

# Apport de la métrologie avancée à l'évaluation et à l'amélioration de la fiabilité des examens de biologie médicale

Par Vincent DELATOUR

Expert Biomédical/Biomarqueurs au Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE)

La fiabilité des examens de biologie médicale représente un enjeu majeur de santé publique, car elle permet de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter les traitements entrepris. Afin d'évaluer et d'améliorer la comparabilité et la fiabilité des résultats de ces examens, l'apport de la métrologie est fondamental. D'une part, le raccordement métrologique des résultats aux méthodes de référence et aux étalons d'ordre supérieur (rendu obligatoire par la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*) permet d'harmoniser les résultats d'un laboratoire à l'autre, même s'ils utilisent des méthodes de dosage différentes. D'autre part, l'utilisation des méthodes de référence pour déterminer les valeurs cibles associées aux échantillons de contrôle de qualité permet de vérifier l'exactitude des dosages réalisés dans les laboratoires de biologie médicale, à la condition que ces échantillons de contrôle soient commutables, c'est-à-dire qu'ils imitent le comportement des échantillons de patients.

## Le contexte réglementaire

La fiabilité des analyses médicales représente un enjeu majeur de santé publique, car elle permet de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter les traitements entrepris. On estime notamment que 60 à 70 % des prises de décisions médicales s'appuient sur le résultat d'un test de diagnostic *in vitro*. C'est dans ce contexte que s'inscrit la réforme de la biologie médicale adoptée en 2010 qui rend obligatoire l'accréditation par le COFRAC (Comité français d'accréditation) de tous les laboratoires de biologie médicale (LBM), publics comme privés, selon la norme ISO EN 15189, et ce, d'ici à 2020. Outre l'obligation de respecter des standards de qualité, la réforme de la biologie médicale s'est accompagnée – avec la baisse des tarifs des actes – d'une industrialisation de ce secteur. En particulier, la norme ISO EN 15189 implique l'utilisation de procédures validées, dont les résultats doivent être raccordés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne ininterrompue de traçabilité métrologique (voir la Figure 1 de la page suivante).

Actuellement, force est de constater que contrairement aux autres domaines de la mesure, les résultats des examens de biologie médicale ne sont pas toujours traçables des références reconnues internationalement (par

exemple, des matériaux de référence certifiés ou des méthodes de référence d'ordre supérieur) et que les incertitudes associées aux résultats de mesure ne sont pas systématiquement évaluées. Cette situation est en contradiction non seulement avec la norme ISO EN 15189, mais aussi avec d'autres référentiels internationaux qui exigent que les valeurs associées aux matériaux d'étalonnage et de contrôle de la qualité soient traçables aux méthodes de référence et aux matériaux de référence certifiés disponibles, comme le demande la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes de référence pour le dosage des principaux biomarqueurs utilisés en biologie médicale. Or, il existe (hélas !) un manque important de méthodes de référence en biologie clinique au niveau international.

Tenant compte d'un contexte de rationalisation des dépenses de santé publique et soucieuse de donner aux professionnels du diagnostic les moyens de répondre aux exigences de l'accréditation, la direction générale de la Santé (DGS) estime ainsi « prioritaire la mise au point d'analyses de référence, couvrant pour l'instant le champ des analyses courantes pratiquées dans les laboratoires de biologie médicale, proposant pour un paramètre donné la technique de référence, et permettant ensuite de définir

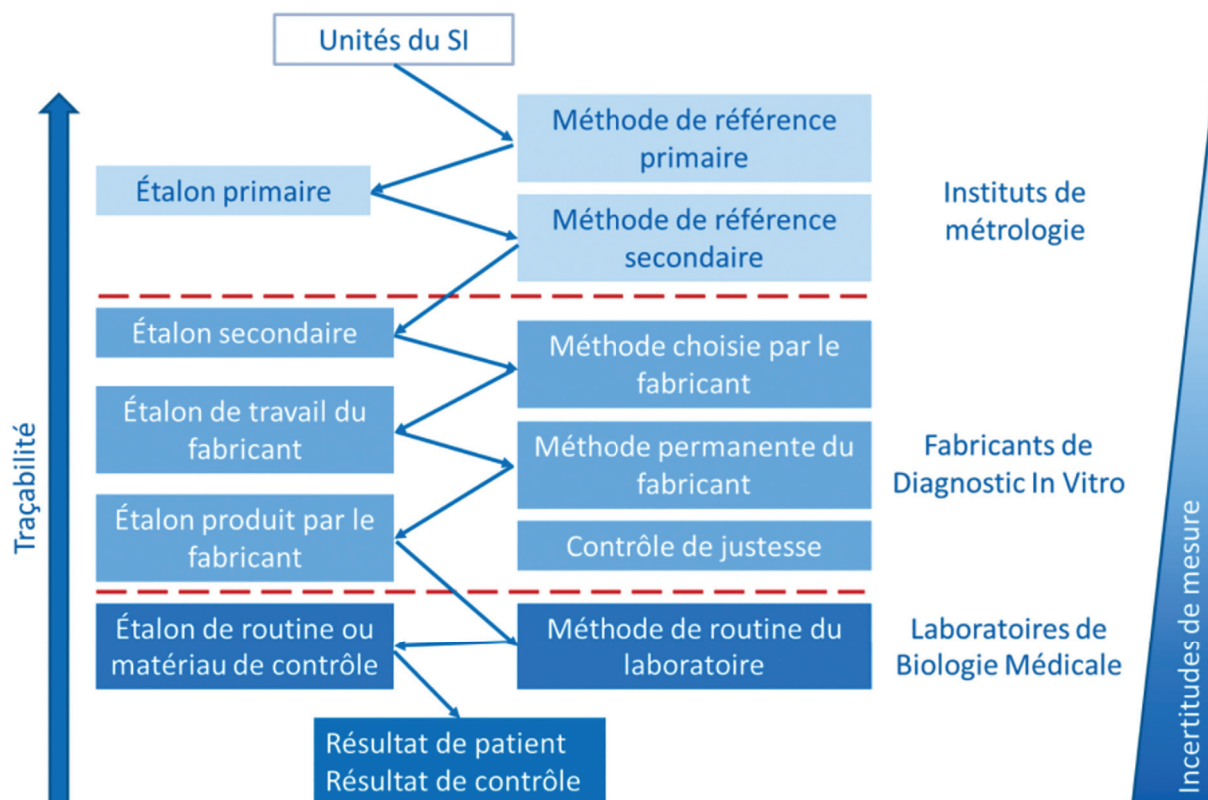


Figure 1 : Une chaîne de traçabilité consiste en une succession ininterrompue d'étalonnages permettant de relier un résultat de mesure aux unités du Système international (SI), ceux-ci s'accompagnant d'incertitudes croissantes à chaque raccordement.

en accord avec les experts médicaux de la discipline les valeurs normales ».

Ce besoin a également été identifié par différents organisateurs d'évaluations externes de la qualité, en particulier l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), pour qui l'importance des méthodes de référence est évidente. En effet, ces dernières permettent de déterminer les valeurs cibles associées aux échantillons de contrôle de qualité envoyés chaque année à l'intégralité des laboratoires de biologie médicale de routine pour en évaluer les performances. En l'absence de valeur cible déterminée par une méthode de référence, c'est une valeur consensuelle qui est retenue correspondant à la moyenne des résultats obtenus par l'ensemble des participants, ce qui peut conduire à des erreurs d'interprétation, en particulier dans le cas où la majorité des laboratoires fournirait un résultat éloigné de la valeur réelle. C'est pour cette raison que le décret n°2016-46 du 26 janvier 2016 relatif à la biologie médicale prévoit que chaque organisme d'évaluation externe de la qualité des examens de biologie médicale doit effectuer périodiquement une comparaison entre les résultats de chaque laboratoire de biologie médicale avec le résultat obtenu par la méthode de référence (lorsque celle-ci existe) <sup>(1)</sup>.

### L'état des lieux en France

En lien avec les autorités de santé publique (DGS, ANSM, Haute Autorité de Santé (HAS)...) et avec les cliniciens des domaines concernés, le Laboratoire national de mé-

trologie et d'essais (LNE) a initié, depuis 2006, des travaux dans le domaine biomédical afin d'évaluer et d'améliorer la fiabilité des analyses de biologie médicale. Concrètement, ces travaux consistent à développer et à valider des méthodes de référence d'ordre supérieur pour le dosage des principaux biomarqueurs utilisés en biologie clinique, avec pour objectifs :

- d'assigner des valeurs de référence aux échantillons utilisés dans le cadre d'évaluations externes de qualité afin d'évaluer les performances des méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale,
- de produire des matériaux de référence certifiés (étaçons internationaux) afin d'assurer la traçabilité métrologique des résultats à des références internationalement reconnues et ainsi de permettre la comparabilité des résultats dans le temps et d'un laboratoire à l'autre, même s'ils utilisent des techniques différentes.

Compte tenu du nombre considérable des paramètres mesurés en routine en biologie clinique, la première étape consiste à prioriser les biomarqueurs pour lesquels une méthode de référence doit être développée. Le choix de ces biomarqueurs ou « analytes » prioritaires est effectué en concertation avec les autorités de santé publique (DGS, ANSM, HAS), les sociétés savantes de biologie (SFBC – Société française de biologie clinique), les organismes

(1) [https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/1/26/2016-46/jo/article\\_2](https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/1/26/2016-46/jo/article_2)

d'évaluation externe de la qualité des examens de biologie médicale (Centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie chimique – CTCB, Asqualab, ProBioQual, biologie prospective) et les cliniciens à même d'identifier les besoins actuels et émergents. Les chiffres fournis par la Sécurité sociale permettent également d'identifier quelles sont les analyses les plus fréquentes, les analyses les plus coûteuses et celles qui sont de plus en plus utilisées <sup>(2)</sup>. Afin de maximiser l'impact des projets initiés, l'accent est mis sur les biomarqueurs correspondant aux analyses les plus pratiquées et/ou à celles engendrant les dépenses de santé les plus importantes en termes de remboursement (voir la Figure 2 ci-dessous). Afin de prioriser les biomarqueurs pour lesquels la valeur ajoutée d'un apport métrologique est la plus importante sont également prises en considération les recommandations des sociétés savantes (SFBC, *International Federation of Clinical Chemistry* – IFCC), les résultats des évaluations externes de qualité (afin d'identifier les paramètres pour lesquels il existe une importante variabilité selon les techniques employées), ainsi que les collaborations envisageables avec des industriels et des équipes hospitalo-universitaires.

Rang	Libellé de l'acte ou du groupe	Nombre d'examens en 2013	Montant remboursé en 2013 (€)
1	HEMOGRAMME	37 204 844	241 099 240
2	GLYCEMIE	24 092 770	24 236 686
3	TRANSAMINASES	20 765 486	51 276 549
4	IONOGRAMME	20 409 663	66 101 432
5	CREATININE	18 035 593	26 447 379
6	PROTEINE C REACTIVE (CRP)	17 148 201	45 891 348
7	EXPLORATION D'UNE ANOMALIE LIPIDIQUE	17 054 717	98 961 763
8	VITESSE DE SEDIMENTATION	15 409 798	21 075 004
9	GAMMA GLUTAMYL TRANSFERASE	15 280 702	21 986 319
10	TEMPS DE QUICK	14 572 891	71 887 907
11	UREE ET CREATININE	12 486 130	23 278 714
12	TSH	11 174 563	70 178 219
13	HBA1C	8 795 438	69 628 729
14	CALCIUM	8 518 029	12 704 215
15	FERRITINE	8 138 162	58 054 310
16	ACIDE URIQUE	7 985 716	11 310 461
17	PHOSPHATASES ALCALINES	7 810 078	11 881 385
18	EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DES URINES	7 707 178	97 034 402
19	VITAMINE D	6 832 175	70 696 109
21	TEMPS DE CEPHALINE + ACTIVATEUR	4 852 994	21 471 847
22	BILIRUBINE	4 815 745	10 831 473
23	PROTEINURIE	4 743 413	4 053 418
24	TEMPS DE QUICK	4 701 310	20 710 947
25	FER SERIQUE	4 250 519	5 821 672
591	UREE	1 134 198	1 715 202

Figure 2 : Les examens de biologie médicale les plus fréquents et les plus coûteux (Chiffres : Biolam, 2013).

Les paramètres pour lesquels des méthodes de référence ont été validées au Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) sont surlignés en vert. Les paramètres pour lesquels une méthode de référence est en cours de développement sont surlignés en jaune. Les marqueurs pour lesquels il est envisagé de développer à l'avenir une méthode de référence sont surlignés en gris.

À l'échelle nationale, le LNE a déjà validé des méthodes de référence pour le dosage de la créatinine et de l'urée (diagnostic et suivi de l'insuffisance rénale) <sup>(3)</sup>, du glucose <sup>(4)</sup> et de l'hémoglobine glyquée HbA1c (dépistage et suivi

du diabète), de l'acide urique (diagnostic de la goutte), du cholestérol total <sup>(5)</sup>, du cholestérol-LDL, du cholestérol-HDL et des triglycérides (évaluation du risque cardiovasculaire). Ces méthodes ont été utilisées pour assigner des valeurs de référence à des échantillons de contrôle de qualité et pour caractériser différents matériaux de référence certifiés permettant d'évaluer la justesse des dosages réalisés en routine dans les laboratoires de biologie médicale <sup>(6, 7, 8, 9, 10)</sup>.

## L'impact médico-économique de la métrologie en biologie médicale

Différentes études ont montré qu'environ 15 % du PIB des pays développés sont dédiés aux activités de mesure et que 10 à 15 % des dépenses de santé sont liés aux mesures biologiques. Selon une étude européenne, les dépenses de l'industrie consacrées aux mesures, le coût des instruments, le coût de la certification dans l'industrie, mais aussi les investissements réalisés dans les laboratoires nationaux de métrologie et les laboratoires d'étalonnage accrédités représentent un coût de l'ordre de 13 milliards d'euros par an pour les secteurs suivants : nanotechnologies, industrie automobile, industrie pharmaceutique, secteur des gaz naturels, industrie des matériaux pour le diagnostic *in vitro* et contrôle des émissions et de la pollution dans l'environnement.

Ces dépenses engendrent des économies et des bénéfices directs s'élevant à 230 milliards d'euros <sup>(11)</sup>. Le retour sur investissement de la métrologie est donc important, comme le confirme une étude effectuée par le NIST (*National Institute of Standards and Technology* des États-Unis). Cette étude chiffre à 154 % la rentabilité pour la société et à 4,5/1 le retour sur investissement des approches visant à améliorer la fiabilité et la comparabilité des dosages à travers le raccordement métrologique des résultats <sup>(12)</sup>. La rentabilité pour la société tient compte des investissements effectués et des économies réalisées par l'industrie : coûts de transaction moindres, coûts inférieurs de mise en conformité avec les règlements, économies d'énergie, meilleure efficacité des activités de recherche et

(2) <http://www.ameli.fr/l-assurance-maladie/statistiques-et-publications/donnees-statistiques/actes-de-biologie-medicale/biolam-2013-2015.php>

(3) DELATOUR (V.), *RFM* 26(2), 2011, pp. 21-31.

(4) SAINT ALBIN (K.), *Clinical Chemistry Acta* 413 (23-24), November 20, 2012, pp. 1872-1878.

(5) HEUILLET (M.), *Clinical Biochemistry* 46(4-5), mars 2013, pp. 359-364.

(6) SAINT ALBIN (K.), *Clinical Chemistry Acta* 413 (23-24), 2012, pp. 1872-1878.

(7) DELATOUR (V.), *RFM* 26(2), 2011, pp. 21-31.

(8) PIERONI (L.), *Clinical Chemistry Acta* 412(23-24), 2011, pp. 2070-2075.

(9) BOUTTEN (A.), *Clinical Chemistry Acta* 419, 2013, pp. 132-135.

(10) BARGNOUX (A. S.), *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 140(2), 2016, pp. 117-118.

(11) WILLIAMS (G.), *The assessment of the economic role of measurements and testing in modern society*, 2002.

(12) Planning S (2000), *The Economic Impacts of NIST's Cholesterol Standards Program*: <https://www.nist.gov/document-17653>

développement, meilleure qualité des produits et capacité accrue d'accéder à de nouveaux marchés. Les études effectuées par Mayo Clinic, aux États-Unis, en recourant aux résultats des mesures de cholestérol effectuées sur 20 000 patients ont montré qu'une erreur de 3 % engendre une augmentation de 10 % du taux des diagnostics erronés. Ainsi, des erreurs apparemment minimales produisent, d'une part, des dépenses inutiles considérables, et ce, en pure perte, et, d'autre part, des erreurs de diagnostic ayant des conséquences sanitaires graves, et qui sont elles aussi à l'origine de dépenses supplémentaires.

Ainsi, le *Washington Post* et le *Medical Laboratory Observer* ont rapporté que 25 à 30 % des mesures liées à la santé sont effectuées pour des raisons autres que le diagnostic (répétition d'examen, prévention et détection des erreurs) <sup>(13)</sup>.

En Allemagne, le coût de la répétition des mesures est estimé à 1,5 milliard d'euros par an.

D'un point de vue sanitaire, un manque de fiabilité des résultats peut avoir des conséquences graves : dans le cas de faux négatifs, le patient ne sera pas traité et son état sera susceptible de se dégrader. Dans le cas de faux positifs, des traitements inutiles ou inappropriés risquent d'être mis en place, augmentant le risque de développer des maladies iatrogènes. Par ailleurs, le manque de données fiables dans le cadre d'études épidémiologiques et d'essais cliniques représente un frein à la compréhension des pathologies humaines et au développement de nouvelles thérapies. La valeur ajoutée de la métrologie en biologie médicale est donc évidente, mais de nombreux défis sont encore à relever en matière de développement de méthodes de référence et de production de matériaux de référence.

### **Les défis associés au développement de méthodes de référence en matière de dosage de biomarqueurs**

Alors que les méthodes utilisées en routine par les laboratoires de biologie médicale pour le dosage de biomarqueurs reposent essentiellement sur des techniques entièrement automatisées de type immuno-enzymatique ELISA ou de type enzymatique avec détection spectrophotométrique, les méthodes de référence reposent, quant à elles, quasi exclusivement sur des analyses associant la dilution isotopique à des techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (ID-GC/MS <sup>(14)</sup>, ID-LC/MS <sup>(15)</sup> et ID-ICP/MS <sup>(16)</sup>).

La dilution isotopique est une méthode quantitative de dosage d'éléments ou d'espèces dans un échantillon, par spectrométrie de masse. Elle consiste à introduire dans l'échantillon à analyser une quantité connue d'un étalon interne dont la structure est identique au composé d'intérêt, à cette différence près qu'un ou plusieurs atomes ont été substitués par un isotope stable lui conférant un incrément de masse connu et un comportement très proche du composé endogène. L'étalon interne est préférentiellement ajouté à l'échantillon au début de la procédure d'extraction afin de minimiser la variabilité associée aux

différentes étapes du protocole d'un dosage par spectrométrie de masse, telles que l'extraction des biomarqueurs d'intérêt, le volume injecté, les différences d'efficacité de l'ionisation et de la fragmentation dans la cellule de collision, et les effets de matrice. Contrairement aux méthodes analytiques traditionnelles, qui reposent sur la mesure directe de l'intensité du signal, la dilution isotopique repose sur la mesure du rapport entre le signal du composé endogène et le signal de son homologue marqué. En raison de ces deux avantages, la dilution isotopique permet de réduire les incertitudes de mesure à un niveau très faible et elle est considérée comme une méthode de référence primaire d'ordre supérieur.

L'analyse de métabolites est traditionnellement réalisée par ID-GC/MS et, de plus en plus fréquemment, par ID-LC/MS/MS.

Le dosage de métaux ou d'électrolytes est exclusivement réalisé par ID-ICP/MS, *via* une analyse élémentaire ou une analyse de spéciation.

Tandis que les composés de petite ou moyenne masse peuvent être analysés directement après une étape de purification, l'analyse quantitative de protéines par ID-LC/MS/MS repose en réalité sur le dosage de certains peptides protéotypiques résultant de la digestion de la protéine d'intérêt par une enzyme. L'étalon marqué alors préférentiellement utilisé est une protéine recombinante marquée afin que la protéine d'intérêt et l'étalon subissent exactement le même protocole, dont la digestion. Cependant, l'obtention et la caractérisation des étalons protéiques représentent une difficulté majeure, à la fois pour des raisons de coût et de faisabilité technique. C'est pour cette raison que des approches plus simples à mettre en œuvre sont souvent utilisées, comme le recours à des étalons peptidiques à la place d'étalons protéiques.

Dans le cas de protéines complexes (comme les anticorps monoclonaux chers à l'industrie pharmaceutique), leur taille, mais aussi, et surtout, leur importante hétérogénéité structurale rendent difficile la validation de méthodes de référence, en raison de limitations technologiques. Cependant, les progrès constants observés dans le domaine des sciences analytiques et séparatives (sensibilité, résolution, nouvelles techniques de purification et de préparation des échantillons) permettent d'envisager l'analyse de biomolécules d'une complexité croissante présentes en concentrations de plus en plus faibles dans les fluides biologiques <sup>(17, 18, 19)</sup>. Dans certains cas, en raison de la taille nanométrique de certains biomarqueurs, on assiste même

(13) <https://www.nist.gov/director/e-health-and-technology-empowering-consumers-simpler-more-cost-effective-health-care-system>

(14) Dilution isotopique associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

(15) Dilution isotopique associée à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

(16) Dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif.

(17) BROS (P.), *Frontiers in Neuroscience* 9:302, 2015.

(18) BROS (P.), *Clinical Chemistry Lab Med* 53(10), 2015, pp. 1483-1493.

(19) GONZÁLEZ-ANTUÑA (A.), *Journal of Proteomics* 112, 2015, pp. 141-155.

à une convergence des sciences bio-analytiques conventionnelles et des nanotechnologies. Ainsi, par exemple, certaines méthodes d'analyse avancées de lipoprotéines (transporteurs du cholestérol dans le sang) reposent sur des méthodes analytiques traditionnellement appliquées à l'analyse de nanoparticules, comme l'ES-DMA (*ElectroSpray Differential Mobility Analysis*)<sup>(20)</sup>.

### **L'importance de disposer de matériaux de référence certifiés et commutables**

La dissémination de la traçabilité apportée par les méthodes de référence d'ordre supérieur est principalement réalisée à travers les matériaux de référence certifiés. Ce raccordement métrologique, bien que nécessaire, est (hélas !) insuffisant.

Afin de ne pas rompre la chaîne de traçabilité métrologique, il faut impérativement que les matériaux d'étalonnage soient commutables à des échantillons natifs (c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des échantillons de patients) afin de s'assurer qu'ils ne génèrent pas d'effet de matrice pouvant être à l'origine de biais<sup>(21, 22, 23)</sup>. De manière similaire, les échantillons de contrôle qualité servant à évaluer la justesse des méthodes de routine doivent également présenter un niveau de commutabilité suffisant<sup>(24)</sup>. En effet, l'écart observé entre les résultats d'une méthode de référence et ceux d'une méthode de routine, pour un échantillon donné, correspond en fait à la somme du biais dû à la méthode et du biais engendré par les effets de matrice induits par l'échantillon. Ainsi, les sérums lyophilisés (abondamment utilisés en raison de leur coût réduit et d'une stabilité permettant de les expédier à température ambiante) génèrent très souvent des résultats biaisés (vers le bas), et ce, même pour une méthode ne présentant pas de défaut de justesse, ce qui peut ainsi conduire à une interprétation erronée des résultats.

Pour évaluer rigoureusement la justesse des méthodes de routine, il faut donc s'assurer que les échantillons de contrôle sont commutables, c'est-à-dire qu'ils n'engendrent pas d'effet de matrice susceptible de fausser l'interprétation des résultats. Pour cette raison, l'ANSM a organisé fin 2016 une opération du contrôle national de qualité des examens de biochimie médicale ayant reposé sur des matériaux de référence certifiés et commutables. Cette approche marque une évolution importante dans le contrôle qualité en France, car elle permet de réduire les risques d'interprétation erronée des résultats et d'évaluer plus finement les performances des méthodes de dosage utilisées dans les laboratoires de biologie médicale.

### **En perspective, une nécessaire évaluation des autotests**

Une évolution importante des outils de diagnostic réside dans la démocratisation des *Point of care tests*, tels que les lecteurs de glycémie. Ainsi, si les dosages de glycémie permettant d'assurer le suivi des patients diabétiques continuent de s'effectuer *via* des examens en laboratoire, ils relèvent aujourd'hui principalement de l'autosurveil-

lance. En France, le marché des systèmes d'autosurveillance de la glycémie (qui représente 95 % du marché français des autotests) était évalué à 350 millions d'euros en 2013. Il a été estimé que la non observance glycémique représente un coût global compris entre 2 et 9,3 milliards d'euros par an et qu'elle induirait 1 million d'hospitalisations et près de 8 000 décès par an.

Il est donc attendu qu'une mauvaise surveillance glycémique ait des conséquences moindres, mais toutefois considérables.

Or, différentes études indiquent que la fiabilité des lecteurs de glycémie est insuffisante. Des études réalisées aux États-Unis ont montré que seuls 14,67 % des lecteurs de glycémie évalués respectent les critères de performance de la norme ISO 15197:2013 (avec un biais maximum de 15 %).

Par ailleurs, des études réalisées en Allemagne montrent que la comparabilité entre les résultats obtenus avec différents dispositifs est très perfectible, suggérant ainsi que la fiabilité et la comparabilité des résultats fournis par les lecteurs de glycémie doivent être améliorées et régulièrement contrôlées.

À cet effet, le décret n°2016-46 du 26 janvier 2016 relatif à la biologie médicale prévoit de vérifier la cohérence entre les données produites par ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* avec le résultat des examens réalisés en laboratoire de biologie médicale<sup>(25)</sup>. Le résultat de mesure d'un test nécessitant un dispositif médical de diagnostic *in vitro* est dit cohérent avec le résultat de l'examen de biologie médicale correspondant, lorsque les deux résultats sont identiques ou lorsque la différence entre les deux valeurs génère des adaptations thérapeutiques qui restent identiques. Afin d'évaluer et d'améliorer la fiabilité des lecteurs de glycémie, le développement de matériaux de référence commutables est nécessaire, car, à ce jour, aucun matériau de référence satisfaisant n'est disponible pour cette application.

### **Conclusion**

L'apport de la métrologie est essentiel à l'évaluation et à l'amélioration de la fiabilité et de la comparabilité des examens de biologie médicale. Les développements technologiques et méthodologiques en cours permettront dans un proche avenir de développer des méthodes de référence et des étalons internationaux qui contribueront à fiabiliser l'analyse de biomarqueurs complexes pour lesquels il existe un véritable besoin de standardisation.

(20) GUHA (S.), *Trends Biotechnol* 2012;30(5) 1, 2012, pp. 291-300.

(21) ZEGERS (I.), *Clinical Chemistry* 59(9), 2013, pp. 1322-1329.

(22) MILLER (W. G.), *Clinical Chemistry* 52(4), 2006, pp. 553-554.

(23) MILLER (W. G.), *Clinical Chemistry* 59(9), 2013, pp. 1291-1293.

(24) MILLER (W. G.), *Clinical Chemistry Acta* 327(1-2), 2003, pp. 25-37.

(25) [https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/1/26/2016-46/jo/article\\_1](https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/1/26/2016-46/jo/article_1)