

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

IMMUNODOSAGES DIFFÉRENTIELS DES ISOFORMES DE L'HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE (hGH) DESTINÉS AUX ANALYSES DE CONTRÔLE DU DOPAGE

Le présent Document technique a pour but de garantir une approche harmonisée de l'application des immunodosages différentiels d'isoformes destinés à détecter le dopage à l'hormone de croissance humaine (hGH) dans le sport. Il donne des instructions relatives à la procédure de préparation pré-analytique de l'échantillon, à l'exécution des analyses et à l'interprétation de leurs résultats.

1.0 Introduction à la méthode

Les immunodosages différentiels d'isoformes destinés à détecter le dopage à l'hGH ont été développés pour faire la distinction entre les proportions d'isoformes de l'hGH présentes dans des conditions physiologiques normales et celles trouvées après injection d'hGH recombinante (rec) [1, 2].

La méthode s'appuie essentiellement sur le principe établi selon lequel la composition normale de l'hGH dans le sang est un mélange de différentes isoformes, présentes dans des proportions relativement constantes. En revanche, la recGH se compose presque exclusivement de la forme moléculaire 22-kDa monomérique. L'administration de recGH exogène non seulement entraîne une augmentation de la concentration de l'isoforme 22-kDa, mais aussi provoque une réduction des concentrations des autres isoformes, ce qui modifie les ratios naturels de ces isoformes [3].

1.1 Principe de la méthode

Pour effectuer l'analyse, deux kits distincts ('1' et '2', fournis par CMZ-Assay GmbH, Allemagne) sont utilisés pour mesurer les isoformes de l'hGH pour l'analyse de chaque *échantillon* [4]. L'un ou l'autre kit peut être utilisé pour la procédure d'analyse initiale, alors que le kit '1' ainsi que le kit '2' doivent être utilisés pour la ou les procédure(s) de confirmation.

Chaque kit contient une méthode de dosage pour l'hGH 'recombinante' et une méthode de dosage pour l'hGH 'pituitaire'. Dans la méthode 'recombinante' (recGH), l'anticorps de capture se lie spécifiquement à l'hGH 22-kDa monomérique présente dans les *échantillons*, alors que la méthode 'pituitaire' (pitGH) emploie un anticorps de capture qui reconnaît diverses isoformes de l'hGH dérivées de l'hGH pituitaire. Les méthodes de dosage respectives sont désignées sous les noms de « rec1 », « pit1 », « rec2 » et « pit2 ». Le résultat de l'analyse est exprimé comme le ratio des concentrations recGH / pitGH pour chaque kit spécifique.

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

2.0 Exigences du dosage

Avant de mettre en œuvre cette méthode dans des analyses de *contrôle du dopage* de routine, le laboratoire doit répondre aux exigences suivantes :

- Valider la performance de la méthode dans le laboratoire, y compris, par exemple, la détermination de la limite de quantification (LQ) de la méthode, la répétabilité (s_r) en laboratoire et la précision intermédiaire (s_w).

Les valeurs d'acceptation pour ces paramètres de performance de la méthode applicables aux déterminations séparées des concentrations de recGH et de pitGH (« rec1 », « pit1 », « rec2 » et « pit2 ») sont :

- s_r (exprimée en tant qu'écart-type relatif (ETR) intra-analyse) $\leq 15\%$.
- s_w (exprimée en tant qu'ETR inter-analyses) $\leq 20\%$.
- $LQ \leq 0,050 \text{ ng/mL}^1$, définie comme la plus faible concentration avec $s_r \leq 15\%$ et $s_w \leq 20\%$.
- En outre, le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure (IM) de la méthode à partir des données de validation du laboratoire. L'incertitude type combinée (u_c), appliquée aux ratios recGH / pitGH de la méthode, ne doit pas être supérieure aux niveaux maximum de u_{c_Max} fixés à partir des données du système d'évaluation externe de la qualité inter-laboratoires (EQAS) [u_{c_Max} relative = 20% pour les deux kits, à des valeurs proches des limites de décision (LD) correspondantes].
- Participer avec succès à au moins un EQAS organisé par l'AMA afin de démontrer sa capacité à mettre en œuvre la méthode. En cas de déficiences identifiées, des mesures correctrices appropriées doivent être prises.
- Obtenir l'accréditation ISO/IEC-17025 pour la méthode d'immunodosage différentiel des isoformes de l'hGH de la part d'un organisme d'accréditation qui est membre à part entière de la Coopération internationale d'accréditation des laboratoires (ILAC) et signataire de l'Accord de reconnaissance mutuelle de l'ILAC (ILAC MRA).

2.1 Procédure de préparation pré-analytique

À la réception des *échantillons* « A » et « B » par le laboratoire, les étapes suivantes doivent être suivies :

- Vérifier que les *échantillons* de sang ont été prélevés dans des tubes contenant un gel séparateur de sérum polymérique inerte et un facteur

¹ Les LQ du laboratoire, établies à $\leq 0,050 \text{ ng/mL}$ sur la base des critères de performance de la méthode ($s_r \leq 15\%$ et $s_w \leq 20\%$), ne devraient pas être inférieures aux valeurs de LQ respectives établies par le fabricant des kits.

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

d'activation de la coagulation (tubes BD Vacutainer® SST™-II, ref. UE 367955; tubes BD Vacutainer® SST™-II Plus Advance, ref. UE 367954) conformément aux Lignes directrices de l'AMA pour le prélèvement des *échantillons* sanguins [5]. De tels *échantillons* de sang devraient être réfrigérés (et non congelés) après le prélèvement et durant le transport jusqu'au laboratoire.

- À titre alternatif, les *échantillons* peuvent être reçus au laboratoire sous forme d'*échantillons* de sérum congelés ou réfrigérés, après la coagulation et la centrifugation du sang et la séparation de la fraction de sérum sur le site du prélèvement de l'*échantillon*.
- Tout *échantillon* fourni au laboratoire en tant que plasma ne sera pas accepté aux fins de l'analyse de l'hGH avec les kits actuels. Conformément à cette règle, les autorités de collecte des échantillons reçoivent les lignes directrices applicables au prélèvement des *échantillons* sanguins pour l'analyse de l'hGH, qui spécifient que la matrice d'analyse est le sérum [5]. Le laboratoire doit notifier et demander conseil à l'autorité de contrôle à propos du rejet ou de l'analyse des *échantillons* pour lesquels des irrégularités sont relevées (conformément au SIL 6.2.2.4; [6]). Si les *échantillons* sont recueillis dans une matrice inappropriée (selon la détermination de l'autorité de gestion des résultats), les résultats de cette analyse ne seront pas pris en compte.
- Vérifier le statut de l'*échantillon*/ des *échantillons* (par exemple, preuve de l'hémolyse) et l'intégrité des tubes de prélèvement (par exemple, preuve de bris du gel de séparation). Le laboratoire doit noter tout état inhabituel de l'*échantillon*, enregistrer cet état et l'inclure dans le rapport d'analyse envoyé à l'autorité de contrôle.
- Pour les *échantillons* reçus en tant que sang entier dans des tubes SST™-II ou SST™-II Plus Advance:

Échantillon « A »

- L'*échantillon* « A » doit être centrifugé pendant 10 à 15 minutes à 1300-1500g dès que possible après la réception.

- Après séparation, la fraction de sérum de l'*échantillon* « A » devrait être transférée entièrement dans un autre tube ou aliquotée dans de nouveaux flacons, qui doivent être correctement étiquetés afin de respecter la documentation liée à la chaîne de possession interne du laboratoire. Une partie aliquotée doit être utilisée pour la procédure d'analyse initiale. Le reste de la ou des partie(s) aliquotée(s) de l'*échantillon* « A » non utilisé pour la procédure d'analyse initiale doit être stocké congelé² jusqu'à la procédure de confirmation de l'*échantillon* « A », si nécessaire.

² Pour le stockage des parties aliquotées, il convient d'utiliser des flacons adaptés à la congélation fermant hermétiquement (pour un stockage optimal, des vials cryogéniques avec un « joint en O » sont recommandés) et les conditions suivantes sont recommandées:

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

- Pour la procédure d'analyse initiale, les parties aliquotes de l'*échantillon* « A » peuvent être analysées immédiatement après aliquotage ou bien être stockées à environ 4°C pendant un maximum de 24 h avant analyse (pas plus de 4 jours à partir du prélèvement de l'*échantillon*). Si ce n'est pas possible, les parties aliquotes de l'*échantillon* « A » doivent être congelées² jusqu'à l'analyse.

Échantillon « B »

- L'*échantillon* « B » doit être centrifugé pendant 10 à 15 minutes à 1300-1500g dès que possible après la réception. Après séparation, l'intégralité de la fraction de sérum de l'*échantillon* « B » doit être conservée dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* SSTTM-II ou SSTTM-II Plus Advance et congelée par étapes selon les instructions du fabricant du tube³ jusqu'à l'analyse, si nécessaire.

- Une fois que l'*échantillon* « B » est décongelé et ouvert (selon les instructions du SIL 6.2.4.2.2), une partie aliquote de l'*échantillon* « B » doit être utilisée pour la procédure de confirmation de l'*échantillon* « B ». La fraction restante du sérum de l'*échantillon* « B » devrait être transférée dans un nouveau tube/flacon et doit être scellée devant le *sportif* ou le représentant du *sportif* ou un témoin indépendant désigné par le laboratoire à l'aide d'un système inviolable et être congelée² jusqu'à nouvelle analyse, si nécessaire.

• Pour les *échantillons* reçus en tant qu'*échantillons* de sérum après séparation:

a) *Échantillons* reçus comme fractions de sérum séparées congelées:

- Ces *échantillons* doivent rester congelés² jusqu'à l'analyse.

-
- Pour un stockage à court terme (jusqu'à trois mois) à environ -20°C.
 - Pour des périodes prolongées (plus de trois mois), congélation à environ -20°C et transfert à environ -70 à -80°C.

La décongélation de l'*échantillon* pour analyse ne doit pas être effectuée à l'eau chaude ni par un autre processus similaire susceptible de porter la température de l'*échantillon* au-dessus de la température ambiante. Une décongélation à 4°C pendant la nuit est recommandée.

³ Placer le tube dans une boîte isolante dédiée avant de le transférer dans un congélateur à -20°C. Afin de préserver l'intégrité du gel de séparation, permettre à la congélation de se faire pendant au moins 2 h avant de déplacer ou de transférer les tubes congelés. Le déplacement des tubes avant que le gel de séparation ne soit congelé et stable peut entraîner la contamination du sérum par du matériel cellulaire.

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

- Après décongélation, une partie aliquote de l'*échantillon* « A » doit être prise afin de servir pour la procédure d'analyse initiale. Cette partie aliquote de l'*échantillon* « A » peut être stockée à environ 4°C si la procédure d'analyse initiale est programmée pour avoir lieu dans les 24 h suivant la décongélation. Le reste de la fraction de sérum de l'*échantillon* « A » non utilisé pour la procédure d'analyse initiale peut être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* ou aliquoté dans de nouveaux flacons qui doivent être correctement étiquetés pour respecter la documentation liée à la chaîne de possession interne du laboratoire, et être stockés congelés² jusqu'à la procédure de confirmation de l'*échantillon* « A », si nécessaire.

- Une fois que l'*échantillon* « B » est décongelé et ouvert (selon les instructions du SIL 6.2.4.2.2), une partie aliquote de l'*échantillon* « B » doit être utilisée pour la procédure de confirmation de l'*échantillon* « B ». Le reste de la fraction de sérum de l'*échantillon* « B » doit être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* et doit être scellé devant le *sportif* ou le représentant du *sportif* ou un témoin indépendant désigné par le laboratoire à l'aide d'un système inviolable et être congelé² jusqu'à nouvelle analyse, si nécessaire.

b) *Échantillons* reçus en tant que fractions de sérum séparées réfrigérées:

- Une partie aliquote de l'*échantillon* « A » doit être prise dès que possible après réception. Pour la procédure d'analyse initiale, des parties aliquotes de l'*échantillon* « A » peuvent être analysées immédiatement après l'aliquotage ou être stockées à environ 4°C pendant un maximum de 24 h avant l'analyse (dans un maximum de 4 jours suivant le prélèvement de l'*échantillon*). Si ce n'est pas possible, les parties aliquotes de l'*échantillon* « A » doivent être congelées² jusqu'à l'analyse.

- Le reste de l'*échantillon* « A » non utilisé pour la procédure d'analyse initiale doit être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* ou être aliquoté dans de nouveaux flacons qui doivent être correctement étiquetés pour respecter la documentation liée à la chaîne de possession interne du laboratoire, et être stockés congelés² jusqu'à la procédure de confirmation de l'*échantillon* « A », si nécessaire.

- Les *échantillons* « B » doivent être congelés² dès que possible après la réception et être décongelés avant l'analyse. Une fois que l'*échantillon* « B » est décongelé et ouvert (selon les instructions du SIL 6.2.4.2.2), une partie aliquote doit être utilisée pour la procédure de confirmation du « B ». Le reste du sérum de l'*échantillon* « B » doit être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* et doit être rescellé devant le *sportif* ou le représentant du *sportif* ou un témoin indépendant désigné par le laboratoire à l'aide d'un système inviolable et être stocké congelé² jusqu'à nouvelle analyse, si nécessaire.

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

2.2 Procédure d'analyse

Pour l'exécution de la procédure d'analyse de l'*échantillon* ou des *échantillons*, ou l'exécution de la procédure de la méthode de dosage, prière de se reporter à la procédure d'analyse décrite dans le mode d'emploi fourni avec les kits d'analyse ainsi qu'aux procédures d'utilisation normalisées du laboratoire (SOP).

En cas de contradiction entre le mode d'emploi fourni avec les kits et les SOP du laboratoire, ou entre le mode d'emploi et le présent Document technique, ce dernier prime dans tous les cas.

Nota bene: Afin de garantir la qualité de la performance de la méthode, il convient de faire attention au temps d'acquisition du signal de l'*échantillon* sur le luminomètre, qui doit être fixé à 1 s.

2.2.1 Stratégie d'analyse

- Soit le kit '1' soit le kit '2' peut être utilisé pour la procédure d'analyse initiale à l'aide d'au moins deux parties aliquotes provenant de l'*échantillon* « A » original.
- Dans le cas d'un résultat d'analyse anormal présumé initial, le kit '1' et le kit '2' doivent tous les deux être utilisés pour la procédure de confirmation de l'*échantillon* « A » à l'aide de trois nouvelles parties aliquotes provenant de l'*échantillon* « A » original.
- Pour la procédure de confirmation de l'*échantillon* « B », le kit '1' et le kit '2' doivent tous les deux être utilisés sur trois parties aliquotes provenant de l'*échantillon* « B » original. Le laboratoire doit suivre les exigences du SIL 6.2.4.2.2.1 pour l'exécution de l'analyse de confirmation de l'*échantillon* « B » [6].
- Pour les procédures de confirmation des *échantillons* « A » et du B », trois parties aliquotes de l'*échantillon* doivent être mesurées, sauf dans les cas où le volume de l'*échantillon* est limité. Dans ce cas le nombre maximum de parties aliquotes pouvant être préparées devrait être analysé (conformément au SIL 6.2.4.2.1.6 et 6.2.4.2.2.5) [6].
- Conformément aux dispositions du SIL 6.2.4.2.1.4 et 6.2.4.2.2.8 [6], le laboratoire doit avoir une politique pour définir les circonstances dans lesquelles la procédure de confirmation d'un *échantillon* « A » ou « B » peut être répétée (par exemple, valeurs d'ETR intra-analyse > 15%).
- Il est recommandé aux laboratoires d'utiliser des *échantillons* de contrôle de qualité interne (CQI) stables et bien caractérisés, placés sous le contrôle direct du laboratoire et non soumis à des variations en fonction du lot des kits, pour réaliser des analyses sous différentes conditions d'analyse (lots de kits différents, analystes différents, etc.) et/ou pour démontrer la spécificité des méthodes.

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

3.0 Rapport et interprétation des résultats

3.1 Interprétation des résultats des analyses

Pour déterminer la conformité du résultat d'analyse, le laboratoire doit comparer le ratio recGH / pitGH (exprimé à deux chiffres après la virgule), obtenu à partir des déterminations multiples mesurées de la partie aliquote de l'échantillon et calculés en divisant la moyenne des résultats de la méthode « recombinante » (concentration de recGH en ng/mL, exprimée à 3 chiffres après la virgule) par la moyenne des résultats de la méthode « pituitaire » (pitGH en ng/mL, exprimée à 3 chiffres après la virgule), avec la limite de décision (LD) correspondante pour les hommes et pour les femmes établie pour le kit d'analyse utilisé [7]. Les valeurs de LD à utiliser sont les suivantes⁴:

Kit '1': hommes (**1,84**); femmes (**1,63**)

Kit '2': hommes (**1,91**); femmes (**1,59**)

- Pour les *échantillons* ayant des valeurs mesurées de concentrations de pitGH inférieures à la LQ de la méthode, telle que déterminée par le laboratoire, la valeur LQ^1 de la méthode pitGH correspondante (exprimée à 3 chiffres après la virgule) doit être utilisée pour calculer le ratio recGH / pitGH.

Dans de tels cas, le ratio recGH / pitGH pour l'*échantillon* doit être rapporté comme « supérieur à » (par ex. si la recGH est de 0,200 ng/mL alors que la pitGH est inférieure à la LQ de la méthode, et que la LQ du laboratoire pour la pitGH est de 0,050 ng/mL, le ratio doit être rapporté comme étant « supérieur à 4,00 »).

- Tous les *échantillons* présentant une valeur de **recGH inférieure à 0,150 ng/mL** doivent être considérés comme **négatifs**, quelles que soient les valeurs correspondantes du ratio recGH / pitGH.

3.1.1 Résultat d'analyse anormal présumé

Un résultat d'analyse anormal présumé pour l'*échantillon* « A » doit être rapporté pour la procédure d'analyse initiale si le ratio de la recGH à la pitGH dépasse la LD du kit utilisé (kit '1' ou kit '2').

⁴ Les valeurs de LD ont été décidées à partir de l'analyse d'*échantillons* de *sportifs* traités dans des conditions réelles de *contrôle du dopage* pour le prélèvement, le transport, le stockage et l'analyse de l'*échantillon* (à l'aide des kits de hGH certifiés ISO disponibles dans le commerce et des protocoles et instruments d'analyse standardisés). Les valeurs LD établies définissent une spécificité combinée d'analyse (entre les deux kits) d'au moins 99,99% [7].

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

3.1.2 *Résultat d'analyse anormal*

Un *résultat d'analyse anormal* doit être rapporté pour la procédure de confirmation si les résultats d'analyse (ratios recGH / pitGH) dépassent aussi bien les valeurs LD du kit '1' et du kit '2'.

3.1.3 *Résultat atypique*

Un *résultat atypique* doit être rapporté pour la procédure de confirmation si les résultats d'analyse (ratios recGH / pitGH) dépassent la valeur LD d'un seul des deux kits employés (kit '1' ou kit '2').

L'IM de la méthode a déjà été prise en compte et incorporée dans l'estimation statistique de la LD basée sur la population de référence. C'est pourquoi l'IM de la méthode ne doit pas être ajoutée pour le rapport d'un *résultat d'analyse anormal* ou d'un *résultat atypique* ⁵.

3.2 Rapport des résultats des analyses

En rapportant un *résultat d'analyse anormal* ou un *résultat atypique*, le rapport d'analyse du laboratoire doit inclure le ratio recGH / pitGH, exprimé à 2 chiffres après la virgule, les valeurs de concentration moyennes recGH et pitGH à partir des déterminations multiples (obtenues durant la procédure de confirmation), les valeurs de la LD applicable ainsi que l' u_c à des valeurs proches de la LD telle que déterminée par le laboratoire durant la validation de la méthode (exprimée en unités à 2 chiffres après la virgule).

En outre, la documentation du laboratoire doit inclure les valeurs de concentration moyennes de la recGH et de la pitGH à partir des déterminations multiples (obtenues durant la procédure de confirmation, exprimées à 3 chiffres après la virgule) et l'IM élargie ($U_{95\%}$) équivalent à l'intervalle de couverture de 95% ($k = 2$) pour la valeur analytique du ratio recGH /pitGH pour l'*échantillon* (exprimée en unités à 2 chiffres après la virgule).

Exemple de rapport d'analyse (par ex. pour l'*échantillon* d'un *sportif* de sexe masculin-:

L'analyse de l'*échantillon* à l'aide des immunodosages différentiels de l'hGH a produit les valeurs d'analyse suivantes pour les ratios de la méthode: 2,52 pour le kit '1' et 2,40 pour le kit '2', qui sont supérieures aux LD correspondantes de 1,84 et de 1,91, respectivement. L'incertitude type combinée

⁵ Selon le Document technique de l'AMA sur les limites de décision pour la quantification confirmatoire des substances à seuil (TDDL) [8], la règle de décision applicable aux méthodes de dosage pour lesquels la valeur de seuil a été établie sur la base de statistiques de la population de référence incorpore déjà une bande de garde qui reflète l'incertitude des mesures fournies par la méthode. C'est pourquoi la zone des valeurs analytiques considérées comme conformes (négatives) ou non (*résultat d'analyse anormal*) avec cette règle de décision serait définie par la valeur de seuil elle-même, qui constitue la LD.

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

(u_c) estimée par le laboratoire à des niveaux proches de la LD est de 0,22 pour le kit '1' et 0,19 pour le kit '2'. Cela constitue un *résultat d'analyse anormal* pour l'hGH.

4.0 Incertitude de mesure de la méthode

4.1 Incertitude type combinée (u_c)

- Les laboratoires doivent en général se reporter au TDDL [8] pour l'estimation de l'IM de la méthode.
- Les laboratoires doivent déterminer l' u_c de chaque méthode sur la base de leurs données de validation.

L' u_c est un paramètre dynamique qui peut être réduit au fur et à mesure qu'augmente l'expertise dans l'exécution des analyses. L'établissement d'une valeur stable de l' u_c reposerait sur de multiples mesures réalisées sur une longue période, lorsque certaines sources d'incertitude (telles que la variabilité du kit, les changements de l'environnement, la performance des instruments, des analystes différents, etc.) seraient prises en compte.

- ISO/IEC 17025 recommande que l' u_c soit estimée à l'aide d'une approche cohérente avec les principes décrits dans le Guide ISO/IEC pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) [9].

Pour les méthodes hGH dont les résultats sont exprimés en tant que ratio des valeurs de concentration recGH / pitGH, il est nécessaire de tenir compte des valeurs d' u_c obtenues pour les deux méthodes d'un kit d'analyse donné.

Deux approches descendantes pour le calcul du budget de l' u_c sont recommandées :

- A)** Le budget de l' u_c relative (%) inclura des éléments de la précision intermédiaire (s_w , exprimée comme *ETR*, %) ainsi que du biais (% d'écart par rapport aux valeurs attendues ou consensuelles), applicable à la détermination des concentrations de recGH et de pitGH avec chaque kit spécifique:

$$(1) \quad u_c = \sqrt{s_w^2 + u_{bias}^2}$$

- Pour le calcul de l' u_c , il est recommandé d'utiliser des *échantillons* de contrôle standard, préparés en ajoutant la pitGH et la recGH dans un sérum humain négatif (niveau d'hGH indétectables) pour aboutir à un ratio approximatif de recGH / pitGH = 1,50 – 2,00. Quatre dilutions différentes, contenant des valeurs de recGH ~ 12,5, 2,5, 0,5 et 0,1 ng/mL, devraient être mesurées en triplicata pendant 5 à 6 jours par au moins 2 analystes différents. Cela garantirait que l' u_c

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

soit calculée sur la plage physiologique des concentrations d'hGH trouvées dans des *échantillons* provenant d'individus en bonne santé.

- La valeur d' u_c applicable aux ratios découlera de l' u_c des deux méthodes conformément à la formule (2).

$$(2) \quad u_{c\,ratio} = \sqrt{(u_{c\,rec})^2 + (u_{c\,pit})^2}$$

B) À titre alternatif, les laboratoires peuvent calculer l' u_c sur la base de mesures multiples à long terme ⁶ des *échantillons* de contrôle du kit CQ1 et CQ2.

- Le budget de l' u_c relative (%) inclura des éléments de la précision intermédiaire (s_w , exprimée en tant qu' ETR , %) ainsi que le biais applicable à la détermination des concentrations de recGH et de pitGH pour le CQ1 et le CQ2 avec chaque kit particulier [formule (1)].
- Le s_w devrait être déterminé sur la base d'au moins 30 mesures sur une période d'au moins 6 mois.
- Le biais devrait être établi par comparaison entre la moyenne à long terme des valeurs de concentration de la recGH et de la pitGH obtenues pour le CQ1 ainsi que pour le CQ2 avec un kit spécifique avec la valeur d'analyse reconnue déterminée par le fabricant du kit (propre à chaque lot). Le biais est exprimé en % d'écart par rapport à la valeur du fabricant (ETR_{bias}).
- L' u_c (%) du ratio recGH/pitGH pour chaque CQ peut être calculée en combinant l' u_c de la recGH et de la pitGH à l'aide de l'équation (2).
- L' u_c (%) du kit sera calculée comme la moyenne de l' u_c (CQ1) et de l' u_c (CQ2), appliquée au ratio.

4.2 Niveaux maximum d' u_c

Conformément au TDDL [8], les laboratoires doivent avoir des valeurs d' u_c , applicables aux ratios à des valeurs proches de la LD pour chaque kit d'analyse qui ne soient pas plus élevées que les valeurs maximales de l' u_{c_Max} obtenues à partir des cycles d'EQAS pertinents.

⁶ Toutes les mesures des échantillons CQ doivent être prises en considération sauf si le critère d'acceptation intra-analyse ($s_r \leq 15\%$) n'est pas satisfait, auquel cas l'analyse doit être répétée (comme pour les *échantillons de contrôle du dopage*).

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

L' U_{c_Max} cible représente l'exigence maximale pouvant être atteinte par un laboratoire pour l'incertitude de mesure lorsqu'il rapporte un résultat pour la détermination d'une substance à seuil.

4.3 Incertitude élargie $U_{95\%}$

Pour la détermination de l'incertitude élargie $U_{95\%}$, un facteur de couverture $k=2$ doit être appliqué pour u_c à un niveau de confiance de 95%.

$$(4) \quad U_{95\%} = k \cdot u_c, \text{ où } k=2$$

4.4 Vérification de l'incertitude de mesure

Les laboratoires doivent toujours se reporter au TDDL [8] pour une vérification des estimations d' u_c de la méthode.

5.0 Références

1. Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ. Test method: GH. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* **14**: 99-109 (2000).
2. Wu Z, Bidlingmaier M, Dall R, Strasburger CJ. Detection of doping with human growth hormone. *Lancet* **353**: 895 (1999).
3. Wallace JD *et al.* Changes in non-22-kilodalton (kDa) isoforms of growth hormone (GH) after administration of 22-kDa recombinant human GH in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1731–1737 (2001).
4. Bidlingmaier M *et al.* High-Sensitivity Chemiluminescence Immunoassays for Detection of Growth Hormone Doping in Sports. *Clin Chem* **55**: 3 (2009).
5. Programme mondial antidopage. Lignes directrices pour le prélèvement des échantillons sanguins.
[https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A190](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A190)
6. Code mondial antidopage, *Standard international pour les laboratoires*.
<https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isj>
7. Hanley JA, Saarela O, Stephens DA, Thalabard JC. hGH isoforms differential immunoassays applied to blood samples from athletes: decision limits for anti-doping testing. *Growth Horm IGF Res* **24**: 205, 2014.
8. Document technique de l'AMA TDDL : Limites de décision pour la quantification confirmatoire des substances à seuil.
[https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A30](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A30)

Document technique de l'AMA – TD2015GH

Document n°:	TD2015GH	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

9. ISO/IEC Guide 98-3: 2008. Evaluation des données de mesure – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) (2008).

Remerciements

Le groupe d'experts des laboratoires de l'AMA tient à remercier les experts du groupe de travail AMA/USADA sur l'hGH pour leurs contributions à la rédaction du présent Document technique.