

Sommaire

Liste des tableaux.....	2
Liste des annexes.....	2
Abréviations.....	3
1. La Qualité au laboratoire	4
2. Validation d'une Méthode Quantitative de Portée A	5
2.1. Information normative	5
2.2. Contexte de la méthode	6
2.2.1. Le mesurande : La vitamine D sérique	6
2.2.2. L'automate : Modular Roche®	7
3. Protocoles de validation de la méthode	8
3.1. Précision	8
3.1.1. Reproductibilité	9
3.1.2. Répétabilité	8
3.2. Justesse.....	9
3.3. Corrélacion	10
3.4. Incertitude de mesure	11
4. Plan expérimental.....	12
5. Résultats	13
5.1. Précision	13
5.1.1. Répétabilité	13
5.1.2. Reproductibilité.....	13
5.2. Approche de la justesse.....	14
5.3. Corrélacion	15
5.4. Incertitude de mesure	16
6. Discussion	17
6.1. Précision	17
6.1.1. Répétabilité	17
6.1.2. Reproductibilité.....	17
6.2. Justesse.....	17
6.3. Corrélacion	18
7. Conclusion	19
Annexes	20
Bibliographie.....	29

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Plan expérimental de la validation du dosage de la vitamine D.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 2. Données de répétabilité du dosage de la vitamine D.....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 3. Données de reproductibilité du dosage de la vitamine D.....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 4. Données de justesse du dosage de la vitamine D.....</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 5. Comparaison des résultats obtenus par les trousse Elecsys Vitamine D totale de Roche® versus 25 OH Vitamine D TOTAL de Diasorin®.....</i>	<i>15</i>

Liste des annexes

<i>Annexe 1. Test de Répétabilité du dosage Elecsys Vitamine D Totale (niveau bas).....</i>	<i>21</i>
<i>Annexe 2. Test de Répétabilité du dosage Elecsys Vitamine D Totale (niveau haut).....</i>	<i>22</i>
<i>Annexe 3. Test de Reproductibilité du dosage Elecsys Vitamine D Totale (niveau bas).....</i>	<i>23</i>
<i>Annexe 4. Test de Reproductibilité du dosage Elecsys Vitamine D Totale (niveau haut).....</i>	<i>24</i>
<i>Annexe 5. Test de Justesse du dosage Elecsys Vitamine D Totale (niveau bas).....</i>	<i>25</i>
<i>Annexe 6. Test de Justesse du dosage Elecsys Vitamine D Totale (niveau haut).....</i>	<i>26</i>
<i>Annexe 7. Test de Corrélation du dosage Elecsys Vitamine D Totale Roche versus 25 OH Vitamine D TOTAL de Diasorin®</i>	<i>27</i>

Abréviations

CEI	Commission électrotechnique internationale
CQI	Contrôle de qualité interne
CQN	Contrôle de qualité national
CV	Coefficient de variation
EEQ	Evaluation externe de la qualité
ISO	Organisation internationale de normalisation
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse
SFBC	Société Française de Biologie Clinique

1. La Qualité au laboratoire

Le laboratoire COHEN ZACCARINI est un laboratoire de biologie médicale polyvalent. Il dispose de trois sites, chacun s'occupant d'une spécialité (Immunoanalyse ; Bactériologie ; Hématologie-Biochimie). Les différents sites accueillent les patients du lundi au samedi et proposent un service de prélèvements à domicile.

La Politique Qualité du Laboratoire COHEN-ZACCARINI est basée sur le respect des normes en vigueur et des bonnes pratiques professionnelles. Cette ligne de conduite est appliquée à tous les niveaux du laboratoire : phase pré-analytique, analytique et post-analytique.

Pour ces raisons, et dans un but d'amélioration permanente, la direction s'est engagée avec l'ensemble du personnel dans une Démarche Qualité et le laboratoire a été récompensé par l'obtention de la Qualification Bioqualité pour 36 mois.

Cette qualification est le reflet de la rigueur mise en place au laboratoire pour l'exécution des analyses, de l'accueil du patient au rendu des résultats.

Afin de respecter notre Politique Qualité, la direction a défini des axes prioritaires d'amélioration que sont :

- Le respect des normes et des bonnes pratiques professionnelles : en obtenant moins de cinq Non Conformités lors des audits internes.
- La conformité des résultats des contrôles de qualité interne (CQI) et contrôles de qualité nationaux (CQN) : en obtenant 100 % de résultats conformes aux contrôles réalisés.
- La participation croissante à des programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ).
- La formation de notre équipe professionnelle : en assurant une formation par an par personne.
- L'accueil des patients lors des prélèvements et lors du rendu des résultats : en augmentant de dix pour cent le nombre de personnes satisfaites de l'accueil.

Cette Politique Qualité est définie pour deux ans et se décline dans un tableau de bord, en objectifs mesurables à différents niveaux du fonctionnement du laboratoire.

Pour atteindre ces objectifs, la direction s'engage à planifier et à mettre à disposition les moyens nécessaires au bon fonctionnement du laboratoire. De plus, l'ensemble du personnel est sensibilisé régulièrement afin qu'il s'implique et participe activement à cette démarche collective.

2. Validation d'une Méthode Quantitative de Portée A

2.1. Problématique

Dans cette étude, nous avons réalisé une vérification de méthode de dosage de portée A, concernant la vitamine D, dosée par la trousse Roche® (Elecsys Vitamine D totale), sur l'automate Modular.

Pour satisfaire aux exigences normatives, nous avons choisi de calquer notre validation de méthode sur les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), éditées dans les *Annales de Biologie Clinique*, coordonnées par A. Vassault sous la direction de M. Vaubourdolle (16).

2.2. Information normative

Les exigences de qualité et de compétences propres aux laboratoires d'essais et d'analyses sont spécifiées par une norme internationale éditée par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) et par la Commission Electrotechnique Internationale (CEI) (8). Plus précisément, la réforme de la biologie médicale en France va prochainement rendre obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon le référentiel NF ISO 15189 : « Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence » (7).

Au 1^{er} novembre 2014, les laboratoires devront fournir le dossier de preuve d'entrée dans une démarche d'accréditation. Aussi, la date limite concernant l'accréditation totale (c'est à dire 80% des examens de biologie médicale réalisés) est fixée au 1^{er} novembre 2018.

Les exigences organisationnelles et techniques sont mentionnées dans le document SH REF 02 (3). Ce document synthétise et annote les dispositions législatives et réglementaires applicables ainsi que les exigences et règles normatives du Cofrac. Les types de portée d'accréditations pour les examens de biologie médicale sont mentionnés au document SH REF 08 (4).

La validation préalable à l'utilisation d'une méthode d'analyse quantitative de portée A, lors de la mise en application d'une nouvelle méthode, fait l'objet d'une exigence de la norme NF EN ISO 15189 « pour s'assurer qu'elle convient à l'utilisation prévue » (7).

L'une des exigences de la directive porte sur la vérification des performances annoncées par les fournisseurs. L'évaluation au laboratoire consiste à vérifier que ces performances annoncées sont satisfaites dans les conditions réelles d'utilisation au laboratoire.

Ainsi, les différentes étapes d'une vérification/validation de méthode sont :

- d'évaluer de façon détaillée le contexte de la méthode.
- de définir le protocole de validation en justifiant les critères évalués et ceux qui ne sont pas jugés nécessaires (en tenant compte des objectifs de la méthode en routine et des décisions prises à partir des résultats générés).
- de choisir le plan expérimental.
- d'exploiter et d'analyser les résultats (graphes et statistiques).
- d'effectuer le rapport de validation/vérification.

2.3. Contexte de la méthode

2.3.1. Le mesurande : vitamine D sérique

La vitamine D est fréquemment dosée à des concentrations insuffisantes : 80% de la population française est carencée (6). Des supplémentations systématiques apparaissent nécessaires, au moins lors des périodes de faible ensoleillement, pour atteindre le seuil recommandé de 30 ng/ml. Pour les adapter au plus près des besoins du patient, il est important de disposer d'un dosage très précis, en particulier en dessous de cette valeur seuil. Il est primordial d'utiliser une technique dosant conjointement les deux formes de vitamine (D2+D3), car si la peau ne synthétise que la D3 et si les sources alimentaires sont essentiellement de la D3, de nombreux médicaments existent sous la forme D2. En ne dosant spécifiquement que la D3, on sous estime le statut en vitamine D d'un patient traité par vitamine D2.

La trousse Diasorin® (25 OH Vitamine D TOTAL), utilisée jusqu'alors dans notre laboratoire sur l'automate Liaison, faisait l'unanimité parmi les spécialistes de la vitamine D, mais Roche® commercialise depuis peu un réactif de dosage de la vitamine D prometteur (Elecys Vitamine D Totale, avec le dosage des deux formes de vitamine D et une très bonne précision dans les taux faibles, selon le fournisseur).

Le dosage mis en œuvre repose sur le principe de compétition entre la vitamine D marquée à la biotine et celle présente dans le prélèvement, pour se fixer à une protéine porteuse de la vitamine D (VDBP) recombinante. Le prétraitement permet d'assurer au préalable la dénaturation de la VDBP et la libération de la vitamine D présente dans l'échantillon.

Plusieurs difficultés nous sont apparues dans notre démarche :

- Concernant les valeurs de références, il est très difficile d'en établir de façon expérimentale sous nos latitudes étant donné la proportion significative de la population carencée en vitamine D. Par conséquent, nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature (12, 14).
- Aucune méthode de référence n'est attribuée à cette analyse. Cependant la chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse (LC-MS/MS), au regard des nombreuses publications (21), est considérée comme la méthode à laquelle il faut se référer. En effet, la LC-MS/MS est traçable au matériel de référence du National Institute of Technology.
- Pour des raisons de coûts, nous n'avons pas établi la linéarité et les limites de détection-quantification. Celles-ci nous ont été fournies par Roche® (13):

Domaine d'analyse	3.00 ng/ml à 70 ng/ml
Limite de détection	3.00 ng/ml
Limite de quantification	9.00 ng/ml avec une erreur relative totale autorisée < 40%

2.3.2. L'automate : Modular Roche®

Le Modular Roche® est un automate multiparamétrique éprouvé depuis plusieurs années. Fer de lance du groupe Roche® dans les sections Chimie et Immunologie, cet automate utilisant la technologie électrochimiluminescence a été mis en place en 2009 dans notre laboratoire pour effectuer trente cinq paramètres en routine (analyses de sérologie virale et parasitaire, d'hormonologie et dosages des marqueurs tumoraux essentiellement). Cet outil diagnostique nous donne entière satisfaction tout comme le partenariat avec les services de Roche Diagnostics®. Leur accompagnement à l'accréditation aussi bien humain que logiciel nous aide dans notre démarche.

3. Protocole de validation de la méthode

Pour estimer la trousse Elecsys Vitamine D totale de Roche®, nous avons étudié les différents paramètres nécessaires à la validation d'une méthode quantitative de portée A (répétabilité, reproductibilité, justesse, corrélation avec la méthode utilisée au laboratoire) (4, 10, 18, 19).

3.1. Précision

La précision d'une série de mesure est appréciée par l'étude de la reproductibilité et de la répétabilité. Elle est évaluée en fonction de la dispersion des résultats par rapport à la moyenne. Cette dispersion est représentée par l'écart type (ET) et le coefficient de variation (CV).

Pour déterminer la précision du système analytique, on se base sur le contrôle de qualité interne (CQI). Cela consiste à analyser régulièrement les contrôles de qualité et à observer si les valeurs mesurées se situent à l'intérieur d'un intervalle donné. Les CV inter-séries en sont déduits.

3.1.1. La répétabilité :

Introduction

La répétabilité n'a plus le rang de performance capitale qu'on lui reconnaissait autrefois, compte tenu du niveau de fiabilité des automates. Autrement dit, la répétabilité devrait être considérée comme un marqueur du bon fonctionnement du système et de la conformité du fabricant et devrait être examinée a minima : la vérifier, en récupérant éventuellement les données de la qualification fournisseur, permettrait de détecter un éventuel dysfonctionnement et de disposer de données de référence en cas d'anomalie pressentie. Cependant, d'un point de vue normatif, cette validation est nécessaire et imposée dans le dossier de validation d'une méthode.

En pratique, l'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour la même analyse dans les mêmes conditions : l'opérateur, les lots de réactifs, les calibrateurs et courbes de calibration sont identiques pour tous les dosages. Cet essai met en évidence uniquement les erreurs aléatoires inhérentes à l'automate (erreurs sur l'échantillonnage, sur le détecteur, sur le temps d'incubation...).

Matériels et méthodes

Les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la notice d'utilisation du fournisseur.

Les conditions du test ont été les suivantes : même opérateur, même instrument, même lot de réactifs, même étalonnage.

Nous avons utilisé les deux niveaux de contrôle du fournisseur (Précicontrol Varia Roche®). Ceux-ci ont été analysés vingt fois le même jour et dans la même série (séparation du contrôle en cinq aliquots, disposés dans les cinq places du rack, le rack étant lui-même passé quatre fois de suite sur l'automate).

Les résultats rangés dans un tableau Excel ont permis de calculer moyenne, ET et CV de répétabilité pour les vingt valeurs. Les CV ont été ensuite comparés aux critères d'acceptabilité du fournisseur (en l'absence de données des sociétés savantes).

3.1.2. La reproductibilité :

Introduction

En tant que composante majeure de l'incertitude de mesure, c'est une performance à valider sur tous les paramètres quantitatifs et sur plusieurs niveaux. L'objectif est en effet de prendre en compte tous les facteurs d'influence, sources de dispersions aléatoires : calibrations, réactifs, manipulateur, température, qualité de l'eau, etc. En effet, l'opérateur, les lots de réactifs, les calibrateurs et courbes de calibration peuvent être des données variables, correspondant à une activité normale et quotidienne du laboratoire.

La reproductibilité se mesure sur une période longue. La période de validation (deux mois) nous a permis d'évaluer cette performance, mais il faut plusieurs mois pour l'établir vraiment.

Matériels et méthodes

Les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la notice d'utilisation du fournisseur.

Les conditions du test ont été les suivantes : même instrument et même lot de contrôle, lots de réactif, étalonnages et opérateurs différents.

Nous avons utilisé les deux niveaux de contrôle du fournisseur (Précicontrol Varia Roche®). Les deux niveaux de contrôle sont dosés chaque jour sur l'analyseur. Nous avons utilisé trente valeurs consécutives de ces CQI journaliers.

Les résultats rangés dans un tableau Excel ont permis de calculer moyenne, ET et CV de reproductibilité pour les trente valeurs. Les CV ont été ensuite comparés aux critères d'acceptabilité du fournisseur (en l'absence de données des sociétés savantes).

3.2. La justesse

Introduction

La justesse consiste à vérifier la concordance du dosage réalisé par la méthode utilisée au laboratoire avec le dosage réalisé par la méthode de référence.

En théorie, le résultat du dosage d'un spécimen biologique de contrôle devrait être analysé en parallèle avec celui obtenu par la méthode de référence. En pratique, il existe peu de contrôles raccordés sur le plan métrologique à des étalons internationaux. Il est possible d'effectuer le test de justesse en utilisant la moyenne des résultats des différents

laboratoires participant à un programme d'Évaluation Externe de la Qualité (EEQ), considérée alors comme « valeur vraie » à défaut d'utiliser le résultat obtenu par une méthode de référence.

Concernant le dosage de la vitamine D, la technique par LC-MS/MS peut être considérée comme la méthode à laquelle il faut se référer (21).

Matériels et méthodes

Les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la notice d'utilisation du fournisseur.

Deux échantillons de patients sains ont été choisis pour évaluer la justesse de la méthode. Nous avons choisis une valeur basse (19.30 ng/l) associée cliniquement à une insuffisance en vitamine D et une valeur normale (46.30 ng/ml) représentative d'une concentration suffisante en vitamine D.

Les échantillons ont été aliquotés en deux fractions. Le premier aliquote congelé a été envoyé en carboglace dans le centre Roche Diagnostics France à Meylan pour effectuer le dosage en LC-MS/MS, le deuxième réfrigéré a été dosé tous les jours pendant dix jours.

La justesse est quantifiée par le biais relatif estimé en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire à la valeur cible attendue assimilée à la valeur vraie (v) de l'échantillon testé.

3.3. La corrélation

Introduction

Nous avons transféré le dosage de vitamine D de l'automate Liaison de Diasorin® sur le Modular de Roche®. Nous avons donc réalisé une comparaison de méthodes, afin de vérifier l'absence ou la présence de discordances entre ces deux systèmes analytiques (17). S'il s'avère qu'il y a discordance, il conviendra d'en évaluer les causes et de transmettre l'information aux prescripteurs et aux patients pour une interprétation éclairée des résultats.

Matériels et méthodes

Une cohorte de 92 échantillons est constituée. Les échantillons ont été choisis pour couvrir l'étendue du domaine physiopathologique. Les échantillons ont été analysés « au fil de l'eau » sur les deux automates durant cinq jours.

Les échantillons sont analysés par les deux techniques (Elecsys Vitamine D totale Roche® ; 25 OH Vitamine D TOTAL Diasorin®) dans des conditions de temps maîtrisées conformément aux indications définies et décrites par les fournisseurs.

La relation statistique liant les résultats des deux techniques étudiées a été déterminée par la droite de régression linéaire non paramétrique de la méthode B *versus* la méthode A (Passing Bablock) (11).

- Equation de la droite de régression :

L'équation est de la forme $y = ax + b$, où a est la pente de la droite et b l'ordonnée à l'origine. La pente de la droite de Passing-Bablok indique l'estimation de l'erreur systématique

proportionnelle et l'ordonnée à l'origine l'erreur systématique constante. Si les deux méthodes ne sont pas statistiquement différentes, la pente est proche de un et l'ordonnée à l'origine proche de zéro.

- Coefficient de corrélation, r :

Il représente la dispersion des points autour de la droite de régression et est influencé par l'erreur aléatoire. Lorsque r vaut un, cela veut dire que tous les points sont bien alignés et qu'il n'y a pas de valeurs aberrantes. Une bonne corrélation conduit à un r proche de un.

3.4. Incertitude de mesure

Introduction

Le calcul d'incertitude permet d'évaluer correctement les erreurs qui se produisent lors de mesures liées à la vérification d'une relation entre différentes grandeurs physiques. Les instruments de mesure n'étant pas de précision infinie, les mesures faites pendant une expérience ne sont pas exactes. Il faut donc évaluer ces incertitudes. On en déduit des marges d'erreurs, en dehors desquelles la relation sera invalidée (5)

Par ailleurs, on retrouve dans la bibliographie de la norme 15189, le Guide pour l'Incertitude de Mesure (GUM7) (9) et le LAB GTA 14 sur les incertitudes de mesures en biologie médicale (2).

Matériels et méthodes

Pour des raisons pratiques, nous avons choisi d'adopter la méthode proposée par la SFBC (5). Pour évaluer l'incertitude de mesure dans un laboratoire de biologie médicale, il convient de retenir comme principales composantes :

- l'incertitude liée à l'étalonnage
- l'incertitude liée à la méthode de mesure
- l'incertitude liée à d'autres facteurs lorsque cela est nécessaire

Le calcul de l'incertitude (U résultat) correspond alors à :

$$U_{\text{résultat}} = \sqrt{U_{\text{étalonnage}}^2 + U_{\text{méthode}}^2 + U_{\text{divers}}^2}$$

L'incertitude sur la valeur assignée à l'étalon de travail nous a été transmise par le fournisseur.

L'incertitude liée à la méthode de mesure proprement dite est estimée correspondre à la fidélité intermédiaire, ce qui inclut les incertitudes liées aux différentes étapes de la phase analytique. Elle est obtenue à partir de l'étude de la validation/vérification de la méthode effectuée par le laboratoire (répétabilité et reproductibilité). Pour des raisons évidentes, nous n'avons pu établir qu'une évaluation provisoire, sur une période courte englobant trente valeurs pour chacun des deux niveaux de contrôle.

L'approche proposée s'adresse uniquement aux incertitudes de mesure résultant du processus analytique mis en oeuvre. L'incertitude de mesure est exprimée dans la même unité que le résultat, sous forme d'incertitude élargie, en utilisant un facteur d'élargissement k (k = 2 étant conseillé pour un intervalle de confiance de 95 % environ).

4. Plan expérimental

Des feuilles de calcul Excel ont été conçues pour l'évaluation des éléments statistiques nécessaires à la validation des différents paramètres (annexes 1 à 7).

Les conditions utilisées dans l'exercice de cette validation sont résumées dans le tableau 1. L'étude a été réalisée du 13 mai 2011 au 19 août 2011. L'analyse des données a été effectuée à posteriori.

	Répétabilité	Reproductibilité	Justesse	Corrélation
Nature du Spécimen	CQI Précicontrol Varia Roche®	CQI Précicontrol Varia Roche®	Sérum de patients	Sérum de patients
Nbre d'échantillons	2 niveaux (bas et haut)	2 niveaux (bas et haut)	2 niveaux (bas et haut)	92 sur toute la plage de mesure (de 7.43 à 62.58 ng/ml)
Nbre de répétitions	20 par niveau	30 par niveau	10 par niveau + dosage en LC- MS/MS	Non applicable
Durée de l'analyse	½ journée	30 jours consécutifs	10 jours consécutifs	5 jours
Conditions particulières	Même lot de contrôle Mêmes conditions	Même lot de contrôle Conditions différentes		2 analyseurs - Liaison Diasorin® - Modular Roche®

Tableau 1. Plan expérimental de la validation du dosage de la vitamine D

5. Résultats

5.1. Précision

5.1.1. Répétabilité

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

	Niveau bas	Niveau haut
Nombre de répétition	20	20
Moyenne (ng/ml)	20.47	42.88
Ecart type	1.08	1.34
CV	5.28%	3.12%
CV fournisseur réajusté	6.61%	4.27%

Tableau 2. Données de répétabilité du dosage de la vitamine D.

L'étude statistique des données est fournie en Annexes 1 et 2.

Lors de notre étude, les CV obtenus sont tous inférieurs à ceux définis par le fournisseur pour des échantillons à ces concentrations sur cet analyseur.

Conclusion : La technique est répétable.

5.1.2. Reproductibilité

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

	Niveau bas	Niveau haut
Nombre de répétition	30	30
Moyenne (ng/ml)	19.92	39.89
Ecart type	1.30	1.73
CV	6.52%	4.34%
CV fournisseur réajusté	7.00%	4.78%

Tableau 3. Données de reproductibilité du dosage de la vitamine D.

L'étude statistique des données est fournie en Annexe 3 et 4.

Lors de notre étude, les CV obtenus sont tous inférieurs à ceux défini par le fournisseur pour des échantillons à ces concentrations sur cet analyseur.

Conclusion : La technique est reproductible.

5.2. Approche de la justesse

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

	Niveau bas	Niveau haut
Nombre de répétition	10	10
Moyenne (ng/ml)	16.45	44.77
Valeur vraie (LC-MS/MS)	18.10	49.24
Biais	9.10 %	9.09 %

Tableau 4. Données de justesse du dosage de la vitamine D.

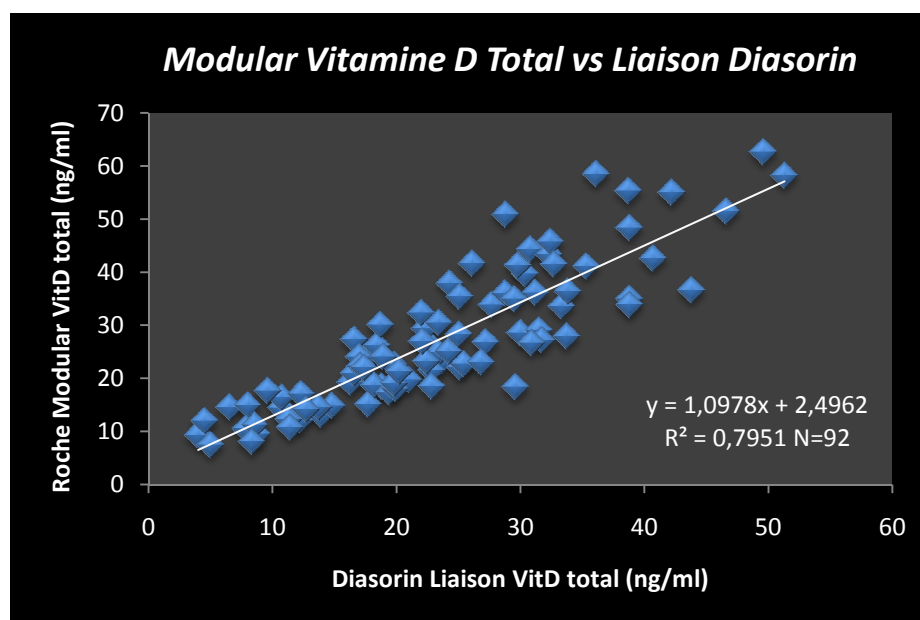
L'étude statistique des données est fournie en Annexes 5 et 6.

Il n'existe pas de valeur de biais annoncée par le fournisseur. Nous nous sommes donc appuyés sur les données de la littérature : Stöckl *et al* proposent des biais allant jusqu'à 10% (15).

Conclusion : La technique est juste.

5.3. Corrélation

Les résultats sont présentés dans le tableau 5.



Nombre d'échantillons	92
Pente de la droite de régression	1.09
Ordonné à l'origine	2.49
R de la droite de régression	0.88
Instruments	Modular vs Liaison

Tableau 5. Comparaison des résultats obtenus par les trousse Elecsys Vitamine D totale de Roche® versus 25 OH Vitamine D TOTAL de Diasorin®

L'étude statistique des données est fournie en Annexe 7.

Conclusion : L'estimation graphique nous permet de conclure que les résultats obtenus par la trousse Elecsys Vitamine D totale de Roche® sur l'automate Modular sont corrélés aux résultats obtenus par la trousse 25 OH Vitamine D TOTAL de Diasorin® sur l'automate Liaison.

5.4. L'incertitude de mesure

Analyte :	Vitamine D		
Abréviation :	VITD		
Définition de la mesurande :	Concentration sérique de Vitamine D		
Principe de la méthode :	Compétition-Electrochimiluminescence		
Unité :	ng/ml		
Intervalle de référence :	30 ng/ml à 100 ng/ml (sérum)		
Interférences significatives :	Aucune		
Traçabilité	Données fournies par le fabricant :		
– Méthode référence :	LC-MS/MS		
– Étalon (niveau de confiance à 95%)			
– Concentration basse :	1.99 ± 1.26 ng/ml	$U_{eb} = 0.63$ ng/ml	
– Concentration élevée :	45.9 ± 6.18 ng/ml	$U_{eh} = 3.09$ ng/ml	
Fidélité intermédiaire :	CQI du 10/06/2011 au 03/08/2011		
– Niveau bas :			
moyenne m_b : 19.92 ng/ml ;	écart type :	$u_{fb} = 1.30$ ng/ml	$CV_b = 6.52$ %
– Niveau haut			
moyenne m_h : 39.89 ng/ml ;	écart type :	$u_{fh} = 1.73$ ng/ml	$CV_h = 4.34$ %
Objectifs analytiques :			
- Donnés par le fournisseur			
– Niveau bas	CV_b repro : 12.20%	biais : non renseigné	
– Niveau haut	CV_h repro : 8.40%	biais : non renseigné	
- Etat de l'art (21)	Biais < 10%		
Aptitude à l'emploi :	Fidélité intermédiaire acceptable		
Incertitudes Urb et Urh sur les résultats :			
– niveau bas à 19.92 ng/ml	$U_{rb}^2 = U_{eb}^2 + U_{fb}^2 = 0.63^2 + 1.30^2 = 2.0869$ $U_{rb} = 1.44$ ng/ml		
– niveau haut à 38.89 ng/ml	$U_{rh}^2 = U_{eh}^2 + U_{fh}^2 = 3.09^2 + 1.73^2 = 12.541$ $U_{rh} = 3.54$ ng/ml		
Incertitude de mesure élargie U à communiquer :			
– niveau bas :	$U_b = 2 \times 1.44 = 2.88$ ng/ml		
– niveau haut :	$U_h = 2 \times 3.54 = 7.08$ ng/ml		

6. Discussion

6.1. Précision

6.1.1. Répétabilité

Nous avons effectué vingt répétats de chaque niveau. Néanmoins, étant donné le coût réactif important de cette analyse, et à la vue des résultats, il aurait été suffisant de réduire le nombre de passage à dix. N'ayant pas trouvé de critères d'acceptabilité fournis par *Ricos et al.* ou par la SFBC, nous avons décidé de réaliser vingt passages pour se calquer au protocole classique de réalisation de la répétabilité (16).

6.1.2. Reproductibilité

Notre seule interrogation portait sur le nombre de mesures nécessaires. La remarque du LAB GTA 04 (1), qui indique que la reproductibilité peut être réalisée après la mise en routine, est non négligeable pour minimiser la durée et le coût de la validation de méthodes. Nous avons décidé de réaliser la reproductibilité rétrospectivement sur nos valeurs de contrôle journalier.

La technique étant répétable sur les deux niveaux, nous avons décidé d'effectuer une semaine de passage journalier de CQ pour vérifier la concordance de nos valeurs par rapport à celle du fournisseur et l'absence de dérive importante. Celle-ci étant satisfaisante, nous avons commencé nos dosages en routine en suivant les CQI journaliers par rapport à la valeur cible du fournisseur jusqu'à obtention de trente valeurs pour réajuster nos valeurs cibles et définir nos critères de validation de nos CQI.

6.2. Justesse

Notre première interrogation portait sur la nature de l'échantillon qu'il serait judicieux de choisir pour l'étude. Les contrôles de qualité ne se comportant pas comme des échantillons biologiques nous avons choisi de prendre des échantillons de patients encadrant le domaine physiopathologique. Au préalable, nous avons vérifié la stabilité sur quinze jours des sérums conservés à 4°C, à température ambiante et congelés.

Nous n'avons pas trouvé de valeur acceptable de la justesse pour ce paramètre. Les trousse de vitamine D étant assez différentes les unes des autres, nous voulions une « vraie » valeur de référence à laquelle se comparée. Nous avons, par le biais de Roche®, organisé le dosage de nos deux vitamines D par chromatographie en phase liquide couplé à une spectrométrie de masse (LC-MS/MS). En considérant les données de la littérature et les valeurs acceptables pour la justesse des autres paramètres d'immunologie (20), nous avons donné une conclusion positive à ce test.

D'autre part, nous travaillons à la vérification de la concordance des valeurs basses de cette trousse par rapport à la technique de référence (LC-MS/MS), la fiabilité de cette technique étant discutée à ces valeurs proches du seuil de signification clinique.

6.3. Corrélation

La corrélation a été établie à partir de 92 échantillons. Ce choix a été effectué en collaboration avec l'équipe de Roche® qui souhaite tester en conditions opérationnelles la qualité des dosages fournis par la trousse Elecsys Vitamine D totale, et disposer d'une corrélation avec l'automate Liaison de chez Diasorin®.

L'analyse graphique est une bonne manière de comprendre les différentes caractéristiques d'une relation entre deux variables. L'intérêt est multiple : nous pouvons situer les proximités entre les individus ; étudier la forme globale des points, voir notamment s'il existe une forme de liaison ou de régularité ; détecter visuellement les points qui s'écartent des autres,...

La relation existante entre les deux méthodes de dosages est une liaison linéaire positive. X et Y évoluent dans le même sens, une augmentation de X entraîne une augmentation de Y, du même ordre quelle que soit la valeur de X. Nous notons néanmoins que les résultats sont en moyenne plus élevés avec la trousse Roche® qu'avec celle de Diasorin® (différence systématique et proportionnelle).

Le coefficient de corrélation ($R= 0.88$) est relativement proche de un, et les différences entre les deux méthodes peuvent être considérées comme cliniquement négligeables.

7. Conclusion

Qui ? Il est important d'identifier le « schéma actancier » de ce protocole dès le début, afin d'établir le rôle et la responsabilité de chacun.

Quoi ? Il est nécessaire d'évaluer la typicité de la méthode à valider, d'effectuer l'inventaire des critères à étudier au laboratoire et ceux pouvant être bibliographiques.

Où ? Le laboratoire Cohen-Zaccarini héberge un plateau technique, les échantillons proviennent de dix laboratoires. Les tubes sont centrifugés et analysés sur le plateau.

Quand ? Les validations des critères choisis doivent être intégrées à l'activité du laboratoire.

Comment ? Établir un planning, des feuilles de calculs, sensibiliser le personnel aux travaux effectués et travailler en collaboration avec le fournisseur.

Combien ? Il est important d'évaluer au plus juste le coût humain et matériel de la validation de méthodes. La participation du fournisseur nous a aidés dans cette démarche.

Pourquoi ? L'accréditation NF EN ISO 15189 est une obligation pour les laboratoires d'analyses médicales. Le processus devra être mis en place rapidement pour les autres paramètres dosés par le laboratoire.

ANNEXES

TROUSSE :	Vitamine D	AUTOMATE :	MODULAR E2
Nature	<i>CONTRÔLE ROCHE</i>		
Niveau	BAS		
Date du test	13/05/2011	CV (%) répétabilité niveau Bas (référence Roche)	6,50%
CV Calculé			
		Résultats	Date et heure
	T1	20,52	13/05/11 à 10h25
	T2	21,33	
	T3	22,45	
	T4	20,76	
	T5	19,84	
	T6	21,76	
	T7	22,06	
	T8	21,74	
	T9	19,60	
	T10	19,28	
	T11	19,67	
	T12	19,49	
	T13	20,31	
	T14	18,90	
	T15	19,06	
	T16	19,75	
	T17	21,28	
	T18	19,47	
	T19	21,23	
	T20	20,99	13/05/11 à 11h01
	n	20,00	
	n-1	19,00	
	moyenne	20,47	
	écart type	1,08E+00	
	variance	1,17E+00	
	Cv calculé	5,28%	
Cv Roche réajusté			
	Chi²	19,68	
	Coefficient \sqrt{K}	1,02	
	Cv réajusté par coefficient :	6,61%	
	Cv calculé :	5,28%	
	Cv Roche réajusté par coefficient :	6,61%	
Conclusion : CV calculé est inférieur au CV Roche réajusté => La technique est répétable			

Annexe 1 : Test de Répétabilité de la trousse de dosage de vitamine D (niveau BAS)

TROUSSE :	Vitamine D	AUTOMATE :	MODULAR E2
Nature	<i>CONTRÔLE ROCHE</i>		
Niveau	HAUT		
Date du test	13/05/2011	CV (%) répétabilité niveau Haut (référence Roche)	4,20%
CV Calculé			
		Résultats	Date et heure
	T1	44,53	13/05/2011 à 10h30
	T2	43,10	
	T3	43,46	
	T4	41,85	
	T5	45,02	
	T6	42,38	
	T7	42,46	
	T8	42,49	
	T9	40,93	
	T10	43,64	
	T11	42,74	
	T12	43,00	
	T13	42,35	
	T14	40,17	
	T15	41,45	
	T16	42,87	
	T17	41,53	
	T18	44,38	
	T19	45,07	
	T20	44,19	13/05/2011 à 11h08
	n	20,00	
	n-1	19,00	
	moyenne	42,88	
	écart type	1,34E+00	
	variance	1,79E+00	
	Cv calculé	3,12%	
Cv Roche réajusté			
	Chi²	19,68	
	Coefficient \sqrt{K}	1,02	
	Cv réajusté par coefficient :	4,27%	
	Cv calculé :	3,12%	
	Cv Roche réajusté par coefficient :	4,27%	
Conclusion : CV calculé est inférieur au CV Roche réajusté => La technique est répétable			

Annexe 2 : Test de Répétabilité de la trousse de dosage de vitamine D (niveau HAUT)

TROUSSE :	MODULAR	AUTOMATE :	MODULAR E2
Nature	CONTRÔLE ROCHE		
Niveau	BAS		
Date du test	Du 04/07/2011 au 02/08/2011		CV (%) reproductibilité niveau Bas (référence ROCHE) 8,50%
CV Calculé			
	Résultats		
	T1	20,28	
	T2	19,09	
	T3	20,88	
	T4	18,23	
	T5	18,66	
	T6	20,80	
	T7	19,99	
	T8	21,37	
	T9	21,06	
	T10	20,77	
	T11	21,63	
	T12	19,18	
	T13	19,21	
	T14	20,32	
	T15	18,91	
	T16	16,60	
	T17	20,03	
	T18	20,29	
	T19	18,84	
	T20	21,36	
	T21	16,78	
	T22	19,19	
	T23	20,88	
	T24	19,92	
	T25	20,84	
	T26	20,43	
	T27	19,80	
	T28	20,47	
	T29	20,01	
	T30	21,91	
	n	30,00	
	n-1	29,00	
	moyenne	19,92	
	écart type	1,30E+00	
	variance	1,63E+00	
	Cv calculé	6,52%	
Cv ROCHE réajusté			
	Khi ²	19,68	
	Coefficient \sqrt{K}	0,82	
	Cv réajusté par coefficient :	7,00%	
	Cv calculé :	6,52%	
	Cv Roche réajusté par coefficient :	7,00%	
Conclusion : CV calculé est inférieur au CV Roche réajusté => La technique est reproductible			

Annexe 3 : Test de Reproductibilité de la trousse de dosage de vitamine D (niveau BAS)

TROUSSE :	Modular	AUTOMATE :	MODULAR E2
Nature	CONTRÔLE ROCHE		
Niveau	HAUT		
Période du test	Du 09/06/11 au 02/08/2011	CV (%) reproductibilité niveau Haut (référence ROCHE)	5,80%
CV Calculé			
		Résultats	
	T1	41,40	03/08/2011
	T2	38,79	
	T3	41,17	
	T4	36,79	
	T5	37,03	
	T6	41,85	
	T7	39,59	
	T8	42,75	
	T9	39,77	
	T10	40,20	
	T11	40,73	
	T12	40,04	
	T13	39,13	
	T14	39,93	
	T15	38,58	
	T16	36,21	
	T17	37,62	
	T18	40,30	
	T19	38,00	
	T20	41,95	
	T21	37,92	
	T22	39,48	
	T23	41,66	
	T24	40,62	
	T25	41,83	
	T26	40,37	
	T27	39,07	
	T28	39,88	
	T29	41,38	
	T30	42,61	10/06/2011
	n	30,00	
	n-1	29,00	
	moyenne	39,89	
	écart type	1,73E+00	
	variance	2,99E+00	
	Cv calculé	4,34%	
Cv Roche réajusté			
	Khi ²	19,68	
	Coefficient \sqrt{K}	0,82	
	Cv réajusté par coefficient :	4,78%	
	Cv calculé :	4,34%	
	Cv Roche réajusté par coefficient :	4,78%	
Conclusion : CV calculé est inférieur au CV Roche réajusté => La technique est reproductible			

Annexe 4 : Test de reproductibilité de la trousse de dosage de vitamine D (niveau HAUT)

TROUSSE : Vitamine D		AUTOMATE : MODULAR E2				
Nature	serum	Coef Corrélation				
Niveau	1	R	0,880			
		R ²	0,77			
Période	13/05/2011					
n°	Ancien syst	Nv syst	x - y	x - y	x/y (%)	DATE
1	17,7	15,08	-2,62	2,62	-14,80225989	110511
2	49,6	62,58	12,98	12,98	26,16935484	110511
3	6,52	14,51	7,99	7,99	122,5460123	110511
4	38,8	34,93	-3,87	3,87	-9,974226804	110511
5	38,8	48,27	9,47	9,47	24,40721649	110511
6	8,76	9,48	0,72	0,72	8,219178082	110511
7	23,7	23,32	-0,38	0,38	-1,603375527	110511
8	18	25,08	7,08	7,08	39,33333333	110511
9	22,5	26,71	4,21	4,21	18,71111111	110511
10	42,2	54,94	12,74	12,74	30,18957346	110511
11	38,8	33,81	-4,99	4,99	-12,86082474	110511
12	38,7	55,24	16,54	16,54	42,73901809	110511
13	43,8	36,55	-7,25	7,25	-16,55251142	110511
14	31,2	36,08	4,88	4,88	15,64102564	110511
15	18,8	18,46	-0,34	0,34	-1,808510638	110511
16	26,1	41,55	15,45	15,45	59,1954023	110511
17	24,3	37,84	13,54	13,54	55,72016461	110511
18	36,1	58,45	22,35	22,35	61,91135734	110511
19	46,6	51,4	4,8	4,8	10,30042918	110511
20	28,8	50,78	21,98	21,98	76,31944444	110511
21	7,99	14,88	6,89	6,89	86,23279099	110511
22	10,7	14,42	3,72	3,72	34,76635514	110511
23	10,7	16,33	5,63	5,63	52,61682243	110511
24	7,82	10,49	2,67	2,67	34,14322251	110511
25	16,3	19,19	2,89	2,89	17,73006135	110511
26	23,4	24,8	1,4	1,4	5,982905983	110511
27	35,3	41,04	5,74	5,74	16,26062323	110511
28	27,7	33,8	6,1	6,1	22,02166065	110511
29	12,2	12,1	-0,1	0,1	-0,819672131	110511
30	9,61	17,6	7,99	7,99	83,14255983	110511
31	18,2	18,67	0,47	0,47	2,582417582	110511
32	28,8	35,95	7,15	7,15	24,82638889	110511
33	33,3	33,56	0,26	0,26	0,780780781	120511
34	25,1	22,03	-3,07	3,07	-12,2310757	120511
35	19,8	22,52	2,72	2,72	13,73737374	120511
36	30,8	44,28	13,48	13,48	43,76623377	120511
37	19,4	17,36	-2,04	2,04	-10,51546392	120511

Annexe 7 ^(1/2) : Test de corrélation de la trousse de dosage de vitamine D Roche® versus Diasorin

38	8,56	11,17	2,61	2,61	30,49065421	120511
39	25,4	22,67	-2,73	2,73	-10,7480315	120511
40	22,8	21,5	-1,3	1,3	-5,701754386	120511
41	18,4	26,09	7,69	7,69	41,79347826	120511
42	16,6	20,91	4,31	4,31	25,96385542	120511
43	11,3	12,27	0,97	0,97	8,584070796	120511
44	13,9	13,16	-0,74	0,74	-5,323741007	120511
45	30,4	39,62	9,22	9,22	30,32894737	120511
46	30	28,5	-1,5	1,5	-5	120511
47	11,4	10,75	-0,65	0,65	-5,701754386	120511
48	32,3	43,25	10,95	10,95	33,90092879	120511
49	16,6	27,25	10,65	10,65	64,15662651	120511
50	17	23,98	6,98	6,98	41,05882353	120511
51	4	9,26	5,26	5,26	131,5	120511
52	18,7	30,03	11,33	11,33	60,58823529	120511
53	4,55	11,93	7,38	7,38	162,1978022	120511
54	18,9	24,02	5,12	5,12	27,08994709	160511
55	14,8	14,81	0,01	0,01	0,067567568	160511
56	4,99	7,43	2,44	2,44	48,89779559	160511
57	29,8	41,23	11,43	11,43	38,3557047	160511
60	25,1	35,33	10,23	10,23	40,75697211	160511
61	31,5	29,01	-2,49	2,49	-7,904761905	160511
62	32,4	45,65	13,25	13,25	40,89506173	160511
64	22,3	29,32	7,02	7,02	31,47982063	160511
65	31,7	27,16	-4,54	4,54	-14,32176656	170511
66	13,7	14,5	0,8	0,8	5,839416058	170511
67	21	19,68	-1,32	1,32	-6,285714286	170511
68	33,7	27,87	-5,83	5,83	-17,29970326	170511
69	33,8	36,32	2,52	2,52	7,455621302	170511
70	12,3	16,99	4,69	4,69	38,1300813	170511
71	24,2	25,02	0,82	0,82	3,388429752	170511
72	27,2	26,78	-0,42	0,42	-1,544117647	170511
73	19,9	18,01	-1,89	1,89	-9,497487437	170511
74	19,8	19,02	-0,78	0,78	-3,939393939	170511
75	22,4	23,16	0,76	0,76	3,392857143	170511
76	17,1	22,3	5,2	5,2	30,40935673	170511
77	22	32,28	10,28	10,28	46,72727273	170511
78	30,9	26,65	-4,25	4,25	-13,75404531	170511
79	32,7	41,45	8,75	8,75	26,75840979	170511
80	17,4	21,95	4,55	4,55	26,14942529	170511
81	8,32	8,01	-0,31	0,31	-3,725961538	180511
82	25	28,21	3,21	3,21	12,84	180511
83	20,2	21,21	1,01	1,01	5	180511
84	22,1	26,88	4,78	4,78	21,62895928	180511
85	29,5	34,89	5,39	5,39	18,27118644	180511
86	29,6	18,32	-11,28	11,28	-38,10810811	180511
87	40,7	42,54	1,84	1,84	4,520884521	180511
88	22,8	18,46	-4,34	4,34	-19,03508772	180511
89	26,8	22,99	-3,81	3,81	-14,21641791	180511
90	12,7	14,08	1,38	1,38	10,86614173	180511
91	51,3	58,13	6,83	6,83	13,31384016	180511
92	23,4	30,42	7,02	7,02	30	180511

Annexe 7 (2/2) : Test de corrélation de la trousse de dosage de vitamine D Roche® versus Diasorin

Bibliographie

1. COFRAC. LAB GTA 04. Guide de validation des méthodes en biologie médicale. COFRAC, 2004.
2. COFRAC. LAB GTA 14. Guide d'évaluation des incertitudes de mesure des analyses de biologie médicale. COFRAC, 2006.
3. COFRAC. SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. COFRAC, 2010.
4. COFRAC. SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditations COFRAC, 2010.
5. GIROUD C, DUMONTET M, VASSAULT A, BRACONNIER F, FERARD G, Groupe de travail Assurance qualité-métrie de la SFBC. Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale (Document F). *Ann Bio Clin* 2007 ; 65 (2) : 185-200.
6. HOLICK MF Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007, 357 (3) : 266-281.
7. NF EN ISO 15189. Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR, 2007.
8. NF EN ISO/CEI 17025. Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. AFNOR, 2000.
9. NF ENV 13005. Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) AFNOR, 1999.
10. NF ISO 5725. Application de la statistique – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Parties 1-6. AFNOR, 1994.
11. PASSING H, BABLOK W A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983, 21 : 709-20.
12. PRENTICE A, GOLDBERG GR, SCHOENMARKERS I Vitamin D across the lifecycle : physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr*. 2008, 88(2) :500S-506S.
13. ROCHE® Fiche technique Vitamin D Total ref 05894913.

14. SOUBERBIELLE JC, BODY J, LAPPE JM, PLEBANI M, Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer; recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2010, 9(11) : 709-15.
15. STOCKL D, SLUSS P, THIENPONT L, Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clinica Chimica Acta.* 2009, 408 ; 8-13.
16. SZYMANOWICZ A, VASSAULT A, VAUBOURDOLLE M, Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. *Ann Bio Clin* 2010, Hors série Tome 1.
17. VASSAULT A, BAUD M, CASTAGNOER M, DUMONT G, INGRAND J, MERCIER M, MORIN JF, NAUDIN C (Commission « Validation de Technique de la SFBC et Groupe de travail SFBC / Corata « Comparaison de Techniques ») Recommandations pour la comparaison de techniques (document F). *Ann Biol Clin* 1992, 50, 727-730.
18. VASSAULT A, DUMONT G, LABBE D, Définitions des critères de qualités d'une méthode d'analyse. *Le Moniteur Internat* 1992, 26, 20-33.
19. VASSAULT A, GRAFMEYER D, NAUDIN C, DUMONT G, BAILLY M, HENNY J, GERHARDT MF, GEORGES P et les membres de la commission « Validation de Techniques » de la SFBC, Protocole de validation de techniques (Document B), *Ann Biol Clin* 1986, 44, 686-745.
20. VASSAULT A, GRAFMEYER D, DE GRAEVE J, COHEN R, BEAUDONNET A, BIENVENU J (Groupe de travail SFBC « Normes de validation du protocole de validation de techniques »), Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques, *Ann Biol Clin* 1999, 57, 585-95.
21. VOGESER M, KYRIATSOULIS A, HUBER E, KOBOLD U, Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25 Hydroxyvitamin D3 by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2004, 50 (8) : 1415-1417.