comme l'incertitude doit être estimée au seuil, qui n'est pas nécessairement le niveau de réaction du sérum témoin faiblement positif, l'écart type relatif (ETR), ou coefficient de variation (CV), exprimé en pourcentage, fournit une conversion adéquate :

$$\text{ETR} (X) = \text{ET} (X) / \bar{X}$$

Pour simplifier l'évaluation, le résultat converti est considéré comme le résultat de sortie de l'essai, dont la moyenne est établie sur le nombre de passages (\bar{X}). Dans cet exemple d'ELISA compétitif, les résultats sont « normalisés » (comme défini par la Norme de validation de l'OMSA, Section A.2.7) par rapport à un étalon de travail en calculant le rapport de chaque valeur de densité optique (DO) sur le résultat de DO d'un témoin non réactif (négatif) (DO_N). Ce rapport est soustrait de 1 pour définir le niveau d'activité de l'anticorps sur une échelle de corrélation positive ; plus ce niveau est élevé, plus la valeur calculée est élevée. Cette valeur ajustée exprimée en pourcentage est qualifiée de pourcentage d'inhibition ou valeur PI. Pour le sérum témoin faiblement positif (DO_L), la conversion pour obtenir le pourcentage d'inhibition du sérum témoin faiblement positif (PI_L) est la suivante :

$$\text{PI}_L = 100 \times [1 - \{\text{DO}_L / \text{DO}_N\}]$$

L'écart type relatif est alors :

$$\text{ETR (PI}_L) = \text{ET (PI}_L) / (\text{PI}_L)$$

2.2. Exemple

Un ensemble de données limité (influenza aviaire) pour cet exemple d'ELISA compétitif est présenté ci-dessous. Dans cette expérience, l'opérateur a testé un sérum témoin faiblement positif dix fois dans le même cycle. Idéalement, dans cette utilisation d'une méthode « descendante », un grand ensemble de données doit être utilisé pour permettre de tenir compte des effets dus aux changements d'opérateurs et de composants de l'essai (autres que le sérum témoin seulement) sur sa précision.

<i>Test</i>	<i>PI(%)</i>
1	56
2	56
3	61
4	64
5	51
6	49
7	59
8	70
9	55
10	42

PI moyen = 56,3 ; écart-type (ET) = 7,9 ; passages (n) = 10

2.3. Calculer l'incertitude

À partir de cet ensemble limité de données

$$\text{ETR (PI}_L) = \text{ET/PI moyen } 7,9/56,3 = 0,14 \text{ (ou coefficient de variation = 14 \%)}$$

L'incertitude élargie (U) est le paramètre statistique définissant l'intervalle à l'intérieur duquel la valeur de la mesure est supposée se situer dans un degré de confiance spécifié, généralement 95 %. L'élargissement de l'incertitude se fait en multipliant l'ETR (PI_L) par un facteur 2 ; cela permet de calculer un intervalle de confiance avoisinant les 95 % aux environs des valeurs seuils (dans ce cas précis, avec un PI = 50 %), partant de l'idée que les données ont une distribution normale.

$$U \text{ (IC à 95 \%)} = 2 \times \text{ETR} = 0,28$$

Cette valeur estimative peut ensuite s'appliquer au niveau du seuil :

$$\text{IC à 95 \%} = 50 \pm (50 \times 0,28) = 50 \pm 14 \%$$

2.4. Interprétation

Tout résultat positif (PI > 50 %) de moins de 64 % n'est pas positif avec une confiance de 95 %. De manière analogue, un résultat négatif (PI < 50 %) supérieur ou égal à un PI de 36 n'est pas négatif avec un degré de confiance de 95 %. Cette zone de confiance moindre peut être corrélée avec la « zone grise » ou la « zone douteuse/suspecte » pour l'interprétation, à définir pour tous les tests (Greiner *et al.*, 1995).

B. AUTRES UTILISATIONS

L'approche descendante s'applique à tout un éventail de tests diagnostiques, y compris les tests moléculaires. Pour les épreuves utilisant des séries typiques de dilution au demi pour le témoin positif, comme la neutralisation

virale, la fixation du complément ou les tests d'inhibition de l'hémagglutination, une moyenne géométrique des titrages (soit moyenne et écart type des valeurs de titrage de log base 2) du sérum témoin positif doit être calculée. Les écarts types relatifs basés sur ces valeurs d'échelle logarithmique peuvent ensuite être appliqués au titre (log) du seuil et finalement convertis pour représenter l'incertitude au seuil. Dans tous les cas, cette méthode part du principe que la variance par rapport au témoin positif utilisé pour estimer l'ETR est proportionnellement similaire au point où s'applique l'incertitude des mesures, par exemple au seuil. Si l'ETR varie significativement sur l'échelle de mesure, le sérum témoin positif utilisé pour estimer l'incertitude des mesures au seuil doit être sélectionné pour un niveau d'activité proche de celui du seuil. L'*Australian Subcommittee for Animal Health Laboratory Standards* (SCAHLs) fournit des exemples élaborés pour de nombreux tests diagnostiques, disponibles sur le site internet du SCAHLs :

<http://www.agriculture.gov.au/animal/health/laboratories/tests/worked-example-measurement>

Pour les essais PCR en temps réel quantitatifs, (qPCR), les passages répétés de témoins positifs avec leurs valeurs seuils respectives (Ct) peuvent être utilisés pour estimer l'incertitude des mesures selon cette méthode descendante.

D'autres méthodes et leurs variations ont été décrites, par exemple pour les tests sérologiques (Dimech *et al.*, 2006 ; Goris *et al.*, 2009 ; Toussaint *et al.*, 2007). Des travaux supplémentaires et des documents stratégiques sont disponibles auprès du National Pathology Accreditation Advisory Group and Life Science. Le document indispensable à l'incertitude des mesures est le Guide pour l'expression de l'incertitude des mesures (GUM), Guide ISO/CEI (1995).

RÉFÉRENCES

AMERICAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION (A2LA). Policy on estimating measurement uncertainty for life science testing labs https://portal.a2la.org/policies/A2LA_P103b.pdf (accessed 22 November 2018).

AUSTRALIAN GOVERNMENT, DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND WATER RESOURCES. Worked of measurement uncertainty <http://www.agriculture.gov.au/animal/health/laboratories/tests/worked-example-measurement> (accessed 22 November 2018).

AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF HEALTH AND AGEING (2007). Requirements for the estimation of measurement uncertainty, National Pathology Accreditation Advisory Group. [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/B1074B732F32282DCA257BF0001FA218/\\$File/dhaeou.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/B1074B732F32282DCA257BF0001FA218/$File/dhaeou.pdf) (accessed 22 November 2018).

DIMECH W., FRANCIS B., KOX J. & ROBERTS G. (2006). Calculating uncertainty of measurement for serology assays by use of precision and bias. *Clin. Chem.*, **52**, No. 3, 526–529.

GORIS N., VANDENBUSSCHE F., HERR, C., VILLERS, J., VAN DER STEDE, Y. & DE CLERCQ K. (2009). Validation of two real-time PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effects, uncertainty of measurement and precision. *J. Virol. Methods*, **160**, 157–162.

GREINER M., SOHR D. & GOEBEL P.A. (1995). Modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests, *J. Immunol. Methods*, **185**, 123–132.

ISO/IEC (1995). Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), ISO/IEC Guide 98:1995. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

ISO/IEC (2005). ISO/IEC 17025:2005. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

TOUSSAINT J.F., ASSAM P., CAIJ B., DEKEYSER F., KNAPEN K., IMBERECHTS H., GORIS N., MOLENBERGHS G., MINTIENS K., & DE CLERCQ K. (2007). Uncertainty of measurement for competitive and indirect ELISAs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **26**, 649–656.

*
* *

N. B. : ADOPTE POUR LA PREMIERE FOIS EN 2014.