Institut de Recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

PhareSST

Rapports de recherche scientifique | Rapports

2007

Concordance interlaboratoire des tests de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT)

Pauline Brousseau
Institut national de la recherche scientifique, Biophage Inc.

Michel Rossignol
Direction de Santé Publique de Montréal, McGill University

Chantal Dion
IRSST

Nadine Sicard
Direction de Santé Publique de Montréal, McGill University

Séverine Audusseau
Meakins-Christie Laboratories, McGill University

See next page for additional authors

Suivez ce contenu et d'autres travaux à l'adresse suivante: https://pharesst.irsst.qc.ca/rapports-scientifique

Citation recommandée

Brousseau, P., Rossignol, M., Dion, C., Sicard, N., Audusseau, S. et Mazer, B. (2007). *Concordance interlaboratoire des tests de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT)* (Rapport n° R-538). IRSST.

Ce document vous est proposé en libre accès et gratuitement par PhareSST. Il a été accepté pour inclusion dans Rapports de recherche scientifique par un administrateur autorisé de PhareSST. Pour plus d'informations, veuillez contacter pharesst@irsst.qc.ca.

Auteurs

Pauline Brousseau, Michel Rossignol, Chantal Dion, Nadine Sicard, Séverine Audusseau, Bruce Mazer, Nathalie Gravel, May Kafilmout, Stéphane Fortier, Mireille Varin, and Thierry Petitjean-Roget

This rapports de recherche scientifique is available at PhareSST: https://pharesst.irsst.qc.ca/rapports-scientifique/486

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT **R-538**

Concordance interlaboratoire des tests de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT)

Pauline Brousseau
Michel Rossignol
Chantal Dion
Nadine Sicard
Séverine Audusseau
Bruce Mazer

irsst

Solidement implanté au Québec depuis l980,
l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé
et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme
de recherche scientifique reconnu internationalement
pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES *travaillent* pour vous !

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention
des accidents du travail et des maladies
professionnelles ainsi qu'à la réadaptation
des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise
nécessaires à l'action du réseau public
de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle
de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent
en nombre égal des représentants des employeurs
et des travailleurs, l'IRSST est financé par la
Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez
une information complète et à jour.
De plus, toutes les publications éditées
par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement.
www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée
ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement
au magazine Prévention au travail,
publié conjointement par l'Institut et la CSST.
Abonnement : 1-877-221-7046

Dépôt légal
Bibliothèque et Archives nationales
2007
ISBN : 978-2-89631-208-5 (version imprimée)
ISBN : 978-2-89631-209-2 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
novembre 2007

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT **R-538**

Concordance interlaboratoire des tests de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT)

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Pauline Brousseau[1, 2], Michel Rossignol[3], Chantal Dion[4], Nadine Sicard[3], Séverine Audusseau[5] et Bruce Mazer[5]

[1]Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier
[2]Biophage Inc. (au moment de l'étude)
[3]Direction de Santé Publique de Montréal et Département d'épidémiologie, Université McGill
[4]Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail
[5]Meakins-Christie Laboratories, Université McGill

Avec la collaboration de :

Nathalie Gravel[3], May Kafilmout[5], Stéphane Fortier[2], Mireille Varin[2] et Thierry Petitjean-Roget[4]

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca

Cette publication est disponible en version PDF sur le site Web de l'IRSST.

Cette étude a été financée par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSST

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

SOMMAIRE

L'exposition au béryllium peut mener à une réaction immunitaire de type cellulaire, la sensibilisation au béryllium (BeS) qui précèderait le développement de la bérylliose chronique dans les poumons. Cette sensibilisation peut être mise en évidence par un test de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT), utilisé depuis une vingtaine d'années comme outil de dépistage précoce des effets du béryllium sur la santé.

Malgré que le test soit considéré comme étant efficace et performant pour identifier les individus à risque de développer une bérylliose, une controverse persiste autour du BeLPT. En effet, de nombreuses variables analytiques reliées aux standards du béryllium, aux conditions de culture, aux modes de calcul ou aux analyses des données, si appliquées différemment par les laboratoires, peuvent produire des résultats discordants.

La présente étude visait d'abord une harmonisation de la méthode entre les deux laboratoires participants, afin de mesurer la concordance diagnostique interlaboratoire, d'identifier les sources de variation et de documenter le suivi longitudinal pour des tests refaits chez un même travailleur dans un même laboratoire.

Des échantillons de sang en duplicata ont été prélevés chez 475 travailleurs d'entreprises où l'exposition au béryllium était connue. Les tests statistiques ANOVA ont été réalisés sur les résultats des deux laboratoires participants afin d'évaluer les interactions entre les différences interlaboratoires et les effets comme le tabagisme, l'effet saisonnier, le sexe et l'éloignement géographique de Montréal où sont situés les deux laboratoires.

L'analyse simultanée des échantillons de sang, à l'aide du BeLPT réalisé par les laboratoires A et B, a permis de déterminer une précision interlaboratoire de 87,7%, lorsque les méthodologies sont harmonisées et que les résultats sont analysés avec la méthode de calcul de l'indice de stimulation « SI ». La concordance interlaboratoire diminue à 63,5% lorsque la méthode « Least Absolute Values » (LAV) est utilisée pour déterminer le diagnostic. Ces résultats démontrent donc que la méthode SI rencontre les exigences de validation d'une méthode analytique, c'est-à-dire que la différence entre les résultats d'une mesure répétée est inférieure à 15%, avec une précision de plus de 85%. Les concordances intralaboratoires pour la comparaison entre les deux méthodes de calcul sont supérieures à 80% pour les deux laboratoires, et rencontrent ainsi les exigences de validation d'une méthode bioanalytique, c'est-à-dire que la différence entre les résultats d'une mesure répétée est inférieure à 25-30% (précision > 80%). Lorsque suivis longitudinalement dans un même laboratoire, les diagnostics ont été inchangés dans 76,7% des cas et rencontrent donc les exigences de validation d'une méthode bioanalytique.

Pour maintenir le niveau de concordance interlaboratoire, les auteurs recommandent l'implantation d'un programme d'assurance de la qualité afin de comparer les résultats entre les différents laboratoires; l'établissement d'une séquence de vérification d'un certain pourcentage (5 ou 10%) de tests par le même laboratoire ou un second laboratoire; l'analyse d'échantillons en duplicata (normaux et anormaux) selon une formule de réception à l'aveugle des échantillons; et, un audit des laboratoires (sur une base annuelle ou lors de toute modification au sein du laboratoire) par un organisme reconnu.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE i

TABLE DES MATIÈRES iii

Liste des TABLEAUX iv

1. INTRODUCTION 1

2. Objectif des travaux 3

3. Description des travaux 5
   - 3.1 L'échantillonnage 5
   - 3.2 Conformité de la méthode 5
   - 3.3 Harmonisation 6
   - 3.4 Analyses statistiques 6
     - 3.4.1 Concordance diagnostique interlaboratoire 6
     - 3.4.2 Concordance diagnostique intralaboratoire 7
     - 3.4.3 Mesure et comparaison de la variation interlaboratoire 8
     - 3.4.4 Reproductibilité du suivi longitudinal 9

4. Résultats et Discussion 11
   - 4.1 Exclusions 11
   - 4.2 Concordance diagnostique interlaboratoire 11
     - 4.2.1 Méthode LAV 11
     - 4.2.2 Méthode SI 12
     - 4.2.3 Méthodes LAV et SI 12
   - 4.3 Concordance diagnostique intralaboratoire 13
     - 4.3.1 Laboratoire A 13
     - 4.3.2 Laboratoire B 13
   - 4.4 Mesure et comparaison de la variation interlaboratoire 14
     - 4.4.1 Variable laboratoire 14
     - 4.4.2 Variable saison 16
     - 4.4.3 Variables jour, éloignement, tabagisme et sexe 16
   - 4.5 Suivi longitudinal 17

5. Synthèse des résultats 19

6. Conclusion 21

7. Recommandations 23

8. Références 25

ANNEXE 1 27

ANNEXE 2 29

ANNEXE 3 31

ANNEXE 4 33

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre de lectures par individu (échantillon) testé dans chacun des deux laboratoires 8

Tableau 2 : Comparaison des résultats entre les deux laboratoires selon la lecture « LAV » 11

Tableau 3 : Comparaison des résultats entre les deux laboratoires selon la lecture « SI » 12

Tableau 4 : Comparaison des deux laboratoires selon leur méthode de lecture spécifique 12

Tableau 5 : Comparaison des deux méthodes de lecture Laboratoire A 13

Tableau 6 : Comparaison des deux méthodes de lecture Laboratoire B 14

Tableau 7 : ANOVA pour la comparaison interlaboratoire 15

Tableau 8 : ANOVA pour l'effet saison 16

Tableau 9 : Suivi longitudinal 17

Tableau 10 : Concordances de diagnostic 19

Tableau A. 1 : Sources de variation sur les témoins négatifs 33

Tableau A. 2 : Sources de variation sur les témoins positifs standardisés pour le témoin négatif 33

Tableau A. 3 : Sources de variation sur les milieux enrichis de 1 µM Béryllium 34

Tableau A. 4 : Sources de variation sur les milieux enrichis de 10 µM Béryllium 34

Tableau A. 5 : Sources de variation sur les milieux enrichis de 100 µM Béryllium 34

Tableau A. 6 : Moyennes (É-T) des témoins négatifs 35

Tableau A. 7 : Moyennes (É-T) des témoins positifs standardisés pour le témoin négatif 35

Tableau A. 8 : Moyennes (É-T) des milieux enrichis de 1 µM béryllium 36

Tableau A. 9 : Moyennes (É-T) des milieux enrichis de 10 µM béryllium 36

Tableau A. 10 : Moyennes (É-T) des milieux enrichis de 100 µM béryllium 36

1. INTRODUCTION

L'exposition au béryllium peut occasionner une réaction immunitaire de type cellulaire, la sensibilisation au béryllium (BeS) qui précèderait le développement de la bérylliose chronique dans les poumons[1]. Cette sensibilisation peut être mise en évidence par un test de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT) qui est utilisé comme outil de dépistage précoce des effets du béryllium sur la santé[2].

Le test de BeLPT est un test standard de stimulation secondaire de lymphocytes *in vitro,* utilisé largement par les immunologistes avec d'autres antigènes (toxine tétanique et le virus de l'influenza) depuis des décennies. Le principe de ce test est simple. Un individu qui est exposé à un antigène (en occurrence le béryllium), pourra développer une réponse immunitaire spécifique face à celui-ci. Une des caractéristiques principales de cette réponse fait en sorte que le système immunitaire munit l'organisme de cellules dites mémoire afin de protéger l'organisme contre toute nouvelle agression par le même antigène. Ces cellules auront le même rôle face au béryllium que celles présentes pour nous protéger contre l'influenza suite à une vaccination, c'est-à-dire de reconnaître en tout temps le béryllium comme un agresseur.

Dans le cas d'une vaccination contre l'influenza, ces cellules mémoire sont bénéfiques et elles nous permettent de nous protéger contre l'infection. Dans le cas du béryllium, ces cellules mémoire sont plutôt dévastatrices. En effet, ces dernières sont localisées principalement au niveau du poumon et serviront éventuellement de base à la formation des granulomes lors de la conversion de la sensibilisation vers la bérylliose chronique, une évolution de la maladie estimée à environ 6 à 7% par année[3]. Certaines cellules mémoire se retrouvent aussi dans la circulation systémique et c'est de cette façon que nous pouvons identifier les travailleurs sensibilisés.

Malgré le fait que le test de BeLPT soit utilisé depuis de nombreuses années et qu'il soit considéré par de nombreux utilisateurs comme étant efficace et performant pour identifier les individus à haut risque de développer une bérylliose[4-10], une controverse persiste toujours autour son utilisation[11, 12].

Même si les principes analytiques d'un tel test immunologique sont utilisés couramment, peu de laboratoires à travers le monde ont actuellement implanté le BeLPT. La méthodologie développée peut varier d'un laboratoire à l'autre en fonction de variables analytiques telles que : composés standards du béryllium, concentrations de béryllium, conditions de culture et de milieux, modes de calcul et analyses des données. Des méthodologies plus ou moins différentes dans les laboratoires peuvent donner des seuils variables pour définir un test anormal ou un test normal, ce qui peut occasionner des résultats discordants.

Stange et al[9] ont évalué la concordance entre trois laboratoires pour des échantillons prélevés en duplicata chez des travailleurs exposés au béryllium. Ils ont trouvé une concordance moyenne de 93% pour tous les résultats de BeLPT confondus mais une concordance moyenne de seulement 30% pour les tests positifs (anormaux).

L'étude de Deubner et al[13] sur la variabilité, la valeur prédictive et les utilisations de BeLPT, réalisée dans trois laboratoires afin d'évaluer la concordance de résultats de deux tests simultanés sur des échantillons en duplicata, a montré des résultats différents d'un laboratoire à l'autre. Le

niveau de concordance entre un premier et un second test réalisés dans un même laboratoire était de correct à modéré pour les trois laboratoires : 31 % des résultats anormaux une première fois sont devenus normaux dans un second temps, et 6 % des premiers tests normaux sont devenus anormaux. L'analyse de la concordance interlaboratoire a révélé une large variation des résultats, allant de bon à pauvre. Ce qui pourrait s'expliquer par une combinaison de facteurs intrinsèques chez les patients ainsi que des différences dans les pratiques des laboratoires. Par exemple, certains laboratoires rapportent un seuil d'anormalité à 3,0 tandis que pour d'autres, la limite supérieure d'indice de stimulation varie. Il y a aussi des différences importantes dans l'interprétation des résultats « borderline ». Malgré le fait que cette étude ait été réalisée avec une cohorte importante (n = 5483), certaines lacunes dans le protocole méritent d'être soulignées. En particulier, le fait de ne pas avoir utilisé des méthodes harmonisées entre les trois laboratoires et de travailler avec des duplicata au lieu de triplicata puisque le but de l'étude était de comparer les résultats de trois laboratoires.

La disponibilité d'un tel test sanguin a permis de dépister les effets à la santé du béryllium dans les milieux de travail. L'utilisation du BeLPT permet de distinguer la bérylliose chronique de la sarcoïdose qui est également une maladie pulmonaire granulomateuse[14, 15]. Même si le BeLPT a amélioré le diagnostic des effets à la santé du béryllium et l'évaluation des risques d'exposition, il peut produire des résultats problématiques comme pour la plupart des tests diagnostiques cliniques[16]. En pratique, une telle variabilité occasionne des problèmes majeurs autant pour les personnes responsables de la surveillance médicale que pour les travailleurs. Il demeure toutefois l'outil de dépistage de la sensibilisation le plus spécifique et le plus sensible disponible actuellement.

2. OBJECTIF DES TRAVAUX

L'objectif général de cette activité de recherche visait l'harmonisation interlaboratoire des méthodes et la conformité à une méthode de référence. Les objectifs plus spécifiques permettaient de :

1) Mesurer la concordance diagnostique interlaboratoire (interprétation des résultats) ;
2) Mesurer la variation interlaboratoire (identification des sources de variation) ;
3) Documenter le suivi longitudinal pour des tests refaits chez un même travailleur dans un même laboratoire.

3. DESCRIPTION DES TRAVAUX

3.1 L'échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés majoritairement chez des travailleurs d'entreprises dans lesquelles l'exposition au béryllium a été reconnue suite à la démarche du réseau de la santé dans les secteurs prioritaires à risques. Les secteurs qui ont été visités sont les fonderies, l'aéronautique, l'environnement et en cours au moment de la présente étude, les ateliers d'usinage. Le guide d'utilisation du BeLPT chez les travailleurs exposés au béryllium, préparé par le Comité médical provincial dans le cadre du programme de santé spécifique à l'établissement (PSSE), précise les modalités d'utilisation, ainsi qu'un algorithme décisionnel guidant l'utilisation du test, afin d'identifier les travailleurs qui ont développé une sensibilisation suite à une exposition au béryllium. Cet algorithme de suivi précise que pour la période de validation du test de BeLPT, les 500 premiers échantillons devaient être analysés en duplicata[17].

Les calculs de la taille de l'échantillon ont été réalisés conformément aux tables de Donner et Eliasziw[18] qui permettent d'estimer le nombre d'unités nécessaires pour observer une valeur de Kappa. Ainsi, pour obtenir un accord de 0,8 (niveau d'accord excellent), avec quatre répétitions pour chacune des concentrations de béryllium, une erreur alpha de 0,05 et une puissance de 90%, 35 échantillons interprétables sont requis pour chaque niveau de contraste : le laboratoire, la méthode de diagnostic. À cela s'ajoutent les effets d'interaction : le tabagisme, l'effet saisonnier, le sexe et l'éloignement géographique de Montréal où sont situés les deux laboratoires, ; ce qui nécessite un total de 420 échantillons interprétables en duplicata. En tenant compte d'un taux d'échantillons non interprétables de 10%, il fallait donc 462 échantillons en duplicata au total pour pouvoir évaluer des interactions entre les différences interlaboratoires et les effets énumérés ci-haut. Cet objectif a été atteint puisque 475 échantillons interprétables ont été reçus simultanément dans les deux laboratoires. Les tests statistiques ANOVA ont été réalisés comme prévu pour vérifier la variabilité interlaboratoire des données brutes.

Pour chaque travailleur, 6 tubes de 10 mL de sang avec héparine comme anticoagulant ont été prélevés. Trois de ces tubes étaient destinés au laboratoire A et les trois autres au laboratoire B. Une instruction pour les prélèvements de même qu'un formulaire d'analyse ont été préparés et distribués aux responsables des prélèvements. Dans un souci de confidentialité, tous les échantillons étaient codifiés de sorte que les chercheurs ne pouvaient retracer l'identité des travailleurs.

3.2 Conformité de la méthode

Les principes méthodologiques ont été appliqués tels que décrits dans les méthodes de référence du Department of Energy (DOE)[19] et du National Jewish Medical and Research Center (NJC) à Denver[20]. Conformément à ces deux protocoles, les cellules mononucléées sont purifiées avec l'aide d'un gradient de densité. Après trois lavages suivis de centrifugation, le nombre de cellules est évalué en utilisant un compteur automatique de cellules. La concentration est ajustée à 2.5 x 10^6 cellules/ml. Les cellules sont ensuite mises en plateau en présence de phytohémagglutinine (PHA) et de *Candida albicans* qui représentent les témoins positifs des jours 4 et 6 respectivement. Pour chaque temps d'incubation, les cellules sont aussi incubées en présence de

sulfate de béryllium à 10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M. Des puits sont préparés avec le milieu de culture seul, ces puits servent de témoin négatif. Les cellules sont ainsi incubées dans une atmosphère humide à 37° ± 0,5° C avec 5% de CO_2. Un plateau est incubé pendant 4 jours et le second pendant 6 jours. Dix-huit heures avant la fin de chacune des incubations, 1µCi de ^{3}H-thymidine est ajouté dans chaque puits. L'incubation se poursuit et à la fin, les plateaux sont congelés à -20°C. Les cellules sont par la suite récoltées sur un filtre et lysées pour ne conserver que l'ADN sur le filtre. L'incorporation de ^{3}H-thymidine suite à la division cellulaire est analysée par scintillation. Les résultats sont obtenus en coups par minute (CPM). Les différents groupes sont expliqués en détail dans la section 3.4 (Analyses statistiques).

3.3 Harmonisation

Dans ce projet de recherche, les responsables connaissant la variabilité inhérente à un tel test fonctionnel, il était d'abord impératif d'harmoniser la méthodologie afin d'éviter tout artéfact. L'annexe 1 résume l'ensemble des éléments analytiques. La principale différence observée entre les deux laboratoire consistait dans la méthode de calcul. En effet, la méthode du DOE qui utilise la formule « Least Absolute Values » (LAV) était utilisée par le laboratoire B, tandis que celle du NJC, qui utilise l'indice de stimulation (SI) sans aucune transformation, était utilisée par le laboratoire A. Brièvement, pour le LAV il y a d'abord une transformation logarithmique népérienne des CPM. Puis la médiane, la déviation standard, le coefficient de variation de même que l'erreur-type sont calculés. Un indice de stimulation est calculé pour chaque groupe avec sa médiane respective et celle du témoin négatif. Cet indice de stimulation subit une transformation anti-logarithmique népérienne et est standardisé en la divisant par l'erreur type. La méthode SI est beaucoup plus simple. Pour chaque groupe il suffit de calculer la moyenne, la déviation standard et le coefficient de variation. L'indice de stimulation est obtenu en divisant la moyenne des CPM de chaque groupe par celle obtenue avec le groupe témoin négatif. Pour les deux méthodes, un coefficient de variation (CV) inférieur ou égal à 35% a été retenu par les laboratoires pour tenir compte de la fiabilité du résultat. Tous les échantillons ont été analysés selon les deux méthodes pour chacun des laboratoires.

3.4 Analyses statistiques

3.4.1 Concordance diagnostique interlaboratoire

Les diagnostics sont exprimés selon quatre catégories :

- Anormal (A)
- Incertain (B)
- Normal (N)
- Ininterprétable (I)

Pour la concordance interlaboratoire, 3 tableaux 4x4 ont été construits.

1. concordance entre le laboratoire A et le laboratoire B en utilisant la méthode LAV
2. concordance entre le laboratoire A et le laboratoire B en utilisant la méthode SI
3. concordance lors de l'utilisation de la méthode SI par le laboratoire A et de la méthode LAV par le laboratoire B (ce qui représentait la situation au début de l'étude)

La concordance (exprimée en pourcentage) entre les deux laboratoires se calcule comme la somme des échantillons qui ont reçu un diagnostic identique (A-A, B-B, N-N, I-I) pour chaque laboratoire divisé par le nombre d'échantillons reçus et analysés en duplicata par les deux laboratoires. Le pourcentage de *discordance relative* est obtenu par la somme des quatre cellules discordantes pour lesquelles un des laboratoires a un diagnostic « Incertain » (A-B, B-A, N-B, B-N) divisé par le nombre d'échantillons reçus et analysés en duplicata par les deux laboratoires, alors que le pourcentage de **discordance absolue** est obtenu par la somme des deux cellules où un laboratoire a un diagnostic « Normal » et l'autre « Anormal » (N-A, A-N), divisée par le nombre d'échantillons reçus et analysés en duplicata par les deux laboratoires.

Des statistiques descriptives de la prévalence d'un test anormal par laboratoire et par méthode de lecture accompagnent le pourcentage de concordance. Dans le protocole initial, on prévoyait utiliser les statistiques Kappa pour exprimer le désaccord et tester statistiquement si ce désaccord était supérieur à celui attendu par le hasard. Cette méthode a été abandonnée en cours de route parce qu'insuffisamment sensible pour interpréter les discordances observées dans cette étude, les statistiques obtenues étant en deçà des limites inférieures d'interprétabilité suggérées dans Fleiss (1981)[21]. Le test de McNemar permettant de comparer deux proportions sur des échantillons appariés a été utilisé pour interpréter les **discordants absolus.**

Il n'existe pas de méthode qui permette d'effectuer la validation d'un test fonctionnel comme le BeLPT. Les seuls guides disponibles sont élaborés de façon à encadrer la validation de méthodes analytiques (chimie analytique) et bioanalytiques (ELISA). Le paramètre « précision » a été utilisé pour faire l'analyse de la concordance. La précision d'une mesure, définie comme la différence entre les résultats d'une mesure répétée, ne doit pas dépasser 15% pour une méthode analytique[22] et 25% à 30% pour une méthode bioanalytique[23-24]. L'analyse de la précision a été suivie de tests ANOVA qui ont permis d'interpréter les différences interlaboratoires.

3.4.2 Concordance diagnostique intralaboratoire

Les diagnostics selon les deux méthodes de calcul pour chacun des laboratoires sont également exprimés selon les catégories :

- Anormal (A)
- Incertain (B)
- Normal (N)
- Ininterprétable (I)

Pour la concordance intralaboratoire, 2 tableaux 4x4 ont été construits pour chaque méthode de calcul (LAV et SI) respectivement et en fonction des laboratoires A et B. La concordance intralaboratoire (exprimée en pourcentage) se calcule comme la somme des échantillons qui ont reçu un diagnostic identique (A-A, B-B, N-N, I-I) pour chaque méthode, divisée par le nombre d'échantillons reçus. Le pourcentage de *discordance relative* est obtenu par la somme des quatre cellules discordantes pour lesquelles une méthode de calcul donne un diagnostic « Incertain » (A-B, B-A, N-B, B-N), divisée par le nombre d'échantillons reçus, alors que le pourcentage de **discordance absolue** est obtenu par la somme des deux cellules où la méthode de calcul donne un diagnostic « Normal » et un autre « Anormal » (N-A, A-N), divisée par le nombre d'échantillons reçus.

3.4.3 Mesure et comparaison de la variation interlaboratoire

Il existe 3 sources de variations (facteurs) pour le test de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium : le milieu de culture qui a 6 niveaux (un témoin négatif, deux témoins positifs et trois concentrations de béryllium), la durée de l'incubation qui a deux niveaux (4 et 6 jours) et la variation d'échantillonnage (quatre répétitions sauf pour le témoin négatif, douze répétitions). Le tableau 1 présente, pour chaque individu, huit ensembles de quatre lectures et deux de douze ce qui fait dix ensembles au total. Chaque lecture correspond à un décompte isotopique en CPM équivalant à la division cellulaire et est traitée comme une variable continue

Tableau 1 : Nombre de lectures par individu (échantillon) testé dans chacun des deux laboratoires

Milieu	Témoin négatif	Témoin positif (PHA)	Témoin positif (*Candida albicans*)	Concentrations de sulfate de béryllium		
Durée d'incubation				**10^{-6} M**	**10^{-5} M**	**10^{-4} M**
4 jours	12	4	--	4	4	4
6 jours	12	--	4	4	4	4

À ces trois sources de variation (facteurs), il faut en ajouter une qui correspond à notre objectif principal c'est-à-dire le facteur laboratoire qui a deux niveaux (A et B). L'analyse vise à estimer la variation due au facteur laboratoire après avoir tenu compte des trois autres facteurs. La variation entre les deux laboratoires a été comparée. L'hypothèse est qu'il n'existe pas globalement de variation inter-laboratoire statistiquement significative. Cette hypothèse repose sur le fait que les méthodes sont standardisées entre les deux laboratoires. Le seuil de signification statistique a été fixé à 0,05. Si une différence de variation de lecture est trouvée entre les deux laboratoires, des tests statistiques ont été réalisés pour comparer les variations à l'intérieur des trois facteurs afin d'identifier la source de la différence.

L'analyse de la variation a pris en compte la variable des travailleurs participants qu'est le statut tabagique (23,8% étaient des fumeurs actifs, 62,5% étaient non ou anciens fumeurs et 13,7% avaient un statut inconnu (données manquantes)), la variable à deux niveaux pour l'effet saisonnier (57,4% des échantillons ont été reçus entre mai-septembre (saison chaude) et 42,7%

entre octobre-avril (saison froide)), le sexe (tous les sujets, à l'exception de 20, étaient des hommes) et une variable à deux niveaux pour l'éloignement du lieu du prélèvement sanguin (Montréal, hors de Montréal : 21,4% à plus de 100 km de Montréal (Mauricie-Bois-Francs, Bas-Saint-Laurent et Abitibi) et 78,6% à l'intérieur de la région de Montréal-Métropolitain).

La méthode d'analyse pour estimer et partitionner la variance selon les facteurs de classification (internes et externes aux laboratoires) est une ANOVA pour mesures répétées. La figure 1 montre le schéma de montage de la base de données.

Figure 1 : Schéma de montage de la base de données

Sujet	Labo	Jour	Lieu	Mois	Tabac	Témoin Négatif	PHA	*Candida albicans*	Be 1	Béryllium Be 10	Be 100
						$T_1..T_{12}$	P1..P4	$C_1..C_4$	$BeA_1..BeA_4$	$BeB_1..BeB_4$	$BeC_1..BeC_4$
1	B	4	Mtl	04	O	717..679	345..654	387..857	771..732	762..529	656..1418
1	B	6	Mtl	04	O	1222..549	.	.	.	.	.
1	A	4	Mtl	04	O	1645..1476	.	.	.	.	.
1	A	6	Mtl	04	O	954..500	.	.	.	.	.
2	B	4	HM	01	N	834..542.	.	.	.	.	
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

où : Sujet : numéro unique de l'échantillon.
Labo : A et B.
Jour : durée de l'incubation, 4 ou 6 jours.
Lieu : du prélèvement sanguin : Montréal (Mtl) ou hors de Montréal (HM)
Mois : de la réception de l'échantillon (01 à 12).

Dans un premier temps, on procède à l'estimation de la variation dans les cellules qui correspondent aux témoins (négatif - milieu seul; positifs – PHA et *Candida albicans*) et on compare ces variations entre les deux laboratoires.

Dans un deuxième temps, on transforme les données dans les six cellules qui correspondent aux milieux de culture enrichis de béryllium. Cette transformation a pour but de standardiser la comparaison interlaboratoire en fonction du témoin négatif interne, propre à chacun des deux laboratoires. L'analyse de variance est réalisée sur la donnée ainsi transformée pour chacune des trois concentrations séparément et en combinaison si la variation est comparable entre les concentrations. La comparaison entre les laboratoires est contrôlée pour la durée de l'incubation.

3.4.4 Reproductibilité du suivi longitudinal

Pour documenter la reproductibilité longitudinale, les résultats obtenus à partir de test répétés chez un même travailleur, dans un même laboratoire, à différentes périodes ont été isolés. Les résultats obtenus individuellement par les deux laboratoires ont été additionnés afin d'obtenir une cohorte de 246 travailleurs. Les diagnostics sont exprimés selon trois catégories :

- Anormal (A)
- Incertain (B)
- Normal (N)

La méthode de calcul SI a été retenue pour ce suivi. La concordance se calcule comme la somme des échantillons qui ont reçu un diagnostic identique (A-A, B-B, N-N) pour un même travailleur et ce pour chaque répétition du test, divisée par le nombre d'échantillons total de la cohorte. Le pourcentage de *discordance relative* est obtenu par la somme des diagnostics « Incertain » (A-B, B-A, N-B, B-N), divisée par le nombre d'échantillons, alors que le pourcentage de **discordance absolue** est obtenu par la somme des diagnostics dont l'un était « Normal » et l'autre « Anormal » (N-A, A-N), divisée par le nombre d'échantillons.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Exclusions

Onze dossiers ont été éliminés des analyses pour cause de valeurs aberrantes (Annexe 2). Des 10 dossiers avec données manquantes (Annexe 3), deux ont été retirés parce qu'au moins une ligne entière d'information était manquante. Les autres ont été conservés en recodant les zéros par « donnée manquante ». Au total, 475 dossiers soumis en duplicata ont été utilisés pour les analyses.

4.2 Concordance diagnostique interlaboratoire

4.2.1 Méthode LAV

Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Pour une cohorte de 469 analyses, le pourcentage de concordance dans les diagnostics est de 63,5%. Pour les *discordants relatifs* et **absolus** les pourcentages sont de 24,9% et 11,5% respectivement.

Tableau 2 : Comparaison des résultats entre les deux laboratoires selon la lecture « LAV »

Laboratoire A	**Laboratoire B**			
	Anormal	**Incertain**	**Normal**	**Ininterprétable**
Anormal	8	*7*	**24**	1
Incertain	*17*	3	*40*	0
Normal	**30**	*53*	287	0
Ininterprétable	0	2	2	0

n = 469

Prévalence de tests anormaux – laboratoire A : 39/470 = 8,3%
Prévalence de tests anormaux – laboratoire B : 55/473 = 11,6 %

Discordants absolus : 54/469 ou 11,5% (McNemar : T : 0,463; Pr : 0,4962)[1]
Discordants relatifs : *117/469 ou 24,9%*
Concordance : 298/469 ou 63,5%

[1] Statistiques de McNemar :
T =Test statistique de McNemar;
Pr = Niveau de probabilité (significatif si p < 0,05)

4.2.2 Méthode SI

Les résultats sont présentés dans le tableau 3. Pour une cohorte de 473 analyses, le pourcentage de concordance dans les diagnostics est de 87,7%. Pour les *discordants relatifs* et **absolus** les pourcentages sont de 10,4% et 1,9% respectivement.

Tableau 3 : Comparaison des résultats entre les deux laboratoires selon la lecture « SI »

Laboratoire A	**Laboratoire B**			
	Anormal	**Incertain**	**Normal**	**Ininterprétable**
Anormal	3	*1*	**3**	0
Incertain	*10*	5	*14*	0
Normal	**6**	*24*	407	1
Ininterprétable	0	0	0	0

n = 473

Prévalence de tests anormaux – laboratoire A: 7/474 = 1,5%
Prévalence de tests anormaux – laboratoire B : 19/473 = 4,0%

Discordants absolus : 9/473 ou 1,9% McNemar (T : 0,444; Pr :0,505)
Discordants relatifs : 49/473 ou 10,4%
Concordance : 415/473 ou 87,7%

4.2.3 Méthodes LAV et SI

Cette analyse a été faite pour reprendre la situation telle qu'elle était au début du projet c'est-à-dire l'analyse avec SI pour le laboratoire A et avec LAV pour le laboratoire B. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Pour une cohorte de 473 analyses, le pourcentage de concordance dans les diagnostics est de 72,7%. Pour les *discordants relatifs* et **absolus** les pourcentages sont de 19,5% et 7,8% respectivement.

Tableau 4 : Comparaison des deux laboratoires selon leur méthode de lecture spécifique

Laboratoire B (LAV)	**Laboratoire A (SI)**			
	Anormal	**Incertain**	**Normal**	**Ininterprétable**
Anormal	4	*16*	**35**	0
Incertain	*1*	1	*63*	0
Normal	**2**	*12*	339	0
Ininterprétable	0	0	1	0

n = 473

Prévalence de tests anormaux – laboratoire A- SI : 7/474 = 1,5%
Prévalence de tests anormaux – laboratoire B - LAV : 55/473 = 11,6%

Discordants absolus : 37/473 ou 7,8% McNemar (T : 27,676; **Pr : 0,000**)
Discordants relatifs : 92/473 ou 19,5%
Concordance : 344/473 ou 72,7%

4.3 Concordance diagnostique intralaboratoire

Pour cette partie du travail, les résultats représentent la concordance des diagnostics entre la méthode LAV et SI et ce pour chacun des laboratoires.

4.3.1 Laboratoire A

Les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Pour une cohorte de 471 analyses, le pourcentage de concordance dans les diagnostics est de 85,6%. Pour les *discordants relatifs* et **absolus** les pourcentages sont de 7,4% et 7,0% respectivement.

Tableau 5 : Comparaison des deux méthodes de lecture Laboratoire A

Méthode LAV	**Méthode SI**			
	Anormal	**Incertain**	**Normal**	**Ininterprétable**
Anormal	6	*1*	**33**	0
Incertain	*0*	27	*33*	0
Normal	**0**	*1*	370	0
Ininterprétable	1	0	3	0

n= 471

Prévalence de tests anormaux -LAV : 40/471 = 8,5%
Prévalence de tests anormaux - SI : 6/475 = 1,3%

Discordants absolus : 33/471 ou 7,0% McNemar (T : 31,03; **Pr :0,000**)
Discordants relatifs : 35/471 ou 7,4%
Concordance : 403/471 ou 85,6%

4.3.2 Laboratoire B

Les résultats sont présentés dans le Tableau 6. Pour une cohorte de 473 analyses, le pourcentage de concordance entre les deux méthodes de calcul est de 80,8%. Pour les discordants relatifs et absolus les pourcentages sont de 15,9% et 3,3% respectivement.

Tableau 6 : Comparaison des deux méthodes de lecture Laboratoire B

Méthode LAV	Méthode SI			
	Anormal	**Incertain**	**Normal**	**Ininterprétable**
Anormal	19	*20*	**16**	0
Incertain	*0*	10	*55*	0
Normal	**0**	*0*	353	0
Ininterprétable	0	0	0	1

n = 473

Prévalence de tests anormaux - LAV : 55/473 = 11,6%
Prévalence de tests anormaux - SI : 19/474 = 4,0%

Discordants absolus : 16/473 ou 3,3% McNemar (T : 14,06; **Pr : 0,000**)
Discordants relatifs : 75/473 ou 15,9%
Concordance : 382/473 ou 80,8%

4.4 Mesure et comparaison de la variation interlaboratoire

Le protocole original prévoyait les résultats d'analyse statistique intra-échantillonale et interéchantillonnale globale, pour l'interaction laboratoire, interaction jour, interaction saison et interaction zone. L'interaction intra-échantillonale n'a pas été retenue étant donné que toutes les analyses effectuées par les deux laboratoires se sont conformées à la norme standard du coefficient de variation qui doit être égal ou inférieur à 35%.

À partir des données brutes de chaque laboratoire, les sources de variation ont été analysées de façon à identifier leur contribution spécifique. On appellera variations « interéchantillonnales » l'effet de tous les paramètres retenus (laboratoire, tabagisme, saison, éloignement, sexe). Les analyses sont multivariées et montrent l'effet net relié à chacun de ces facteurs. Les valeurs de p inférieures à 0,05 indiquent que la différence est statistiquement significative. Pour toutes les analyses de données brutes, une référence sera faite à un tableau descriptif dans lequel nous retrouverons les moyennes brutes ventilées selon le facteur en question afin d'interpréter plus facilement les résultats.

4.4.1 Variable laboratoire

L'analyse de variance montre une certaine variabilité des données entre les laboratoires pour les témoins négatifs et positifs de même que pour la concentration la plus élevée de béryllium tel que résumé au Tableau 7 (voir aussi les Tableaux A1 à A10, à l'annexe 4).

Tableau 7 : ANOVA pour la comparaison interlaboratoire

Paramètres	Lab A	Lab B	*F*	*P*
Témoins négatifs / jour 4	558 cpm	505 cpm	17,08	< 0,001 *
Témoins négatifs / jour 6	1929 cpm	1506 cpm		
PHA / jour 4	SI 344,00	SI 264,00	48,50	< 0,001 *
***Candida albicans* / jour 6**	SI 55,00	SI 30,00		
Béryllium 10^{-6} M / jour 4	SI 1,17	SI 1,12	0,08	0,78
Béryllium 10^{-6} M / jour 6	SI 1,21	SI 1,22		
Béryllium 10^{-5} M / jour 4	SI 1,15	SI 1,37	3,27	0,07
Béryllium 10^{-5} M / jour 6	SI 1,00	SI 1,41		
Béryllium 10^{-4} M / jour 4	SI 1,13	SI 1,50	7,51	0,006 *
Béryllium 10^{-4} M / jour 6	SI 0,73	SI 1,44		

* $P < 0,05$
F : statistique F = variances estimées (intergroupe/intra groupe)
cpm : coups par minute
SI : indice de stimulation

Cette variabilité témoigne de légères différences entre les laboratoires. Comme mentionné dans la section méthodologie, malgré le fait que la méthode ait été harmonisée, certaines différences entre les deux laboratoires, dont l'utilisation de deux lots différents de sérum AB, expliquerait la variation au niveau des témoins négatifs. En effet ces lots de sérum représentent deux pools différents de donneurs donc la concentration de chacun des éléments du sérum nécessaire à supporter la culture cellulaire varie d'un pool à l'autre et cette variation se reflète sur le comportement des cellules en culture.

La même situation s'observe pour la réponse des témoins positifs. Malgré le fait que les indices de stimulation des témoins positifs ont toujours respecté les valeurs seuils de 50 et de 3 respectivement pour la PHA et le *Candida albicans*, des indices plus faibles ont été obtenus par le laboratoire B surtout pour *Candida albicans*. Après une discussion entre les directeurs de laboratoire, le laboratoire B a changé de fournisseur de *Candida albicans* pour adopter celui du laboratoire A. À partir de ce moment, l'écart entre les deux laboratoires diminuait de plus en plus.

Pour ce qui est de la différence significative pour la concentration la plus élevée en béryllium, il est connu que le béryllium est cytotoxique pour des cellules normales, mais le pourcentage de mortalité n'est pas identique d'un puits à l'autre. Cette situation combinée à des lots de sérum différents expliquerait cette variation entre laboratoires.

4.4.2 Variable saison

Pour l'effet de saison, 57,4% des échantillons ont été reçus entre mai-septembre (« saison chaude ») et 42,7% entre octobre-avril (« saison froide »). Il a été généralement observé que les lectures obtenues en saison chaude sont légèrement supérieures qu'en saison froide et ce pour les deux laboratoires. L'analyse de variance a aussi fait ressortir quelques différences significatives pour les témoins de même que pour la concentration intermédiaire de béryllium tel que résumé au Tableau 8 (voir aussi les Tableaux A1 à A10, à l'annexe 4).

Tableau 8 : ANOVA pour l'effet saison

Paramètre	Labo A		Labo B		F-test	p
	Saison chaude	Saison froide	Saison chaude	Saison froide		
Témoins négatifs / jour 4	478 cpm	667 cpm	539 cpm	459 cpm	10,61	0,001 *
Témoins négatifs / jour 6	1693 cpm	2250 cpm	1582 cpm	1403 cpm		
PHA / jour 4	SI : 404	SI : 261	SI : 243	SI : 294	18,24	< 0,001 *
***Candida albicans* / jour 6**	SI : 61	SI : 47	SI : 51	SI : 3,20		
Béryllium 10^{-6}M / jour 4	SI : 1,21	SI : 1,13	SI : 1,16	SI : 1,06	3,62	0,06
Béryllium 10^{-6}M / jour 6	SI : 1,28	SI : 1,12	SI : 1,37	SI : 1,00		
Béryllium 10^{-5}M / jour 4	SI : 1,21	SI : 1,01	SI : 1,38	SI : 1,34	5,99	0,02 *
Béryllium 10^{-5}M / jour 6	SI : 1,07	SI : 0,91	SI : 1,78	SI : 0,90		
Béryllium 10^{-4}M / jour 4	SI : 1,19	SI : 1,05	SI : 1,49	SI : 1,52	3,03	0,08
Béryllium 10^{-4}M / jour 6	SI : 0,80	SI : 0,64	SI : 1,74	SI : 1,04		

* $P < 0,05$
F : statistique F = variances estimées (intergroupe/intra groupe)
cpm : coups par minute
SI : indice de stimulation

Cependant, il n'y a pas d'interaction statistiquement significative entre l'effet saisonnier et le laboratoire; ce qui confirme que les deux laboratoires sont soumis aux mêmes effets saisonniers.

4.4.3 Variables jour, éloignement, tabagisme et sexe

Les résultats des analyses pour les variables jour et éloignement sont présentés dans différents tableaux à l'annexe 4 (Tableaux A1 à A6). Pour l'effet jour, les différences observées entre les jours 4 et 6 étaient attendues puisque les conditions de culture et les témoins positifs sont totalement différents. Pour l'éloignement, 21,4% des travailleurs échantillonnés vivent à plus de 100 km de Montréal (Mauricie-Bois-Francs, Bas-Saint-Laurent et Abitibi) et 78,6% résident à l'intérieur de la région de Montréal-Métropolitain. Ce dernier paramètre n'introduit pas de variation interlaboratoire. (Tableaux A1 à A5).

Pour le statut tabagique, 23,8% sont des fumeurs actifs, 62,5% non ou anciens fumeurs et 13,7% ont un statut inconnu (données manquantes). Pour la cohorte étudiée, le statut tabagique n'introduit pas de variabilité entre les laboratoires. Pour le sexe, tous les sujets sont des hommes, à l'exception de 20 femmes. Le facteur « sexe » ne peut donc pas, comme prévu, être étudié.

4.5 Suivi longitudinal

Les résultats sont présentés dans le Tableau 9. Pour une cohorte de 246 travailleurs suivis dans l'un ou l'autre des laboratoires, le pourcentage de concordance dans les diagnostics répétés est de 76,7%. Les pourcentages de discordants relatifs et absolus sont de 17,9% et 4,5% respectivement.

Tableau 9 : Suivi longitudinal

	n	%
Concordance	191 / 246	76,7
Discordants absolus	11 / 246	4,5
Normal vers anormal	2 de 11	-
Anormal vers normal	9 de 11	-
Discordants relatifs	44 / 246	17,9

Pour les discordants absolus, la conversion d'un diagnostic normal vers anormal n'est pas nécessairement préoccupante étant donné que ce résultat devra être confirmé par un second test de BeLPT. La conversion d'un diagnostic anormal vers normal, ne doit pas d'emblée être considérée comme erronée. Lorsqu'un tel résultat survient, une corrélation avec le bilan de santé du travailleur obtenu au même moment que le test doit être faite; ce résultat doit également être confirmé par un second test.

5. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

L'ensemble des résultats de concordances intralaboratoires et interlaboratoires des diagnostics selon les différentes méthodes de calcul est résumé au Tableau 10:

Tableau 10 : Concordances de diagnostic

Type d'analyse	% Concordance	% Discordants absolus
SI (A) vs SI (B)	87,7	1,9
LAV (A) vs LAV (B)	63,5	11,5
LAV(B) vs SI (A)	72,7	7,8
LAV (A) vs SI (A)	85,6	7,0
LAV (B) vs SI (B)	80,8	3,3
Suivi longitudinal (SI)	76,7	4,5

La concordance interlaboratoire est supérieure lorsque la méthode SI est utilisée. Elle diminue de 87,7 à 63,5% lorsque la méthode LAV est utilisée pour déterminer le diagnostic. Si les méthodes d'origine (LAV pour le laboratoire B et SI pour le laboratoire A) étaient conservées, la concordance serait intermédiaire avec un taux de 72,7%. Ces résultats démontrent que la méthode SI est la plus appropriée car elle rencontre les exigences de validation d'une méthode analytique, c'est-à-dire que la différence entre les résultats d'une mesure répétée est inférieure à 15%, avec une précision de plus de 85% [(22)]. De plus, selon l'analyse statistique McNemar, il n'y a pas de différence significative entre les **discordants absolus** pour les deux laboratoires avec la méthode SI. La méthode SI donnerait de meilleurs résultats probablement parce qu'un ajustement de la limite seuil se fait en fonction du lot de sérum utilisé. Cette valeur seuil varie d'un lot à l'autre et doit être bien caractérisée. Les résultats de la méthode SI seraient donc plus cohérents dans un contexte de test fonctionnel comme le BeLPT.

Les concordances intralaboratoires pour la comparaison entre les deux méthodes de calculs sont supérieures à 80% pour les deux laboratoires. En reprenant le paramètre de la précision pour faire l'analyse de concordance, nous pouvons observer que les deux laboratoires rencontrent les exigences de validation d'une méthode bioanalytique, c'est-à-dire que la différence entre les résultats d'une mesure répétée est inférieure à 25-30%, avec une précision de plus de 80% [(23-24)].

Lorsque suivis longitudinalement, les diagnostics ont été inchangés dans 76,7% des cas et rencontrent donc les exigences de validation d'une méthode bioanalytique.

6. CONCLUSION

L'analyse simultanée des échantillons de sang prélevés chez près de 500 travailleurs exposés au béryllium par deux laboratoires québécois a permis de déterminer une précision interlaboratoire de 87,7%, lorsque les méthodologies sont harmonisées et que les résultats sont analysés avec la méthode SI. Dans ces conditions, le test BeLPT peut être considéré comme étant fiable et performant puisqu'il atteint la précision attendue d'un test analytique. Le BeLPT pourrait ainsi servir de méthode étalon pour la validation de tests alternatifs (tel que l'Immuno-LPT) pour la détection des travailleurs sensibilisés au béryllium.

Dans les variables étudiées pouvant contribuer à la précision du test, une différence significative a été observée pour la variable jour, comme prévu, étant donné que les conditions de culture et les témoins positifs sont différents pour les jours 4 et 6. Pour la variable saison, des réponses plus élevées ont été obtenues en saison chaude dans les deux laboratoires. Cependant, il n'y a pas d'interaction statistiquement significative entre l'effet saisonnier et les laboratoires.

Le statut tabagique n'a introduit aucune augmentation de la variabilité interlaboratoire. L'éloignement entre la zone d'échantillonnage et le laboratoire ne modifie pas significativement la variabilité interlaboratoire. La variable sexe n'a pu être analysée en raison de la trop faible représentation des femmes comparativement aux sujets masculins.

Les faibles variations interlaboratoires observées sont causées principalement par l'utilisation de lots différents de sérum, par l'utilisation de sources différentes d'antigène *Candida albicans* et par l'effet cytotoxique du béryllium sur des cellules normales à la concentration la plus élevée (10^{-4} M). La précision interlaboratoire du BeLPT pourrait donc être encore améliorée si les laboratoires utilisaient les mêmes sources de sérum humain et de *Candida albicans*.

7. RECOMMANDATIONS

Compte tenu de la nature intrinsèque d'un test immunologique tel que le BeLPT, une variabilité significative interlaboratoire entre des analyses répétées chez un même travailleur est possible lorsque les méthodes de travail ne sont pas contrôlées de façon rigoureuse. Il est donc nécessaire de contrôler la variabilité intralaboratoire en se conformant aux exigences des procédures de laboratoire, tout en tenant compte des variables hors contrôle inhérentes à l'état de santé du travailleur. De plus, l'implantation d'un programme de contrôle de la qualité interlaboratoire permettrait de comparer les résultats entre les différents laboratoires procédant à ces analyses. En plus du maintien de l'harmonisation entre les laboratoires, incluant la méthode de calcul par SI, du respect des procédures standard de laboratoire, le programme d'assurance qualité devrait inclure :

- Établissement d'une séquence de vérification d'un certain pourcentage (5 ou 10%, par exemple) de tests par le même laboratoire ou un second laboratoire.
- L'analyse d'échantillons identiques (normaux et anormaux) qui pourrait se faire selon une formule de réception des échantillons de contrôle aveugles et ce à une fréquence à déterminer.
- Audit des laboratoires (sur une base annuelle ou lors de toute modification au sein du laboratoire) par un organisme reconnu.

8. RÉFÉRENCES

1. Kolanz ME. (2001). Introduction to Beryllium: Uses, Regulatory History, and Disease. Appl Occup environ Hyg 16(5): 559-67.

2. Newman LS, Lloyd J, Daniloff E. (1996). The Natural History of Beryllium Sensitization and Chronic Beryllium Disease. Environ Health Perspect 104(5): 937-43.

3. Newman LS. Clinical update: Beryllium sensitization and chronic beryllium disease. International beryllium research conference, Montréal, Mars 2005.

4. Williams WJ, Williams WR. (1983). Value of beryllium lymphocyte transformation tests in chronic beryllium disease and in potentially exposed workers. Thorax 38: 41-44.

5. Rossman MD, Kern JA, Elias JA, Cullen MR, Epstein PE, Preuss OP, Markham TN, Daniele RP. (1988). Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium. A test for chronic beryllium disease. Ann Inter Med 108: 687-93.

6. Mroz MM, Kreiss K, Lezotte DC, Campbell PA, Newman LS. (1991). Re-examination of the blood lymphocyte transformation test in the diagnostic of chronic beryllium disease. J Allergy Clin Immunol 88: 54-60.

7. Newman LS. (1996). Significance of the blood beryllium lymphocyte proliferation test. Environ Health Persp 104: 953-56.

8. Newman LS, Lloyd J, Daniloff E. (1996). The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease. Environ Health Persp 104: 937-43.

9. Stange AW, Hilmas DE, Furman FJ, Gatliffe TR. (1996). Rocky Flats Beryllium Health Surveillance. Environ Health Persp 104: 981-86.

10. Stange AW, Furman FJ, Hilmas DE. (2004). The beryllium lymphocyte proliferation test: relevant issues in beryllium health surveillance. Am J Ind Med 46: 453-62.

11. Cher DJ, Deubner DC, Kelsh MA, Chapman PS, Ray RM. (2006). Assessment of the beryllium lymphocyte proliferation test using statistical process control. Inhalation Tox 18: 901-10.

12. Borak J, Woolf SH, Fields CA. (2006). Use of beryllium lymphocyte proliferation testing for screening of asymptomatic individuals: an evidence – based assessment. J Occup Environ Med 48: 937-47.

13. Deubner DC, Goodman M, Iannuzzi J. (2001). Variability, predictive value, and uses of the beryllium blood lymphocyte proliferation test (BeLPT) : preliminary analysis of the ongoing workforce survey. J Appl Occup Environ Hyg 16(5) : 521-26.

14. Rossman MD, Kern JA, Elias JA, Cullen MR, Epstein PE, Preuss OP, Markham TN, Daniele RP. (1988). Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium - A test for chronic beryllium disease. Ann Intern Med 108(5): 687-93.

15. Maier LA, Newman LS. (1998). Beryllium Disease. In Environmental and Occupational Medicine. 3rd Ed, edited by Rom WN. Lippincot-Raven Publishers. Philadelphia: Chapter 72: 1021-35.

16. Maier LA. (2001). Beryllium Health Effects in the Era of the Beryllium Lymphocyte Proliferation Test. Appl Occup Environ Hyg 16(5): 514-20.

17. INSPQ. (2003). Guide d'utilisation du BeLPT chez les travailleurs exposés au béryllium. http://www.csst.qc.ca/portail/fr/publications/dc_200_2223.htm

18. Donner A, Eliasziw M. (1987). Sample size requirements for reliability studies. Stat Med 6: 441-48.

19. U.S. Department of Energy (DOE). (2001). Beryllium.

20. National Jewish Medical & Research Center. (2001). Standard Operating Procedure, BeLPT.

21. Fleiss JL, Levin B, Cho Paik M. (1981). Statistical Methods for Rates and Proportions.3rd Ed, edited by John Wiley & Sons.

22. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly J.P., Yacobi A., Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Inter J Pharma 82: 1-7.

23. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. (2000). Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. J Pharma Biomed 21:1249-73.

24. Miller KJ, Bowsher RR, Celniker A, Gibbons J, Gupta S, Lee JW, Swanson SJ, Smith WD, Weiner RS. (2001). Workshop on bioanalytical methods validation for macromolecules : summary report. Pharma Res 18: 1373-83.

ANNEXE 1

Principe de la méthode de prolifération lymphocytaire par le béryllium (BeLPT)

Paramètres	DOE	NJC	Laboratoire B	Laboratoire A
Volume de sang	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml
Anticoagulant	sodium héparine lithium héparine	sodium héparine	sodium héparine	sodium héparine
Temps de transit	24 à 30 heures	24 à 30 heures	24 heures	24 heures
Gradient	Ficoll-hypaque Histopaque Lympholyte-H	Accuspin Histopaque	Lympholyte-H	Ficoll-hypaque
Milieu de préparation	PBS	PBS	PBS	PBS
Milieu de culture	RPMI-1640 complet	RPMI-1640 complet	RPMI-1640 complet	RPMI-1640 complet
Mitogène	Con A (10 µg/ml) PHA (30 µg/ml)	PHA (30 µg/ml)	PHA (10 µg/ml)	PHA (10 µg/ml)
Incubation	4 jours	3 jours mitogène 4 jours béryllium	4 jours	4 jours
Antigène	*Candida albicans* (20 µg/ml) Toxine tétanique	*Candida albicans* (20 µg/ml)	***Candida albicans*** (20 µg/ml)	***Candida albicans*** (20 µg/ml)
Incubation	7 jours	6 jours	6 jours	6 jours
[Sulfate de béryllium]	10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M	10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M	10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M	10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M
Incubation	4 et 7jours	4 et 6 jours	4 et 6 jours	4 et 6 jours
[Sérum]	10% humain AB	10% humain AB	10% humain AB	10% humain AB
Réplicats béryllium	4	4	4	4
Réplicats mitogène	4	4	4	4
Réplicats antigène	4	4	4	4
Réplicats milieu	8 to 12	15	12	14
Nombre de cellules	2,5 10^5 / puits	2,5 10^5 / puits	2,5 10^5 / puits	2,5 10^5 / puits
^{3}H-thymidine	1µCi	1µCi / 10µl	1µCi / 20µl	1µCi / 20µl
Temps (pulse)	6 à 18 heures	4 à 12 heures	18 heures	18 heures
Cocktail à scintillation	« approprié »	Microscint-O	**Betaplate Scint**	**Microscint 20**
Calcul	LAV	Indice de stimulation (SI)	LAV / SI	LAV / SI
Valeur seuil	Standard à 2,5	*f* (sérum)	Standard à 2,5 *f* (sérum)	Standard à 2,5 *f* (sérum)
%CV	N/A	35%	35%	35%
Logiciel	« approprié »	Microsoft Access	Microsoft Excel	Microsoft Excel

Les paramètres en gras représentent les produits pour lesquels les fournisseurs sont différents entre les deux laboratoires.

ANNEXE 2

Liste des dossiers avec données aberrantes (dossiers retirés)

Numéro	Anomalie
1	Tous milieux enrichis J4 < 100
2	4 Be100µM J4 <21
3	2 TN, 1 Be10µM, 1 Be 100µM J6 < 15
4	TP J6 entre 600 et 87000
5	Un TN, 1 Be10µM, 1 Be100µM J6 < 10
6	TN variation de 400 à 12000 J4-J6
7	1 TN J6 à 20000
8	TP J4 variation de 200 à 62000
9	TP J4 variation de 79 à 41000
10	TN J4 variation de 44 à 1125
11	Be100µM J4, 4 valeurs > 100 000

ANNEXE 3

Liste des dossiers avec données manquantes

Numéro	Anomalie
1	Toutes valeurs à zéro (dossier retiré)
2	Toutes valeurs à zéro (dossier retiré)
3	1 TP J4 à zéro
4	1 TP J4 à zéro
5	1 TP J4 à zéro
6	1 TP J4 à zéro
7	1 TP J4 à zéro
8	Plusieurs données manquantes J4 J6
9	Plusieurs données à zéro J4 J6
10	Plusieurs données à zéro J4 J6

ANNEXE 4

Tableau A. 1 : Sources de variation sur les témoins négatifs

Variations interéchantillonales (ANOVA mesures répétées multivariées[1])

Source	Statistique F	Degrés de liberté	valeur p
Laboratoire	17,08	11	<0,001
Jour	429,15	1	<0,001
Saison	10,61	1	0,001
Zone	11,97	1	<0,001

Tableau A. 2 : Sources de variation sur les témoins positifs standardisés pour le témoin négatif

Variations interéchantillonales (ANOVA mesures répétées multivariées[1])

Source	Statistique F	Degrés de liberté	valeur p
Labo (B vs M)	**48,50**	**1**	**<0,001**
Candida vs PHA	**1233,95**	**1**	**<0,001**
Saison	**18,24**	**1**	**<0,001**
Zone	1,67	1	0,20

[1] Contrôlant pour la variation intra-échantillonale et les variables dans le tableau

Tableau A. 3 : Sources de variation sur les milieux enrichis de 1 µM Béryllium

Variations interéchantillonales (ANOVA mesures répétées multivariées [1])

Source	Statistique F	Degrés de liberté	valeur p
Labo (A vs B)	0,08	1	0,78
Jour (4 vs 6)	0,62	1	0,43
Saison	3,62	1	0,06
Zone	0,02	1	0,88

Tableau A. 4 : Sources de variation sur les milieux enrichis de 10 µM Béryllium

Variations interéchantillonales (ANOVA mesures répétées multivariées [1])

Source	Statistique F	Degrés de liberté	valeur p
Labo (A vs B)	3,27	1	0,07
Jour (4 vs 6)	0,11	1	0,74
Saison	**5,99**	**1**	**0,02**
Zone	1,13	1	0,29

Tableau A. 5 : Sources de variation sur les milieux enrichis de 100 µM Béryllium

Variations interéchantillonales (ANOVA mesures répétées multivariées[1])

Source	Statistique F	Degrés de liberté	valeur p
Labo (A vs B)	**7,51**	**1**	**0,006**
Jour (4 vs 6)	1,38	1	0,24
Saison	3,03	1	0,08
Zone	2,92	1	0,09

[1] Contrôlant pour la variation intra-échantillonale et les variables dans le tableau

Tableau A. 6 : Moyennes (É-T) des témoins négatifs

	Labo A			Labo B		
		N	Moyenne (É-T)		N	Moyenne (É-T)
Jour 4	Chaud	272	478 (219)	Chaud	268	539 (262)
	Froid	200	667 (382)	Froid	199	459 (285)
	Zone M	369	563 (332)	Zone M	368	513 (284)
	Zone HM	103	542 (234)	Zone E	99	475 (239)
	Total	**472**	**558 (313)**	**Total**	**467**	**505 (275)**
Jour 6	Chaud	272	1693 (1472)	Chaud	269	1582 (1884)
	Froid	200	2250 (1949)	Froid	198	1403 (1564)
	Zone M	369	1905 (1710)	Zone M	368	1372 (1614)
	Zone HM	103	2016 (1720)	Zone E	99	2004 (2140)
	Total	**472**	**1929 (1711)**	**Total**	**467**	**1506 (1756)**

Zone M = Montréal-métropolitain
Zone HM = extérieur de Montréal
Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm)

Tableau A. 7 : Moyennes (É-T) des témoins positifs standardisés pour le témoin négatif

	Labo A			Labo B		
		N	Moyenne (É-T)		N	Moyenne (É-T)
PHA	Chaud	272	404 (218)	Chaud	268	243 (271)
	Froid	200	261 (147)	Froid	197	294 (163)
	Total	**472**	**344 (204)**	**Total**	**465**	**264 (233)**
Candida albicans	Chaud	272	61 (63)	Chaud	263	51 (87)
	Froid	200	47 (50)	Froid	198	3,2 (9,9)
	Total	**472**	**55 (58)**	**Total**	**461**	**30 (70)**

Les résultats sont exprimés en indice de stimulation

Tableau A. 8 : Moyennes (É-T) des milieux enrichis de 1 µM béryllium

	Labo A			Labo B		
		N	Moyenne (É-T)		N	Moyenne (É-T)
Jour 4	Chaud	272	1,21 (0,62)	Chaud	268	1,16 (2,29)
	Froid	200	1,13 (0,51)	Froid	197	1,06 (0,44)
	Total	**472**	**1,17 (0,58)**	**Total**	**465**	**1,12 (1,76)**
Jour 6	Chaud	272	1,28 (1,01)	Chaud	269	1,37 (3,82)
	Froid	200	1,12 (0,48)	Froid	198	1,00 (0,65)
	Total	**472**	**1,21 (0,83)**	**Total**	**467**	**1,22 (2,93)**

Les résultats sont exprimés en indice de stimulation

Tableau A. 9 : Moyennes (É-T) des milieux enrichis de 10 µM béryllium

	Labo A			Labo B		
		N	Moyenne (É-T)		N	Moyenne (É-T)
Jour 4	Chaud	272	1,21 (1,58)	Chaud	268	1,38 (3,26)
	Froid	200	1,01 (0,76)	Froid	197	1,34 (1,19)
	Total	**472**	**1,15 (1,30)**	**Total**	**465**	**1,37 (2,59)**
Jour 6	Chaud	272	1,07 (3,41)	Chaud	269	1,78 (7,83)
	Froid	200	0,91 (1,44)	Froid	197	0,90 (2,10)
	Total	**472**	**1,00 (2,75)**	**Total**	**466**	**1,41 (6,11)**

Les résultats sont exprimés en indice de stimulation

Tableau A. 10 : Moyennes (É-T) des milieux enrichis de 100 µM béryllium

	Labo A			Labo B		
		N	Moyenne (É-T)		N	Moyenne (É-T)
Jour 4	Chaud	272	1,19 (1,70)	Chaud	268	1,49 (5,09)
	Froid	200	1,05 (0,83)	Froid	197	1,52 (1,58)
	Total	**472**	**1,13 (1,40)**	**Total**	**465**	**1,50 (4,00)**
Jour 6	Chaud	272	0,80 (2,81)	Chaud	269	1,74 (9,01)
	Froid	200	0,64 (1,10)	Froid	197	1,04 (2,97)
	Total	**472**	**0,73 (2,25)**	**Total**	**466**	**1,44 (7,12)**

Les résultats sont exprimés en indice de stimulation