

**Université Pierre et Marie Curie
Paris 6**

DU « Assurance Qualité au laboratoire de Biologie Médicale »

2011 - 2012

VALIDATION D'UNE METHODE QUANTITATIVE PORTEE B

Application au dosage des Vitamines A et E par CLHP

Natalia Ermak

Hôpital Necker - Enfants Malades
Paris

Présentation des lieux

Laboratoire de Biochimie Générale

Services du PBPS

- Anatomie-Pathologie
- Bactériologie, Virologie, Parasitologie
- **Biochimie générale**
- Biochimie métabolique
- Histologie, Embryologie, Cytogénétique
- Génétique
- Hématologie biologique
- Immunologie biologique
- Pharmacie

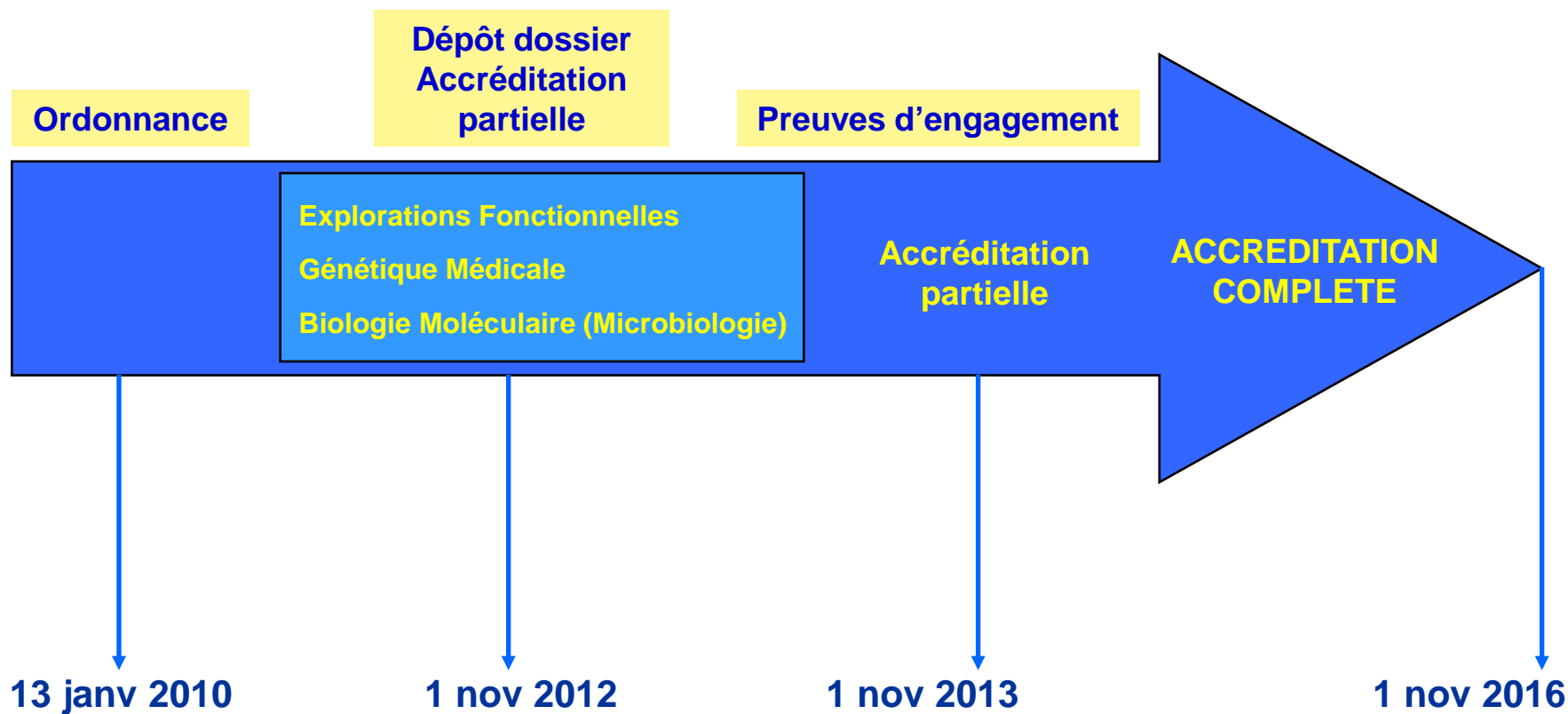
9 pôles d'activité médicale

- 1 – Pédiatrie générale et multidisciplinaire
- 2 – Médico-chirurgical pédiatrique
- 3 – Périnatalogie et cardiologie pédiatrique
- 4 – Imagerie
- 5 – **Biologie et produits de santé (PBPS)**
- 6 – Hématologie, immunologie, infectiologie
- 7 – Réanimations, urgences et anesthésies
- 8 – Rein, œil, cœur
- 9 – Santé publique et recherche clinique

Hôpital Necker – Enfants Malades
Paris

Stratégie du pôle Biologie et Produits de Santé

Accréditation : calendrier



Laboratoire à réponse rapide

Etat des lieux

Travaux de réaménagement depuis janvier 2012

Première étape de la réorganisation des laboratoires du site

Regroupement de l'ensemble des activités de biologie du site

Démarrage de la chaîne robotisée Abbott prévu le 22 octobre 2012



Secteur « CLHP – Vitamines A, E et C »

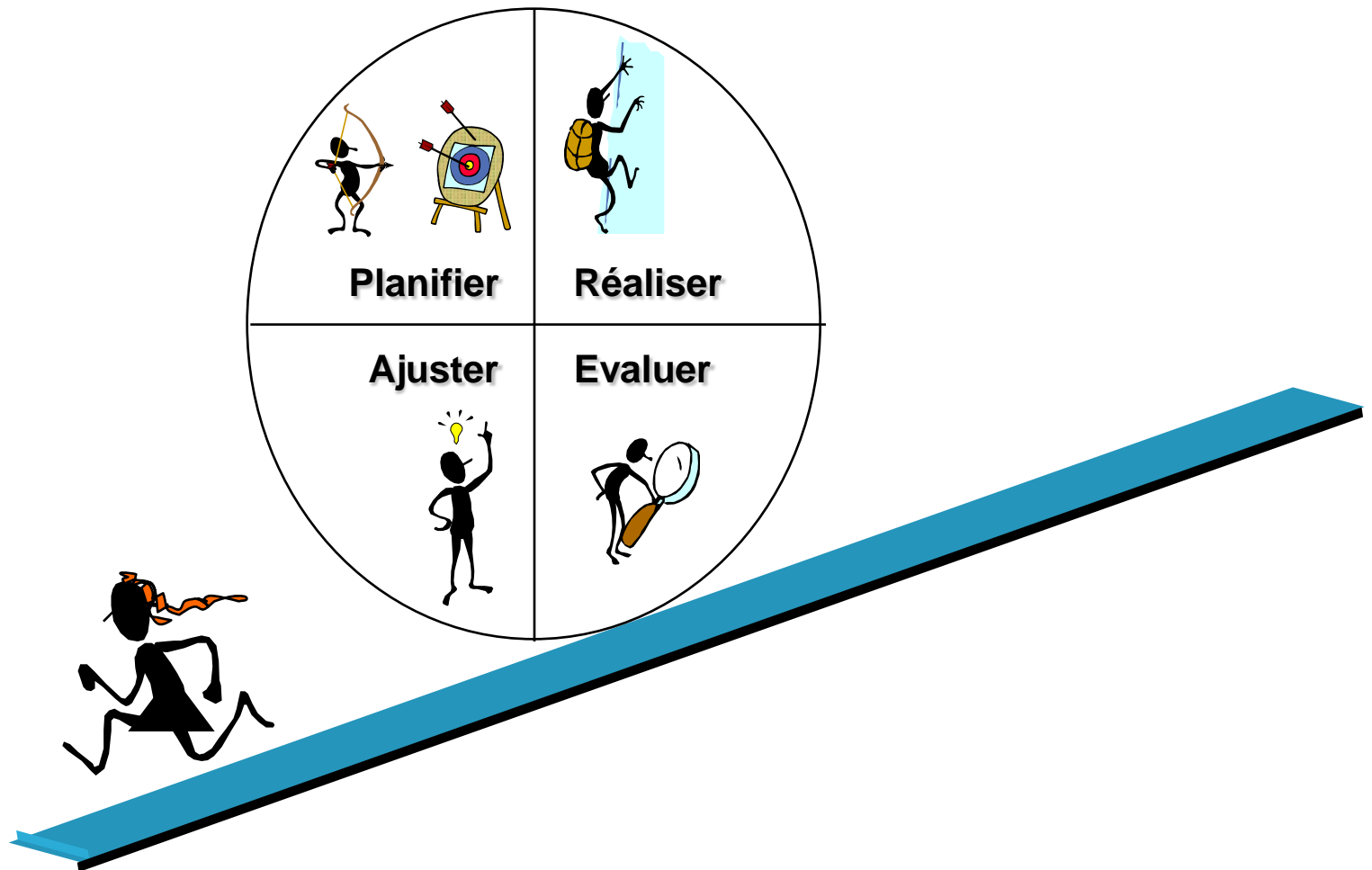
Objectif

➤ Optimisation du processus analytique dans le secteur de CLHP

- *Mise en place d'un injecteur automatique*
- *Changement de colonne de séparation*

➤ Validation et mise en routine de la nouvelle méthode de dosage des vitamines A et E par CLHP

La roue de Deming : **Plan** **Do** **Check** **Act**



1ère étape de la roue de Deming

PLANIFIER





Plan d'action

- **Effectuer des recherches bibliographiques**
- **Evaluer les ressources nécessaires pour le projet**
- **Définir les critères à étudier**

2ème étape de la roue de Deming

REALISER





Modules d'évaluation

- **Evaluation de la fidélité**

- Répétabilité
- Reproductibilité intra laboratoire (fidélité intermédiaire)

- **Domaine de mesure**

- Limite de détection
- Limites de linéarité

- **Inexactitude**

- **Comparaison de techniques**

Colonne	Phase mobile (v/v)
<i>utilisée</i> : Satisfaction 4,6 x 250 mm, granulométrie 5 µm	Méthanol (100)
<i>à tester</i> : Kinetex 4,6 x 75 mm, granulométrie 2,6 µm	Méthanol / Eau (97:3)



Descriptif de la méthode

Analyte / Mesurande	Vitamines A et E
Méthode de dosage	CLHP / UV
Matériel	Pompe P680 Dionex Injecteur automatique Waters 717 Plus Autosampler Colonne C18 Kinetex Phenomenex (4,6mmx75mm, 2,6µm) Détecteur UV 170U Dionex Intégrateur Chroméléon Dionex
Milieu biologique (additifs)	Plasma (héparinate de Na, Li ou NH ₄)
Prétraitement	Centrifugation - Déprotéinisation/éthanol - Extraction/hexane Evaporation/azote - L'extrait sec est repris dans l'éthanol
Unité	mg/l
Référence du réactif	Acétate de tocophérol, Sigma (ref. T 3001)
Type d'étalonnage	4 points / Etalonnage linéaire
Marquage CE	Oui

3^{ème} étape de la roue de Deming

EVALUER





Répétabilité

Vitamine A						
Echantillon (Etalon)	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	20	0,14	0,01	3,91	< 10	Validé
Niveau 2	20	0,29	0,01	3,67	< 10	Validé
Niveau 3	20	0,6	0,03	4,57	< 10	Validé
Niveau 4	20	1,25	0,04	3,02	< 10	Validé

Vitamine E						
Echantillon (Etalon)	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	20	2,6	0,09	3,46	< 10	Validé
Niveau 2	20	4,98	0,2	3,98	< 10	Validé
Niveau 3	20	10,27	0,27	2,6	< 10	Validé
Niveau 4	20	20,68	0,21	1,0	< 10	Validé



Reproductibilité

Vitamine A						
Echantillon (Etalon)	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	15	0,14	0,01	4,63	< 10	Validé
Niveau 2	15	0,29	0,01	4,14	< 10	Validé
Niveau 3	15	0,6	0,01	1,75	< 10	Validé
Niveau 4	15	1,22	0,02	1,53	< 10	Validé

Vitamine E						
Echantillon (Etalon)	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	15	2,57	0,12	4,7	< 10	Validé
Niveau 2	15	5,25	0,22	7,22	< 10	Validé
Niveau 3	15	10,65	0,33	3,1	< 10	Validé
Niveau 4	15	21,4	0,51	2,4	< 10	Validé



Inexactitude

Vitamine A

Echantillon (Sérum)	N SFVB	Valeurs observées (colonne Kinetex)		Valeur cible, $\mu\text{mol/l}$	Biais, $\mu\text{mol/l}$	Biais, (%)	Limites acceptable (Biais), %	Conclusion
		mg/l	$\mu\text{mol/l}$					
1	121	0,53	1,85	1,94	-0,09	-4,64	<10	Validé
2	122	1,03	3,58	3,90	-0,32	-8,21	<10	Validé
3	123	0,36	1,28	1,38	-0,10	-7,25	<10	Validé
4	126	0,39	1,36	1,47	-0,11	-7,48	<10	Validé
5	127	0,75	2,76	2,69	0,07	2,60	<10	Validé

Vitamine E

Echantillon (Sérum)	N SFVB	Valeurs observées (colonne Kinetex)		Valeur cible, $\mu\text{mol/l}$	Biais, $\mu\text{mol/l}$	Biais, (%)	Limites acceptable (Biais), %	Conclusion
		mg/l	$\mu\text{mol/l}$					
1	121	11,38	27,31	26,60	0,71	2,67	<10	Validé
2	122	20,95	50,28	47,50	2,78	5,85	<10	Validé
3	123	7,80	18,71	18,00	0,71	3,94	<10	Validé
4	126	8,03	19,27	18,40	0,87	4,73	<10	Validé
5	127	14,71	35,3	35,80	-0,50	-1,40	<10	Validé

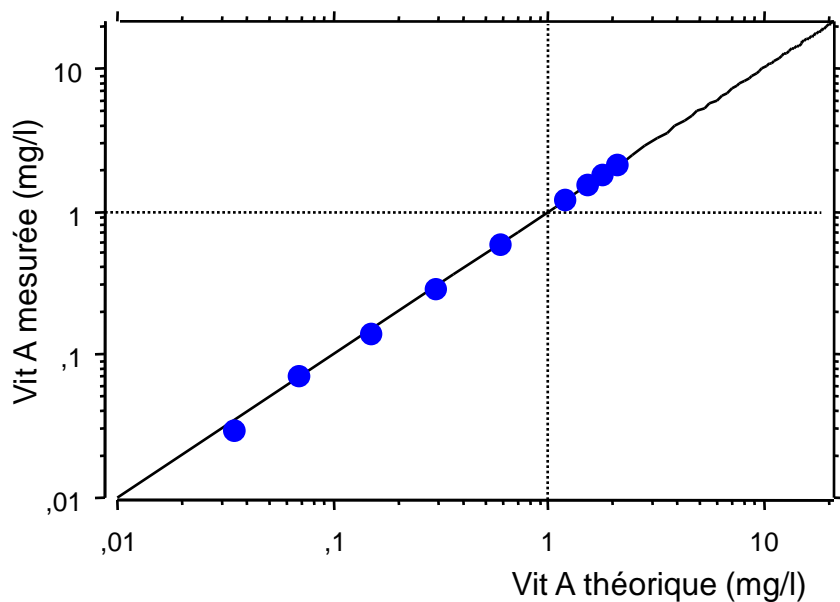


Domaine de mesure

- Limite de détection (LD)

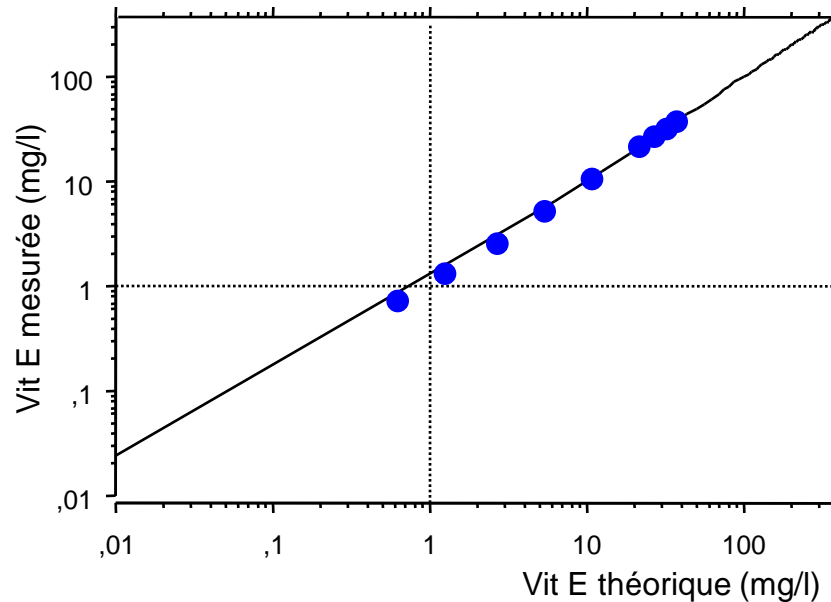
Vitamine A (mg/l)	LD = 0,002
Vitamine E (mg/l)	LD = 0,137

- Limites de linéarité



$$Y = -,013 + 1,024 * X; R^2 = 1$$

Vit A [0,04 – 2,15 mg/l]



$$Y = ,014 + 1,012 * X; R^2 = 1$$

Vit E [0,62 – 37,60 mg/l]

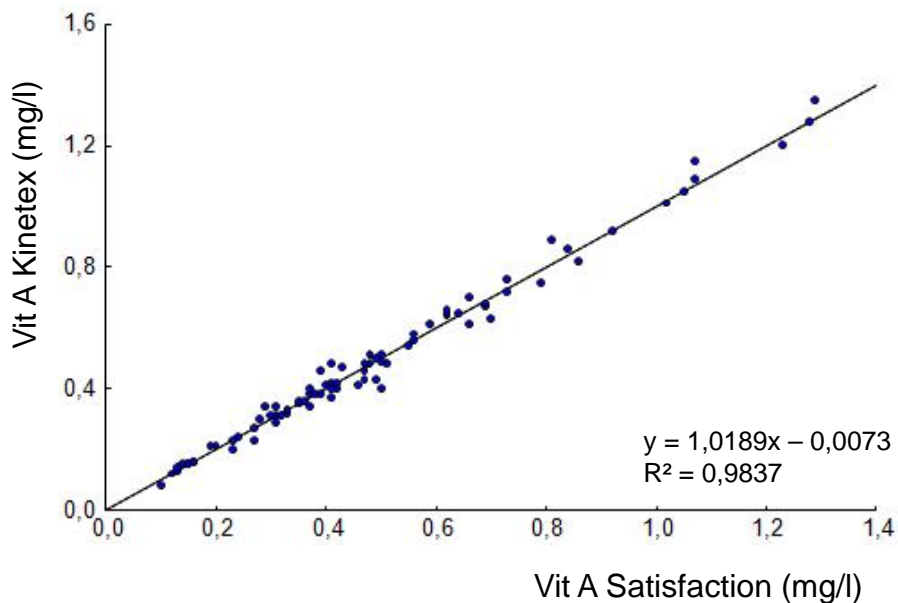


Comparaison de deux méthodes

Kinetex *versus* Satisfaction

Vitamine A : valeurs usuelles Ad de 0,42 à 0,68 mg/L

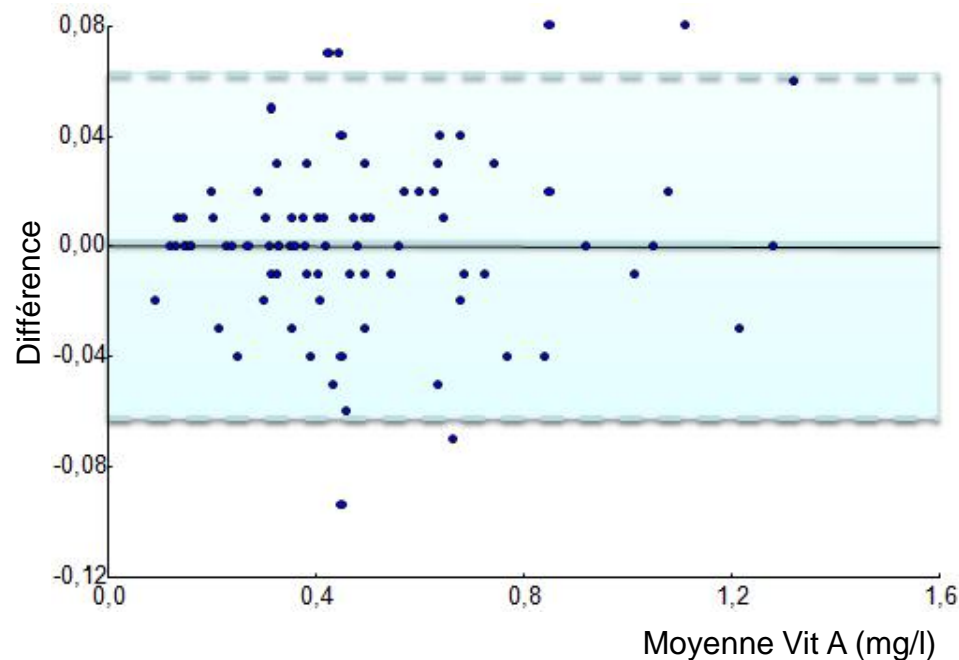
Régression de Passing & Bablok
N = 82



Pente = 1,000 [1,000 à 1,031]

Interception à l'origine = 0,000 [-0,010 à 0,000]

Diagramme des différences
N = 82



Différence moyenne : = 0,00134 [-0,00556 à 0,00824]

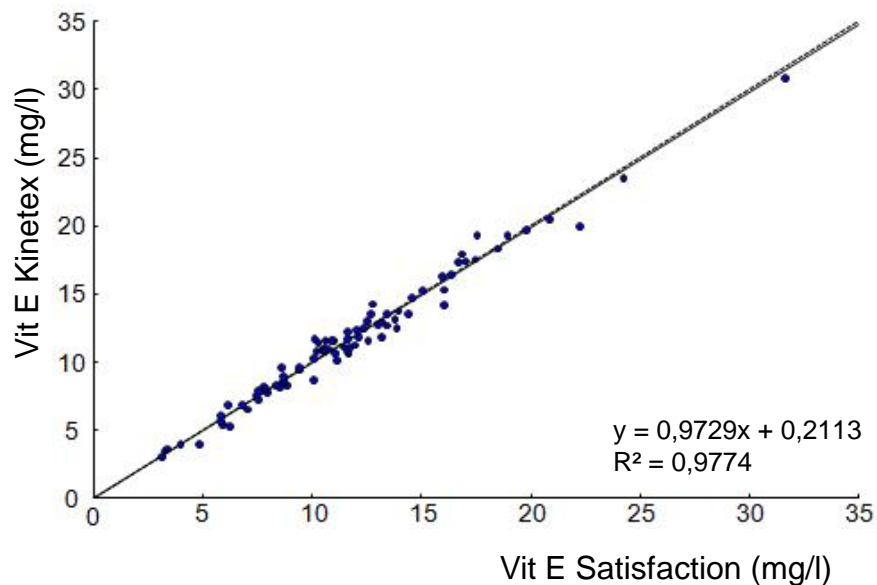


Comparaison de deux méthodes

Kinetex *versus* Satisfaction

Vitamine E : valeurs usuelles Ad de 6,6 à 12,9 mg/L

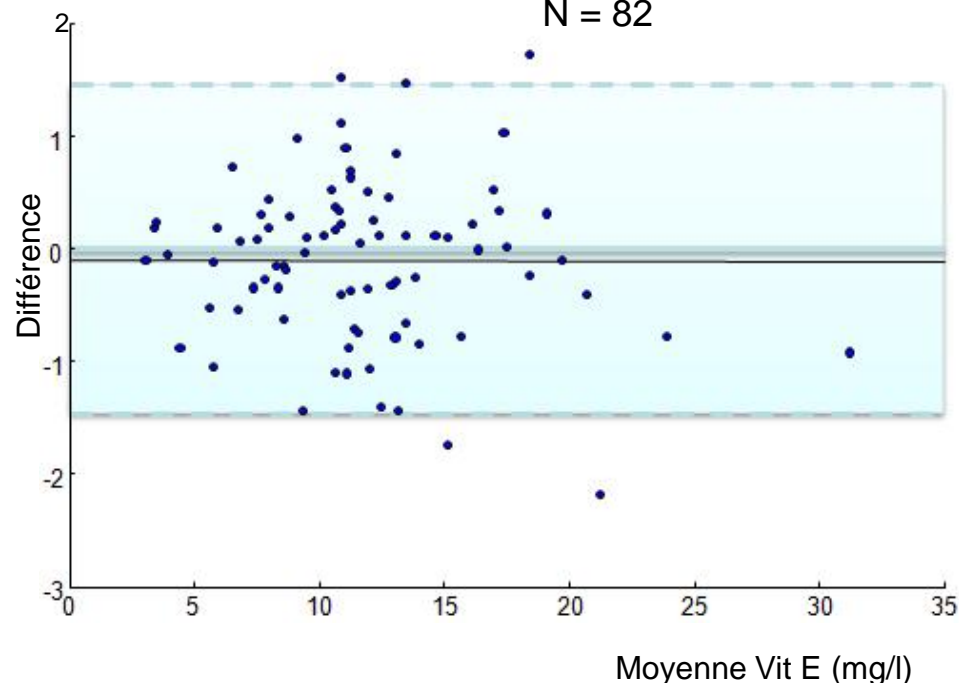
Régression de Passing & Bablok
N = 82



Pente = 0,993 [0,963 - 1,030]

Interception à l'origine = 0,0686 [-0,3137 à 0,3597]

Diagramme des différences
N = 82



Différence moyenne = -0,106 [-0,268 à 0,0555]

4^{ème} étape de la roue de Deming

AJUSTER





CONCLUSION

Objectif principal atteint

- ✓ Performances de la nouvelle colonne Kinetex confirmées
- ✓ Méthode mise en routine pour le dosage des vitamines A et E

Objectif à venir :

- Constitution du dossier de validation (SH FORM 43)
 - Evaluer la justesse (SH GTA 04)
 - Evaluer l'incertitude de mesure (SH GTA 14)



Remerciements...

Intervenants :

M. VAUBOURDOLLE
A. VASSAULT
P. PERNET
F. GERRIER
I. JAYET
A. PAULZE
F. ROUSSILLE
J. SIMONS
E. LLOPIS
L. BOSC...

