

DU de Qualité

Vérification / Validation des méthodes qualitatives

*Catherine KAUFFMANN-LACROIX,
CHU de Poitiers*

Définition d'une méthode qualitative

Présence ou absence d'un analyte

catégorie d'examens où aucune mesure d'une donnée quantifiable ne peut être déterminée par opposition à une méthode quantitative mesure continue définie selon norme ISO 5725

Une méthode qui ne mesure pas de façon continue un résultat: il est obtenu par l'observation de la réaction ou par comparaison avec des témoins positif et négatif

- ✓ Microbiologie : examens microscopiques, cultures, identification
 - ✓ Parasitologie: recherche de parasite et identification
 - ✓ Sérologies unitaires: western-blot, agglutinations ...
 - ✓ Hématologie : groupes sanguins, cytologie
- ✓ **Les méthodes dites semi quantitatives sont à reclasser**
- ✓ soit en qualitative s'il y a une interprétation par rapport à un seuil
 - ✓ résultats positif/ négatif
 - ✓ résultats sous forme de titre VDRL, TPHA
 - ✓ soit en quantitative
 - ✓ méthode par technique automatisées comme ELISA, ECLIA ...

Chaque fois qu'une nouvelle procédure est mise en place validation de la méthode d'analyse par le laboratoire et non par le fournisseur

- Tests indépendants
- Les résultats obtenus sont examinés par le personnel habilité et font l'objet d'un enregistrement rapporté en annexe du dossier de VM
- L'évaluation de l'incertitude de mesure par calcul est non applicable pour la validation d'une méthode qualitative => **l'analyse de risque d'erreur avec la méthode des 5M est essentiel**
- Attention si méthodes manuelle **et** automatisée 2 lignes de portée différentes + comparaison *exple ECBU voir Quamic*
 - ✓ même dossier de validation nouveau formulaire SH FORM 43
 - ✓ 1 validation de méthode / ligne de portée en principe SH REF 50 = sous processus



Définitions: Vérification / Validation

Portée d'accréditation de type **A**

en cas d'utilisation de méthodes

1. reconnues et publiée dans un journal scientifique (*)
2. reconnues proposée par un fournisseur et mise sur le marché (**)
la validation des méthodes utilisées par le LBM est réduite à une
« vérification sur site »

pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail en routine

- * Importance des références biblio en fin de dossier
- * * méthode DM-DIV dispositif médical de diagnostic in vitro donc marquée CE ou méthode faisant l'objet de publications internationales validées, norme
- L'emploi d'une méthode ayant le marquage CE est recommandé
- Le **marquage n'est pas obligatoire à condition de prouver que la méthode choisie est** supérieure à celle existante possédant le marquage CE par une validation => portée de type B et une comparaison de méthode



Définitions: **Validation**

Portée de type **B**

Une validation appropriée doit être réalisée en cas de méthode :

- ✓ **non normalisée,**
- ✓ **commercialisée n'ayant pas le marquage CE**
- ✓ **conçues ou développées par le laboratoire,**
- ✓ **normalisée et utilisée en dehors du domaine d'application prévu**
- ✓ **méthode validée puis modifiée**
 - ✓ **modification sur un réactif , un prélèvement ou un appareil**

Concernant les méthodes et les réactifs, des écarts aux méthodes sont acceptables s'ils sont : documentés, validés, justifiés techniquement et autorisés

Validation de méthode qualitative: 3 étapes

1. Réunir les ressources utiles :
 - ✓ Documents de référence, référentiels
 - ✓ Mise en place d'un Cqi
 - ✓ Choix du Cqe ou mise en place d'un CIL
 - ✓ Comparaison de techniques
2. Mise en conformité du processus analytique grâce à l'analyse de risques / gestion de la portée flexible



3. Remplir le dossier COFRAC



Documents de référence, référentiels

Normes

NF EN ISO 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale Exigences particulières concernant la qualité et la compétence v 2012

NF EN ISO 17025 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais

- **Guides techniques COFRAC** www.cofrac.fr
 - **SH REF 02** Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.
 - **SH GTA 01 Guide Technique d'Accréditation en biologie médicale**
 - **SH GTA 06** Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale
 - **SH GTA 04** : Guide technique de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes en biologie médicale
 - **SH FORM 43** : Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale
- **Bibliographiques** car il est difficile de disposer de tous les échantillons pathologiques pour valider la méthode
- **Recommandations** société savantes, HAS, conférence de consensus ...
- **Règlementaires**
 - Normes: recherche de *Legionella pneumophila* ,
 - Décrets spécifiques à l'analyse: groupes sanguins, diagnostic anté-natal , IgG et IgM sérologie de la toxoplasmose ...

SH FORM 43



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Note : le laboratoire se réfère au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera une fiche par examen de biologie médicale

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) :
.....

Processus simple ; Processus complexe (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Sous-processus 2	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Sous-processus ...		

Pour chaque étape, le laboratoire procédera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu à minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, à minima.

Les types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

SOUS-PROCESSUS 1 : titre

Portée A ; Portée B (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte / Mesurande :	Cf. §G.2.2. du SH GTA 04
Principe de la Méthode :	Cette information est retrouvée sous le terme de « principe général des techniques » dans le SH INF 50 (colonne « principe de la méthode »)
Type d'échantillon primaire :	Préciser la matrice : urine, sang total, serum, plasma, ADN, tissu congelé/fixé ...
Type de récipient, additifs :	Préciser le type de contenant : tube/additif/présence ou non d'un séparateur, flacon/milieu de transport, écouvillon...
Prétraitement de l'échantillon :	Modalités de prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, acidification, alcalinisation, extraction ...)
Unités :	Mode d'expression du résultat (unités, ratio, ...)
Critères d'interprétation* :	Intervalle de référence : origine et définition par critères démographiques ; valeurs seuils, ...
Marquage CE (Oui/Non) :	Marquage CE (Oui/Non)
Codage C.N.O. (s'il existe) :	Consulter le site de ANSM
Équipement (instrument, analyseur, etc.) :	marque, modèle, référence
Référence du réactif :	référence fournisseur, version notice
Matériau d'étalonnage (références) :	Raccordement métrologique
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Type d'étalonnage (linéaire, non linéaire), préciser le nombre de niveaux et les valeurs des niveaux

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	identité de l'opérateur
Procédure de validation/mode opératoire :	référence et version de la procédure utilisée
Procédure de gestion de la portée flexible :	référence et version de la procédure utilisée
Période d'étude :	Préciser Du : xx/xx/xx au xx/xx/xx Préciser si reprise des résultats antérieurs
Date de 1 ^{ère} utilisation :	préciser xx/xx/xx (mise en route de l'automate)

* Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

SH FORM 43

Quantitatif

- Analyse des risques 5M
- Cqi
 - Répétabilité
 - ReproductibilitéImportance des CV limite (alerte, action)
- Cqe
 - Importance des CV du groupe de pairs des CQe
 - Calcul incertitude des mesures

Qualitatif

- Analyse des risques 5M
- Répéta et repro pas utile
- Cqi / Cqe
- Variabilité inter opérateur
- Comparaison de méthodes

Exple diagnostic du Paludisme 3 ou 4 sous processus:

1. Identification des hématozoaires (genre et espèces)
2. Numération des hématies parasitées
3. Ag Plasmodium
4. Goutte épaisse



Analyses qualitatives

**L'évaluation de l'incertitude de mesure
par calcul est non applicable**



Procéder à une analyse de risque

- 1. identifier les facteurs influençant le résultat notamment par une **biblio** pertinente**
- 2. montrer comment les facteurs d'influence significative sont maîtrisés**
compétence des personnels, surveillance des réactifs et matériels
Gestion documentaire : état de l'art
- 3. justifier l'influence non significative de certains facteurs**
- 4. Inscrire toutes ces informations dans le tableau**

Enregistrement des preuves dans le dossier

Ce dossier apporte les éléments de vérifications suivants :

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<i>Spécificité analytique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Sensibilité diagnostique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Robustesse</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Comparaison avec méthode de référence</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si existe)</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire¹¹</i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>

Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹² de la méthode ou du système analytique.

L'évaluation des critères de spécificité et sensibilité est à réaliser en utilisant par exemple des échantillons de sérum (sérothèque) ou des Contrôles Internes de Qualité de caractéristiques connues.

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité		Formation et information du personnel	Procédure d'identité/vigilance du laboratoire
	Préparation du patient		Information des patients et préleveurs	Instructions de prélèvement
	Type de contenants		Formation des préleveurs	Instructions de prélèvement
	Nature et volume de l'échantillon		Contrôle à réception	Critères d'acceptation/de refus
	Délai et température avant traitement analytique		Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	
	Prétraitement : centrifugation, ...		Conditions de centrifugation, ...	Critères de centrifugation
Milieu	Interférences		Formation des préleveurs Contrôle à réception	Instruction de formation du personnel
	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)		Métrie/suivi des enceintes	Instructions de conservation Enregistrements métrologiques
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)			
Matériel (équipements)	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur		Conditions environnementales (statiques et/ou dynamiques dans le temps) Lecture à la lumière du jour	Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur Enregistrements des conditions environnementales
	Qualité de l'eau		Mesure de la résistivité / stérilité	Traçabilité des vérifications
Matériel (équipements)	Surveillance des dérives		Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...)	Enregistrements des maintenances Traçabilité métrologique, CIQ/EEQ
	Contamination		Respect des conditions opératoires du fournisseur	Bibliographie et/ou enregistrement de l'essai sur site
Matériel (équipements)	Informatique embarquée		Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ...	Enregistrements des jeux d'essai

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation		Métrie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Fiches fournisseur Traçabilité métrologique
	Gestion des stocks		Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison)
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles		Métrie des pipettes Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)		Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité	Voir SH GTA 04 §9.6.1.7
	Causes d'incertitude de mesure		Calcul des incertitudes de mesure (non quantifiable pour les méthodes qualitatives)	Voir SH GTA 04 §9.6.1.5
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel		Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure (par exemple tests à lecture subjective)	Enregistrements des compétences du personnel Traçabilité de l'occupation des postes de travail

Indiquez les points critiques et les actions en clair + PR ou MO possible mais lors de l'expertise l'évaluateur ne l'a pas toujours

Portées : SH INF 50 et Validation SH FORM 43

Diagnostic du paludisme

sous domaine parasitologie et immuno séro infectieuse

- PM 7 - Frottis goutte épaisse
- IB 3 – Antigène (PM7palu)
- PM6 - PCR

Diagnostic du paludisme

Différents sous processus techniques

- Frottis sanguin
- Goutte épaisse
- Ag
- PCR, CNR

Examen mycologique

sous domaine parasitologie

- PM1 + PM2 ED+ ensemencement
- PM3 Hémoculture
- PM4 Identification phénotypique
- PM6 PCR ou séquençage
- PM8 Antifongigramme

Mycologie

Différents sous processus techniques

- ED : état frais, potasse, calcofluor
- Ensemencement ≠ prélèvements ,
- Identification: galerie, spectro, corrélation des méthodes
- Antifongigramme
- Souchothèque

Exple de Rapport
d'expertise sur le
dossier de VM
Parasitologie des
selles

DESCRIPTION DE LA METHODE

Satisfaisant Non satisfaisant (à justifier)

Commentaires

**Absence nom de fournisseur du coffret commercialisé et
Absence de méthode de concentration désignée : difficile à expertiser**
La procédure organisationnelle d'un processus délicat est réellement manquante.

MISE EN ŒUVRE

Satisfaisant Non satisfaisant (à justifier)

Commentaires

Variabilité inter opérateur sur les EEQ 2015 pour 4 opérateurs dont les grades ne sont pas mentionnés

MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée, Points critiques à maîtriser, Modalités de maîtrise

Satisfaisant Non satisfaisant (à justifier)

Commentaires

Préanalytique

- aucune précision sur les conditions de recueil et de transport.
- aucune preuve qu'une forme végétative d'*E. histolytica* sera retrouvée après son voyage de plusieurs centaines de km avant d'arriver au site technique...
- Recueil des informations épidémiologiques ?

Analytique :

- choix des méthodes de concentration ? y en a-t-il bien 2 ? limites ?
- aucune information sur l'importance de l'examen direct à l'état frais. La lecture des examens peut être différée à 48h après l'émission : pourquoi et comment ?
- il est fait mention de CQi n'apparaissant pas dans PR11PR09, lesquels ? fréquence de passage ?
- raccordements / étalonnage lesquels ?

Post analytique

- Interprétation des discordances entre les 3 techniques ?
- Transferts informatiques cités

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Répétabilité, Fidélité intermédiaire, Variabilité inter-opérateurs, Justesse, Exactitude, Sensibilité et spécificité analytique

Satisfaisant Non satisfaisant (à justifier)

Commentaires La conformité des EEQ ne garantit en aucun cas les performances des méthodes de concentration



**Préalablement à la validation,
le laboratoire fixe les critères de performance
et les limites acceptables
correspondant aux besoins de ses clients**

Ce choix est :

- Du ressort du biologiste
- Le reflet de l'état de l'art et la pertinence clinique:
- Recommandations HAS, Sociétés savantes,
- Conférences de consensus, publications scientifiques...

- ✓ **Dans le cadre du fonctionnement normal du labo,**
 - ✓ **réalisation de la vérification continue et**
- ✓ **confirmation des performances selon une procédure établie**

Exemple : paludisme règle = NABM ; en pratique plusieurs techniques 2 ou 3 dont on doit prouver qu'elles sont équivalentes en terme de sensibilité exple la goutte épaisse

**Le dossier de validation comporte une conclusion:
aptitude ou inaptitude de la méthode et un signataire**

Pour une méthode qualitative

Comparaison de méthode avec

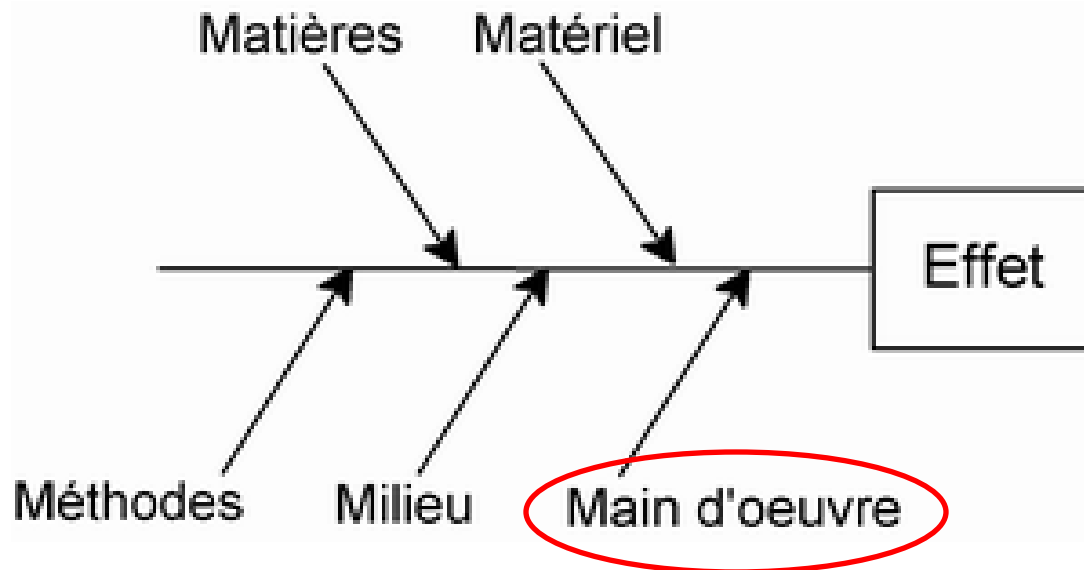
- la méthode de référence , méthode précédente
- autre méthode : manuelle , garde, back-up, centre de référence ...

Recommandé +++

car c'est bien une preuve de la qualité de votre analyse

5M

Les étapes préalables à la vérification/ validation selon la méthode des 5 M



- Diagramme d'Ishikawa développé en 1943 pour la gestion de la qualité ou diagramme en arête de poisson
- Outil permettant d'identifier les causes possibles d'un problème ou un défaut (effet), et d'agir sur celles-ci en mettant en place des actions correctives pour résoudre ce problème

Main d'oeuvre

- Diplômes, Qualifications
- Procédure: qui fait quoi? quand? En lien avec organigramme fonctionnel du labo
- **Habilitation**
 - Qui ? TOUS techniciens et biologistes
 - Comment ?
 - Découpage de chaque poste en différentes tâches
 - Procédure d'habilitation
 - Les Personnels en formation doivent être supervisés
 - Enregistrements des compétences et des acquis au cours du temps dans un dossier individuel (preuves tangibles / résultats en double avec tuteur)
 - Programme de formation : efficacité évaluée périodiquement , formation qualité
 - Maintien des habilitations : *comment ? EEQ , nombre de jours au poste ?*

Preuves du maintien des compétences + DPC développement professionnel continu

 - Procédure de réhabilitation en cas d'absence prolongée > 6 mois
 - Validation méthode manuelle comparer les résultats des techniciens entre eux *exple ECBU / numération plasmodiums*
- **Planning et matrice des compétences respectée lors des absences**

Matériels, Métrologie

SH GTA 01

- Inventaire, cahier de vie , Procédures achat , réception , MO de l'appareil et des maintenances
- Raccordement à l'étalon international **évaluer la criticité**
 - Appareil non critique doit être **étalonné /contrôlé** selon périodicité précise
 - Microscope et micromètre oculaire; réfrigérateur post analyse des prélèvements
 - Appareil **critique** : Prestataire extérieur ou en interne matériel certifié **raccordé** - accréditation norme 17025
 - Enceinte thermostatée sonde tous les ans et cartographie tous les 5 ans, conserver le certificat de la sonde de référence qui assure le raccordement au SI
 - Balances 3 ans
 - Centrifugeuse contrôlée avec tachymètre raccordé (certificat),
 - pH mètre étalonné solutions raccordées ...

attention à la cohérence des choix effectués : exple centri /vitesse en g; température des congélateurs ...=> documentés
- Enregistrement des Maintenances
 - Elles doivent respecter les recommandations du fournisseur ... cf manuel de l'appareil
 - Planning de maintenances préventives
- Procédure et Appareil de remplacement
 - Désigné en cas de panne
 - Mode opératoire pour l'analyse occasionnelle
 - Test de validation de méthode et comparaison avec l'appareil de routine pour la qualification de l'appareil

Adapter la métrologie mise en œuvre aux besoins du laboratoire / notion d'équipement "critique"

SH GTA 01

- Les besoins du laboratoire sont déterminés à l'aide d'une **analyse de risque**
 - La stratégie est de ne pas raccorder métrologiquement tous les équipements et grandeurs du laboratoire, mais seulement ceux qui ont une influence sur le résultat dits critiques
- Equipements **analytiques**
 - matériaux de référence pour la métrologie analytique,
 - étalons fournisseurs ("calibrants"),
 - souches de références,
 - **étuve en mycologie ...**
- Après avoir recensé les équipements nécessitant un raccordement au système de mesure international et un suivi métrologique, il définit aussi ses exigences métrologiques : écarts maximum tolérés ou EMT
 - niveau d'incertitude
 - plages d'utilisation pour les différentes grandeurs et équipements critiques
 - **par exemple, pour la température d'incubation des milieux, 36 +/- 1,5° C, l'EMT est de 1,5° C**
- équipements intermédiaires
 - réfrigérateurs pour la conservation des réactifs 5° C +/-3° C
 - conditions de réalisation dans certains cas: température ambiante, centrifugeuse

T° Critique

Métrologie des enceintes thermiques étuve, réfrigérateur ... Vérification de leur conformité

Enregistrement des températures /sonde

- Sonde adaptée à la température de l'enceinte frigo ≠ étuve
- + EMT Surveillés en continu (manuelle ou logiciel)
- + Etalonnage annuel de la sonde de température



CONSTAT DE VERIFICATION N° V16VT178

Tableau des mesures / Conditions de la vérification :

Nom de l'intervenant : VT/FMAL
Date des mesures : 10/03/2016

Conditions d'environnement :
Température : Entre +5°C et +35°C
Humidité : < 90 %Hr
Pression atmosphérique : de 900 mbar et 1060 mbar de 150 et 253 V
Tension Secteur :

Immersion	TEMPERATURE (°C)					
	Moyenne des températures étalons (T _{étalons})	Moyenne des valeurs lues (T _{lueses})	Ereur (T _{lueses} - T _{étalons})	Incertude élargie (±)	E.M.T. (±)	CONFORMITE C / NC
Totale	30,020	30,01	-0,01	0,14	0,30	C
Totale	37,013	37,00	-0,01	0,13	0,30	C
Totale	49,961	49,95	-0,02	0,14	0,30	C

- contrôle des alarmes et des graphes nécessaires 1 fois/ mois

Pipettes



les pipettes à piston volumétrique, « doivent être périodiquement et efficacement inspectées, nettoyées, entretenues et vérifiées selon une procédure
Décontamination : Bactéricide, Virucide, Dnasa , Rnase

- 3 niveaux de mesure
 - x 10 fois
- Différents % erreur tolérée selon le volume

En cas de non conformité :

Analyse d'impact /plan d'action voir refaire toutes les analyses effectuées pendant la période allant jusqu'à la précédente maintenance

Exple : Pipette > 10 μ L + balance raccordée peut être effectué en interne
<10 μ L société extérieure
Dans tous les cas vérifier les comptes rendus

Méthode

- **Organisation**

- *Procédure*: qui ? fait quoi ? quand ?
- *Mode opératoire*: comment ? à la paillasse
- **Importance de l'analyse des risques d'erreurs dans le processus analytique parfois 5M pour chaque étape**
pré stabilité des analytes , analytique , post analytique : souchothèque ...
- en combien de temps: vérification des délais annoncés / analyses / diagnostic vital des urgences
- le jour / en garde (si méthode différente => 2 dossiers)

- **Listes** des appareils, des réactifs, consommables nécessaires

- **Comparaison** avec une autre technique pour la validation pour prouver la compétence du LBM (si c'est possible)

- Positionner votre méthode par rapport à la méthode de référence
exple: paludisme en frottis mince et Ag circulant

Milieu

- **Températures**

- Pendant le transport des prélèvements T° ambiante / 4°C
- Dans le labo attention l'été / réactifs recommandation du fournisseur



- **Pressions**

- enregistrement journalier pour les labo spécialisés microbio P2/ P3



- **Autres**

- Selon l'analyse, les sources de contamination devront être identifiées et la maîtrise de l'environnement prouvée: eau , stabilité des réactifs exposés au soleil , microbiologie / immuno sérologie

Matières : échantillon

Qualités de l'échantillonnage ?

Si le prélèvement doit attendre ou en cas de repasse vérifier les conditions de conservation dans le temps

- selon différentes températures
- en tube primaire, secondaire (sur gel ou décanté) , sur écouvillon ...

Exple ECBU, Parasitologie des selles ...

Matériels : réactifs

- Inventaire / lieu de stockage
- Fabrications ? Fiche de fabrication et de contrôles
- Organisation de la **Veille documentaire ?** minimum annuellement
 - Exple Fiche du kit version à jour , breakpoint nv ATB antibiogramme ...
- **Contrôle des lots de réactifs avec des CIQ**
 - Organisé
 - Enregistré => traçé (fréquence à choisir par le biologiste)
 - Certificat de fabrication milieu de culture est-ce suffisant ?

en attendant les recommandations/ décrets en principe oui si les souches CQI sont passés suffisamment souvent cf Société Française de Microbiologie
- **Réactovigilance** responsable , procédure ...
- **Évaluation annuelle des fournisseurs** (cf revue de direction/ NC)



réactifs CIQ

pour chaque méthode

un contrôle de qualité interne commercialisé ou fabriqué maison

- **Positif et négatif** pour la vérification/ validation
- **Fréquence choisie par le biologiste** selon son activité
 - lors de la livraison de chaque lot de réactif
 - 1 / jour, semaine, 1 ou 2/ mois,
 - 1 ou 2 fois par série ...
- **Microbiologie** Souches de référence adaptées
 - couvrant l'ensemble des possibilités diagnostiques
 - choix pertinent (souches S et R pour les antibiogrammes, ATCC)
- **Sérologie** pools de sérums (stérilisés filtration 0.22 μm , aliquotés , congelés)
 - niveaux fort, faible (% détectabilité), négatif
-
- *Ce n'est ni le témoin, ni un calibrateur du coffret*
- *Dans certains cas il peut- être contrôlé par une autre méthode / groupe sg*
- *Il peut être fabriqué maison*

réactifs CIQ



Le CIQ contrôle en continu

- la reproductibilité et
- la justesse

Apporter toutes les preuves nécessaires pour que auditeur et clients aient confiance dans la qualité de l'organisation et des résultats

Réactifs et CEQ

Choisir un fournisseur de programmes EEQ adapté aux différents sous processus

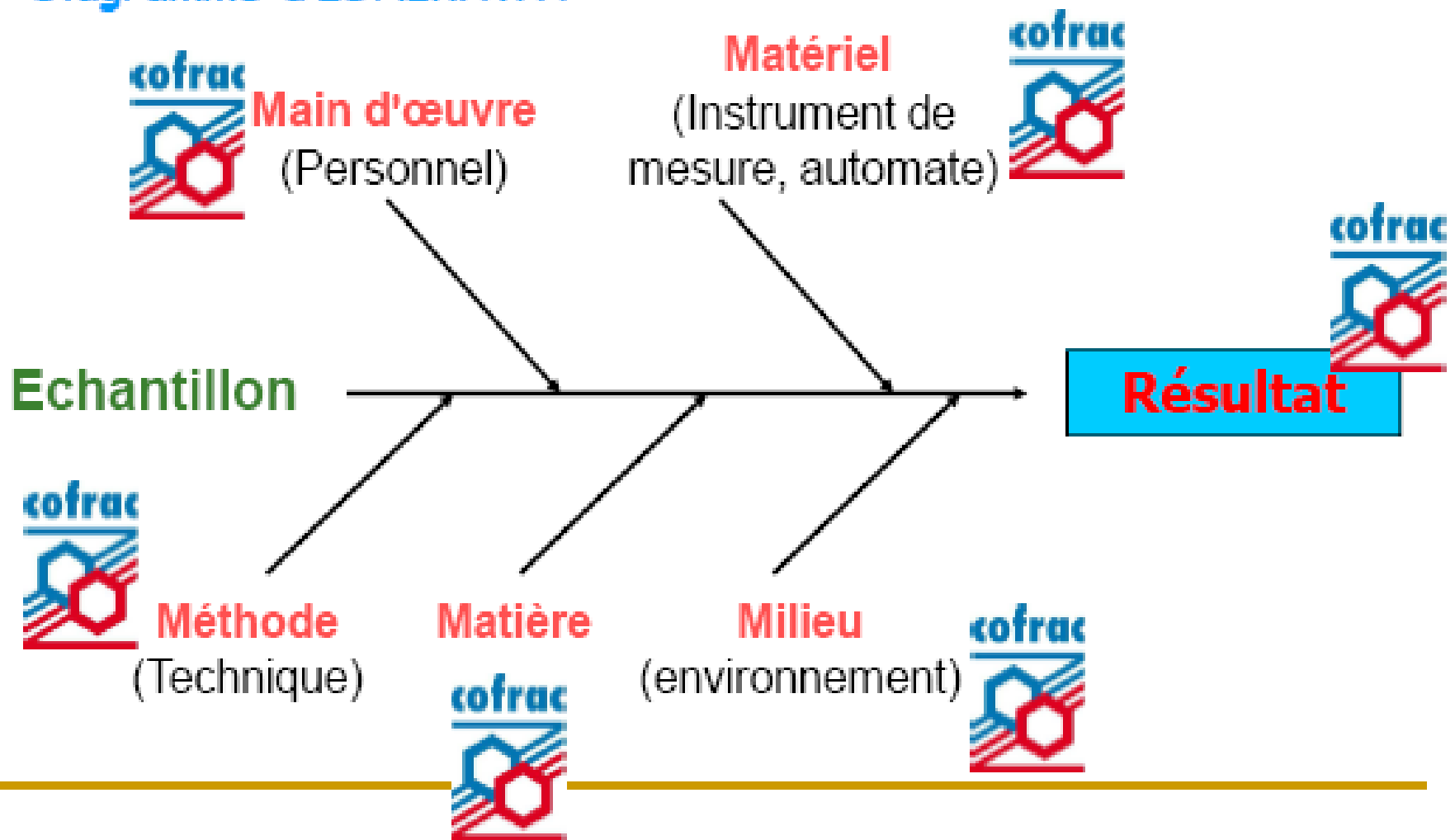
Permet de s'évaluer par rapport aux autres laboratoires $\leq 4/$ an

- **Un fournisseur français ou européen** (UKNEKAS, labquality) **voir à l'international** accrédité de préférence mais pas encore obligatoire
 - Adapté aux différents sous processus
 - Exple Paludisme lame non colorées de préférence
 - Fréquence choisie par le biologiste /nombre suffisants
 - Évaluation revue chaque année dans la revue de direction
 - Exple choix de LBQ selles car Cryptosporidies + ; en 2016 que des échantillons négatifs
 - CIL obligatoire si pas d'EEQ: entre différents labo CHU, même groupement, même ville ...
 - Programme EEQ en France ou en Europe autre ...à envisager selon impact de l'accréditation
 - parasites animaux par exple
 - Importance du traitement des résultats
 - ✓ indicateur qualité
 - ✓ **maintien des habilitations du personnel**
 - ✓ **Pourrait donner lieu à retrait d'accréditation s'ils sont mauvais** Article L. 6221-9 et Arrêté du 1er août 2016. vendredi 16 décembre 2016. Critères de signalement pour les **contrôles** de la **qualité** des résultats des examens de **biologie** médicale.



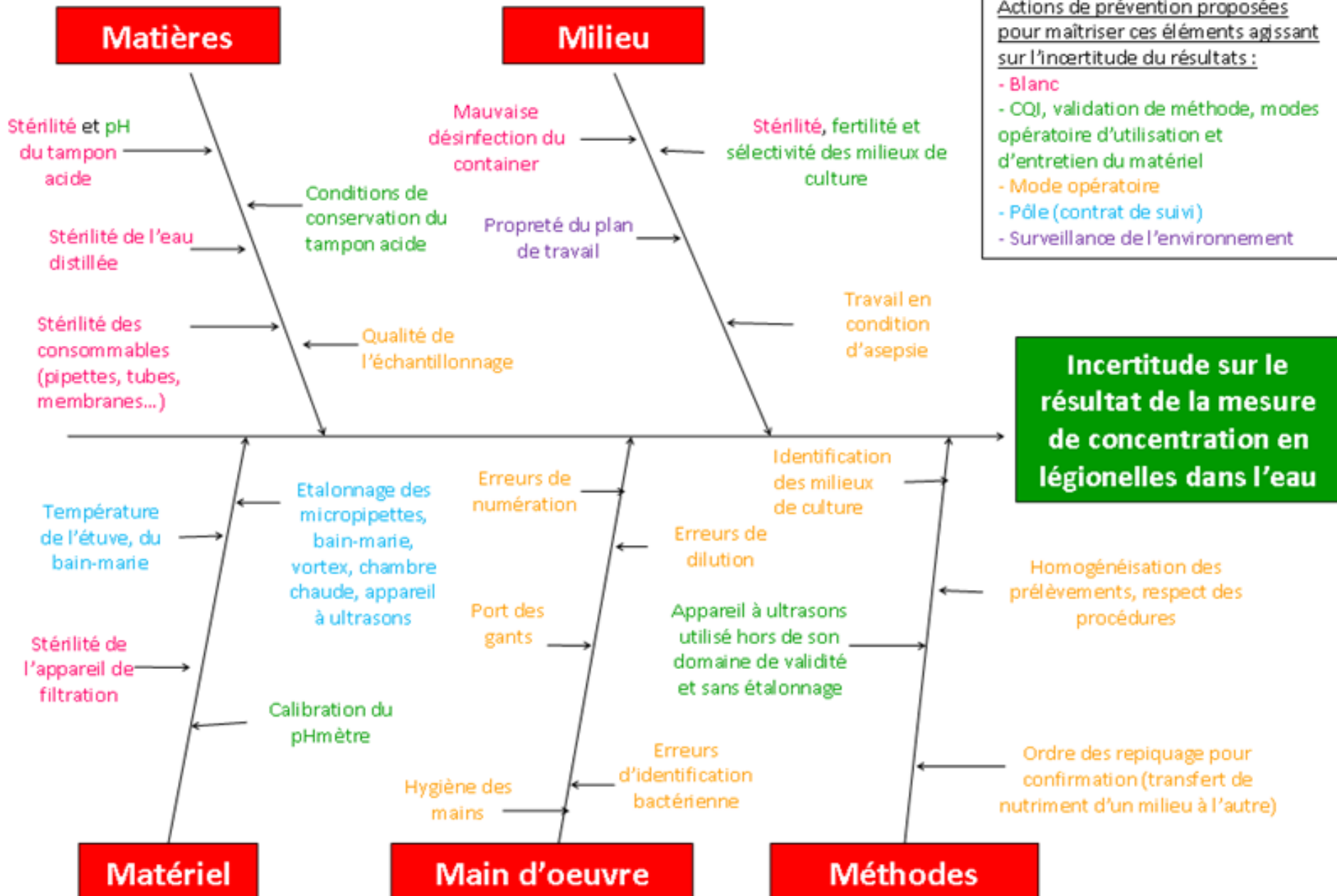
Méthodologie de mise en conformité

Diagramme d'ISHIKAWA



Examples

Recherche de *Legionella* facteurs pouvant influencer les résultats



AMDEC : analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité

ETAPE*	Défaillance*	Effets*	Causes*	Niveau de criticité*				Actions de prévention* (prévues ou à prévoir)*
				G- Gravité*	F- Fréquence*	D- Détectabilité*	C- Criticité*	
ANALYTIQUE--DEFAILLANCES COMMUNES*								
Ensemencement - culture*	Identification des milieux*	Inversion de géloses correspondant à des échantillons différents ; résultats non cohérents*	Erreur humaine*	3*	1*	4*	12*	HYGI-RH-DF-001 (Fiche d'habilitation)* Etiquetage des géloses*
	Ensemencement sur milieu non adapté ou non conforme à la norme*	Résultats hors accréditation (non valide car mauvais milieu)*	Erreur humaine*	3*	1*	2*	6*	HYGI-ANA-MO-015* HYGI-RH-DF-001*
	Géloses non stériles*	Flore interférente*	Contamination de la gélose* Erreur fabricant* Erreur humaine*	3*	2*	5*	30*	- Certificat de stérilité du fabricant* - 1 blanc à chaque trimestre*
Traitements thermiques* et acide*	Non respect du temps de contact*	Flore interférente* Sur ou sous-estimation*	Erreur humaine* Défaut du chronomètre*	2*	2*	3*	12*	Chronomètre vérifié* HYGI-ANA-MO-015*
ANALYTIQUE--DEFAILLANCES PARTICULIERES*								
Ensemencement direct*	Cas des eaux sales* ; Erreur de dilution*	Lecture impossible (flore interférente ; concentration trop élevée...)*	Erreur humaine*	2*	2*	4*	16*	HYGI-RH-DF-001 (fiche d'habilitation)* HYGI-ANA-MO-015*
Concentration par filtration*	Erreur de quantité filtrée *	Sur-estimation ou sous-estimation quantitative*	Erreur humaine*	3*	2*	3*	18*	HYGI-RH-DF-001 (fiche d'habilitation)* HYGI-ANA-MO-015*
	Manipulation non conforme de la membrane (avant ou après filtration) *	Flore interférente*	Erreur humaine* Absence de passage de la pince dans la flamme*	2*	2*	4*	16*	HYGI-RH-DF-001 (fiche d'habilitation)* HYGI-ANA-MO-015*

Exemple recherche de mycobactéries

comment le laboratoire exerce-t-il en interne la surveillance de la qualité de ses résultats (C.I.Q., vérifications, matériaux de référence) ?

contrôles externes de qualité : programmes de comparaisons inter laboratoires, et exploitation des résultats

C.I.Q.

- pour l'examen direct: souche non pathogène journalière / chaque microscopiste
- pour les cultures en milieux liquide et les antibiogramme en méthode automatisée (journalier) et les milieux solides (mensuel)
- souches de références ATCC ou souche de malade
- contrôle de la qualité des solutions antibiotiques fabriquées maison par comparaison à un antibiogramme fournisseur (journalier)

CONTRÔLES EXTERNES DE QUALITÉ : CULTURE ET ANTIBIOGRAMME PAR CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

- Contrôle National AFSAPPS
- UKNEQAS trimestriel

CONTRÔLES INTERLABORATOIRE

- Participation à l'observatoire régional organisé par le CHU

DIAGNOSTIC DU PALUDISME – URGENCE VITALE

MATIERES°:¶
prescription-et-prélèvement¶

MILIEU¶

2·tubes¶
_ Sang·total·sur·EDTA¶

-Information·épidémiologique¶
Pays·visité·;·date·retour·¶
Pays·d'origine·¶
-Traitements°:¶
prophylactique·/curatif·¶
-Heure·du·prélèvement¶

Températures¶
conservation·des·échantillons·sg·à·
4°C·PCR¶
puis·congélateur·¶
¶
Stérilité·des·manipulations·avt·PCR·
si·1·seul·tube·¶

**RESULTAT·
URGENT·¶**
<·2heures¶

Frottis·sanguin·coloré·au·MGG¶

Antigène·test·rapide¶
immunochromatographie¶

Habilitations°Personnels:¶

Formation·théorique·et·pratique¶
Frottis·;·lecture·lame·inconnues·¶
Numération·;·hématies·parasitées·¶
Conférence·de·consensus¶
Maintien·Habilitation·/·CQE·¶

Réactifs·
Colorants·¶
CQi·maison¶
Kit·Ag·rapide¶

Colorateurs·Hémato¶
Microscope·optique¶

Pipettes·-·cônes¶

Extracteur·automatique·ROCHE¶
Step·one·APPLIED¶
Hottes·¶

PCR·maison¶
PCR·CNR¶
Si·frottis·+°:·PCR·et·culture¶

Métriepipette·¶

Habilitation°BM¶

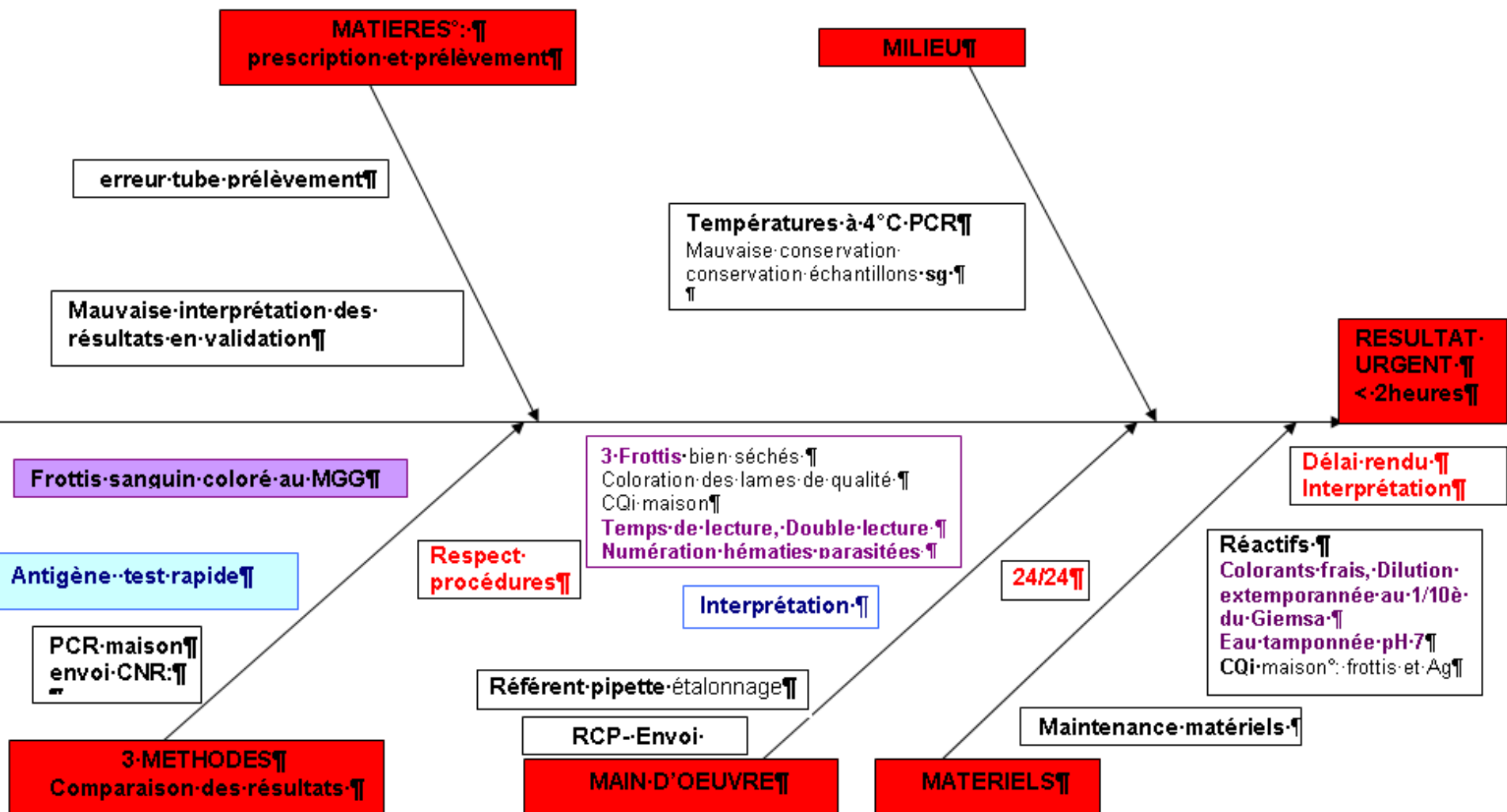
3·METHODES¶
_ Comparaison·¶

MAIN·D'OEUVRE¶

MATERIELS¶

Diagnostique du paludisme – Urgence vitale

Evaluation des risques d'erreurs



EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

COMPARAISON DE METHODES	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire	Coloration / Antigène / Biologie moléculaire - CHU / CNR
Nombre de mesures	60 (Ne sont envoyés au CNR que les frottis positifs)
Descriptif de l'échantillon étudié	Recherche positive au laboratoire
Méthode d'exploitation des résultats (étude des concordances)	95% de concordance
Résultats et interprétations des discordances	3 discordances mineures sur 60 - certains palu difficiles
Conclusions et dispositions	Conforme et maîtrisée - Le référent paludisme de maladies infectieuses a accès aux informations du site voozano

N° GLIMS NOM-Prénom	Frottis	Antigène NADAL	PCR	CNR
2012				
N°-NOM-Prénom	Frottis	NADAL / BioRad	PCR	CNR
1202_240799-L-N	0.4% Tropho-Pfo	mixte.....mixte	<i>P. falciparum</i>	0.44% Pfo
1204_132206-E-D	1.5% Tropho-Pfo	mixte.....mixte	<i>P. falciparum</i>	1.74% Pfo
1204_141013T-A	1% Tropho-Pfo	mixte.....mixte	<i>P. falciparum</i>	1.3% Pfo
1205_041940-B-N	1% Tropho-Pfo	mixte	<i>P. falciparum</i>	1.4% Pfo
1205_072234-S-P	0.3% Tropho-Pfo	falci.....mixte	<i>P. falciparum</i>	0.3% Pfo
1207_080473-M-M	45% Tropho-Pfo	mixte.....mixte	<i>P. falciparum</i>	41% Pfo
1207_162271-G-M	0.1% Tropho-Pfo	mixte	<i>P. falciparum</i>	0.03% Pfo
1208_062043-D-B	0.25% Tropho-Pfo	mixte	<i>P. falciparum</i>	0.054% Pfo
1208_081096-C-Y	0.1% Tropho-Pfomixte	<i>P. falciparum</i>	0.1% Pfo
1208_131692-R-S	0.05% Tropho-Pfonégatif	<i>P. falciparum</i>	0.047% Pfo
1208_141166-R-D	0.1% Tropho-Pfomixte	<i>P. falciparum</i>	0.13% Pfo
1208_211803-S-M	<0.01% Pf Tropho+ 1gaméto	Neg.....Falci	<i>P. falciparum</i>	Gte épaisse 5 tropho pour 1000 GB
1209_020725-F-K	0.1% Tropho-Pfo	mixte	<i>P. falciparum</i>	0,14% Pfo
1209_041276-F-F	0.25% Tropho-Pfomixte	<i>P. falciparum</i>	0,26% Pfo
1209_041442-F-M	1.2% Tropho-Pfomixte	<i>P. falciparum</i>	1,71% Pfo
1209_111216-D-D	5% Tropho-Pfomixte	<i>P. falciparum</i>	9,46% Pfo
1209_220851-D-M	12% Tropho-Pfo	Non effectué	<i>P. falciparum</i>	10,7% Pfo
1209_252026-A-J	0.1 Tropho-Pfomixte	<i>P. falciparum</i>	0,15% Pfo

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES ¶

(indispensable en portée B) α

Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique °: ¶
¶
PHRC régional / groupe GERICCO □

- → *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005-Jun;3(3):435-44. ¶

Management of Pneumocystis pneumonia in patients with inflammatory disorders. ¶

Roblot F. ¶

- → *Scand J Infect Dis.* 2004;36(11-12):848-54. ¶

Risk factors analysis for Pneumocystis jiroveci pneumonia (PCP) in patients with haematological malignancies and pneumonia. ¶

Roblot F, Imbert S, Godet C, Kauffmann C, Ragot S, Le Moal G, Roblot P, Rodier MH, Robert R, Becq-Giraudon B, Guilhot F. ¶

- → *J Infect.* 2003-Jul;47(1):19-27. ¶

Pneumocystis carinii pneumonia in patients with hematologic malignancies: a descriptive study. ¶

Roblot F, Le Moal G, Godet C, Hutin P, Texereau M, Boyer E, Prazuck T, Lacroix C, Souala MF, Raffi F, Weinbreck P, Besnier JM, Garo B, de Gentile L, Becq-Giraudon B. ¶

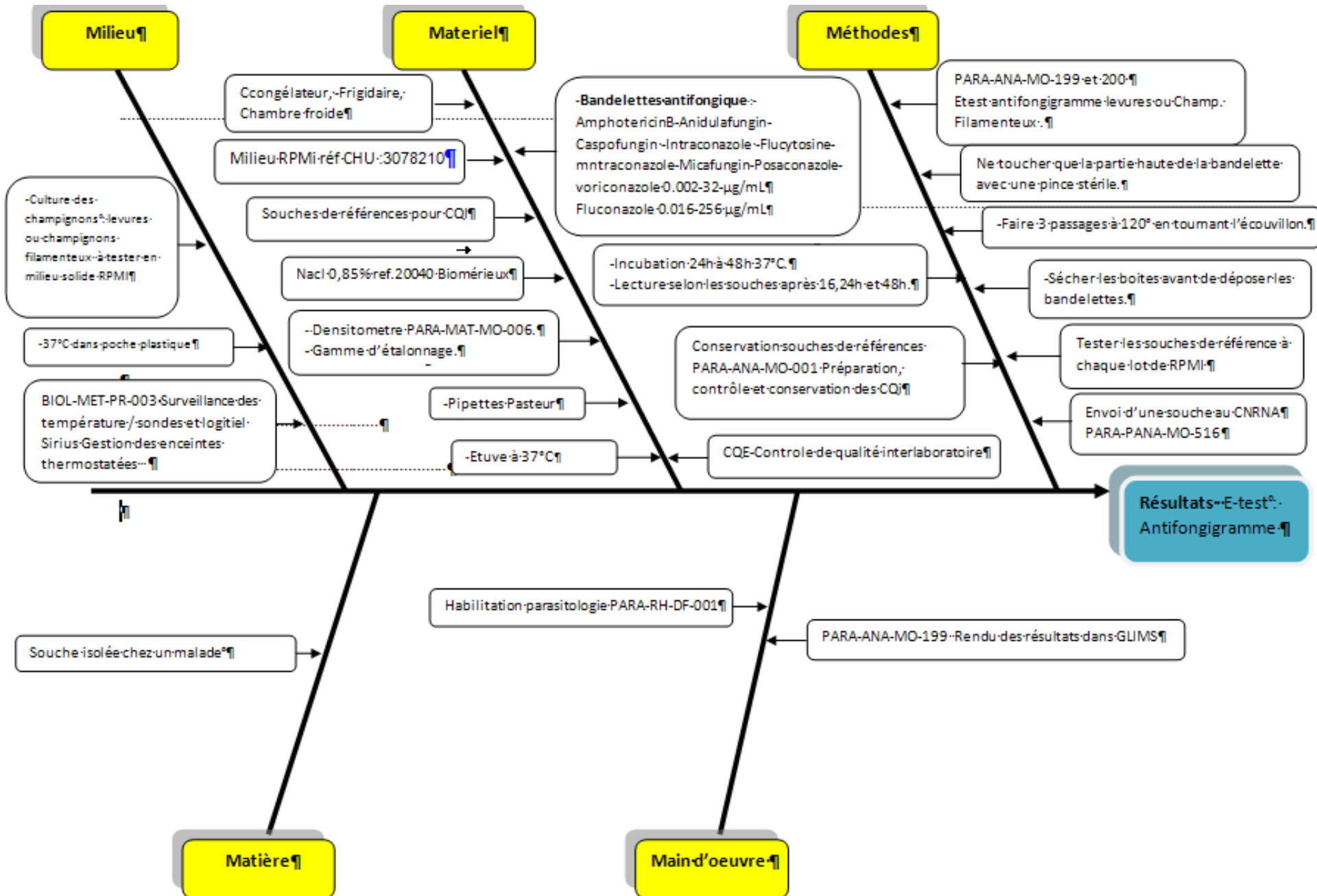
- → *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002-Jul;21(7):523-31. ¶

Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with Pneumocystis carinii pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients. ¶

Roblot F, Godet C, Le Moal G, Garo B, Faouzi Souala M, Dary M, De Gentile L, Gandji JA, Guimard Y, Lacroix C, Roblot P, Becq-Giraudon B. α

1. → Dans les années 1990 lors de l'épidémie de pneumocystose chez les patients VIH+ les techniques de références étaient les colorations au MGG pour la mise en évidence des trophozoïtes, pré-kystes et kystes à 8 corps intra-kystiques et à la méthénamine argent (Gomori-Grocott) pour celle des kystes. ¶
2. → Dans les années 2000 l'immunofluorescence par le marquage plus sensible des kystes a permis de mettre en évidence cette infection, au cours de différentes pathologies, chez les patients VIH négatif. ¶
3. → La PCR, technique plus sensible et d'une valeur prédictive négative élevée, permet un dépistage plus rapide de ces mêmes patients mais elle semble avoir l'inconvénient de détecter des colonisations. Lors de la mise en route de la PCR en temps réel le seuil de positivité (CT) a été défini < à 35. ¶
Si la PCR est positive, une technique complémentaire par IFI est réalisée à la demande des cliniciens. ¶
4. → En urgence, la coloration de MGG (RAL) peut être effectuée en 1^{ère} intention. ¶
5. → La notion de colonisation / infection est actuellement contestée, l'IFI peut donc encore être considérée comme la technique de référence du diagnostic de l'infection. α

Antifongigramme E-test



Analyse des causes

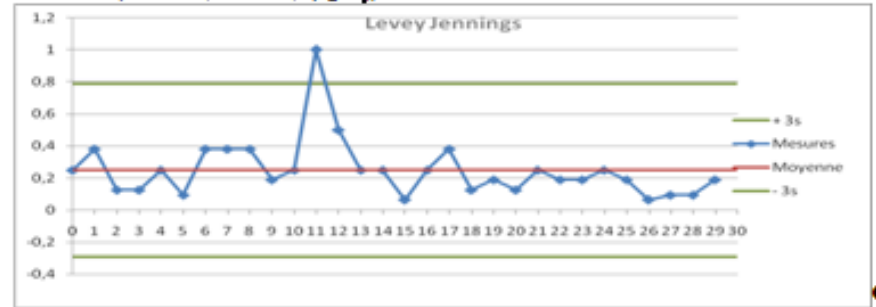
Contrôle d'un milieu de culture avec un fort turn over des lots

....

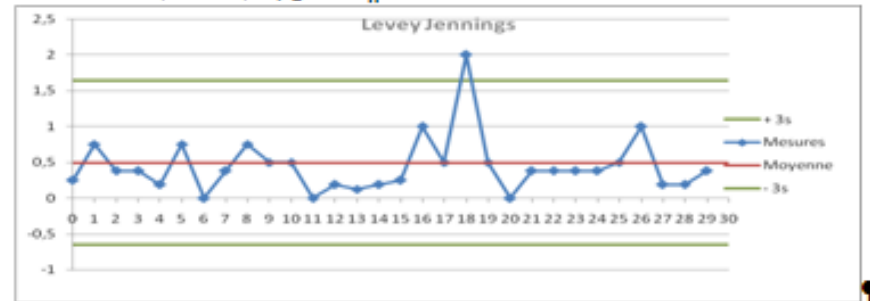
Pb de la gestion des lots de milieux de cultures en microbiologie

Annexes

1 → C.albicans-Ampho-B-0,125 - -0,5µg/L



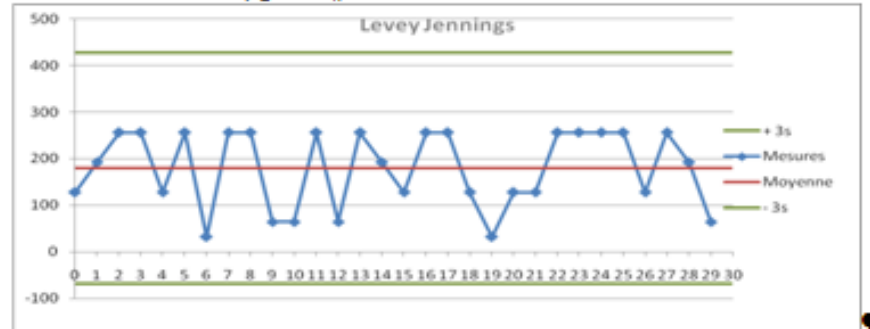
2 → C.albicans-Fluco-0,125 - -0,15µg /mL



3 → C.krusei-ampho-B-0.5 - -2 µg /mL



4 → C.krusei-fluco-128 - - ≥ 256 µg /mL



Dans le cadre du fonctionnement normal du laboratoire, vérification en continue et enregistrement des éléments de preuves d'un travail de qualité permettent de constituer le dossier présenté au COFRAC.

- **Le dossier de validation d'une méthode qualitative** repose principalement sur :
 - la **maîtrise des risques** de défaut de qualité (ou d'erreur) via la méthode des 5 M
 - du **personnel compétent et des formations** assurant le maintien des habilitations
 - des méthodes analytiques reconnues sensibles, des appareils contrôlés,
 - les résultats des **contrôles internes et externes** confrontés avec les limites acceptables
 - des comparaisons inter opérateurs ou bien avec d'autre techniques comme anatomopathologie, antigénémie ou encore PCR spécifique.

SH GTA 04 Guide de validation des méthodes en biologie médicale

SH FORM 44 FICHE TYPE QUALITATIF - Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Quelques conseils !

- 15189 Laboratoire de biologie médicale. Exigences concernant la qualité et la compétence : **apportez les preuves !** on vous les demandera lors des audits
- La confiance n'exclut pas le contrôle
- Vérifiez ... surtout les idées reçues
- Ne croyez pas tout ce qui se dit surtout si la phrase commence par à cause de l'accréditation...



Contenu type d'un dossier de validation

**Conclusions
Validation/
Aptitude
à l'emploi**

Description de la méthode
(équipement, technique, nature
d'analyse, type de spécimen),
domaine d'application

Critères de performance
de la méthode à évaluer et à
vérifier

Répétabilité, reproductibilité,
sensibilité, spécificité, limites de
détection/quantification, linéarité,
incertitude, valeur de référence, ...
(suivant les besoins) et le type de
méthode (qualitative, quantitative)

**Confrontation des
résultats**

des critères de
performances aux
spécifications
énoncées et attendues,
mettant en évidence la
satisfaction (ou non)
aux spécifications



**Les performances
attendues** de la méthode
Limites acceptables,
spécifications (cf. doc.
Fournisseurs, Bibliographie),
état de l'art.

Résultats

Calculs, exploitation,
selon règles définies
(traçabilité donnés,
données brutes, ...)

Mode opératoire de
validation

Plan d'expérience (nombre et
nature des matériaux
employés), règles statistiques

Envoi du dossier au COFRAC

- L' évaluateur technique nommé va rendre un rapport d'expertise...LE LIRE
 - Soit OK
 - Soit +/- => REPONDRE / se préparer pour répondre aux remarques lors de l'audit
 - faire ce qu'il demande et compléter les documents

Importance des communications E-mail rapides

Révision du dossier de validation de méthode

- Oui pour Analyse quantitative : recalcul des incertitudes
- Oui aussi pour Analyse qualitative via tableau des EEQ
- Toute petite modification même minime doit figurer dans une nouvelle version du dossier
 - modif réactif à cause de l'appel d'offre, ajout étape de centrifugation ...
 - en cas de changement de méthode, d'automate informer le COFRAC par lettre (cf gestion de la portée flexible)

En conclusion prévoir une révision annuelle de principe , si aucun changement et aucune non-conformité sur le processus on peut ne rien faire .