

**Université Pierre et Marie Curie
Paris 6**

**MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »**

**VERIFICATION D'UNE METHODE DE DETECTION COMBINEE DE
C.TRACHOMATIS ET *N.GONORRHOEAE* PAR BIOLOGIE
MOLECULAIRE**

MONFORT Laura

Année 2012

NOTE AU LECTEUR

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.

AUTEUR

MONFORT Laura
Biologiste Médicale
Laboratoire de Biologie Médicale
CNR des gonocoques
Institut Alfred Fournier
25 Boulevard Saint Jacques
75014 Paris

REMERCIEMENTS

Je remercie Mme Pozza, directrice de l'Institut Alfred Fournier, d'avoir accepté de me faire bénéficier de cette formation.

Je remercie mes collègues, Agathe Goubard et Patrice Sednaoui, d'avoir pallié à mon absence au laboratoire pendant ces jours de formation.

Je remercie le personnel du laboratoire pour sa disponibilité lors de la réalisation de ce travail.

Je remercie Nathalie Benaily pour ses excellents conseils.

Je remercie Sophie Grillère et Johan Nicolay de la société Gen-Probe pour leur coopération.

Je remercie l'ensemble des intervenants de ce Diplôme Universitaire pour la qualité de leur enseignement.

Je remercie les membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Enfin, je remercie ma famille, Jean-Claude, Julien et Chloé, pour leur patience durant les nombreuses heures que j'ai passées devant l'ordinateur.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	6
1. INTRODUCTION	7
1.1. Intérêts et objectifs	7
1.2. Présentation du laboratoire	8
1.2.1. L'Institut Alfred Fournier	8
1.2.2. L'activité	9
1.2.3. Les ressources humaines	9
1.3. La qualité au laboratoire	9
2. PRESENTATION DU TRAVAIL	11
3. METHODOLOGIE (P=PLANIFIER)	13
3.1. Moyens mis en œuvre	13
3.2. Rédaction de la procédure	13
3.3. Descriptif de la méthode	14
3.4. Etude bibliographique	15
3.5. Détermination des paramètres à évaluer	16
3.5.1. Fidélité	16
3.5.2. Fidélité intermédiaire	19
3.5.3. La justesse et l'incertitude de mesure	20
3.5.4. Evaluation et maîtrise des facteurs d'incertitude	21
3.5.5. Contamination entre échantillons	25
3.5.6. Comparaison avec la méthode déjà utilisée	25
4. VERIFICATION EXPERIMENTALE (D=REALISER)	27
5. RESULTATS – DISCUSSION (C=EVALUER)	27
5.1. Fidélité	27
5.2. Fidélité intermédiaire	29
5.3. Contamination entre échantillons	32
5.4. Comparaison avec la méthode déjà utilisée	32
6. PERSPECTIVES (A=AJUSTER)	33
7. CONCLUSION	35
BIBLIOGRAPHIE	36
ANNEXES	38

GLOSSAIRE

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CEQ : Contrôle Externe de Qualité

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CT : *Chlamydia trachomatis*

CV : Coefficient de Variation

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

IST : Infections Sexuellement Transmissibles

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

GC : Gonococcus (*Neisseria gonorrhoeae*)

RLU : Relative Light Unit (Unité Relative de Lumière)

SFBC : Société Française de Biologie Clinique

STM : Sample Transport Medium (Milieu de transport d'échantillon)

TMA : Transcription Mediated Amplification (Amplification par transcription)

1. INTRODUCTION

1.1. Intérêts et objectifs

La réforme de la biologie médicale décrite dans l'ordonnance du 13 janvier 2010 (1) mentionne que tout laboratoire de biologie médicale (LBM) ne peut réaliser d'examen sans accréditation. Le but ultime d'une démarche d'accréditation est l'instauration de la confiance dans les prestations réalisées, l'accréditation devant représenter le dernier niveau de contrôle de la conformité et de son évaluation du point de vue de la compétence technique et des soins prodigués au patient.

L'accréditation au LBM est établie par rapport à la norme NF EN ISO 15189 (2) qui précise les exigences particulières concernant la qualité et la compétence.

Le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) est le seul organisme en France habilité à délivrer l'accréditation d'un LBM.

L'arrêté du 14 décembre 2010 (3) définit les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation et la rend obligatoire en deux étapes :

Au 1^{er} novembre 2013, les LBM devront faire la preuve de leur entrée dans la démarche, et au 1^{er} novembre 2016, l'accréditation devra être obtenue pour tous les examens, du pré- au post-analytique.

Cet arrêté précise que le dossier envoyé au COFRAC doit comporter ces quatre éléments:

- « – trois dossiers de vérification de méthode portant sur des méthodes quantitatives et qualitatives. Celles-ci peuvent être incluses dans la portée d'accréditation partielle ;
- la preuve de l'abonnement à des programmes d'évaluation externe de la qualité des résultats auprès d'organismes d'évaluation externe de la qualité pour au moins la moitié des examens de biologie médicale qu'il réalise ;
- une description de l'activité du laboratoire qui n'entre pas dans sa portée d'accréditation partielle. Cette description est faite au moyen des documents de demande d'accréditation disponibles sur le site internet du Comité français d'accréditation ;
- un calendrier prévisionnel conduisant à une accréditation sur la totalité de son activité avant le 1^{er} novembre 2016. »

Le sujet de ce mémoire est la vérification des performances d'une méthode de biologie moléculaire pour la détection simultanée de deux bactéries pathogènes sexuellement

transmissibles, *C. trachomatis* (CT) et *N. gonorrhoeae* (GC). Il porte donc sur le premier de ces éléments.

Ce travail va me permettre d'acquérir des connaissances et une expérience dans le domaine analytique de la vérification des performances d'une méthode. Cet acquis sera transmis et diffusé aux techniciens et biologistes du laboratoire concernés par ce processus dans le but de l'appliquer à l'ensemble des techniques utilisées.

D'autre part, l'objectif de ce travail est de satisfaire aux exigences de la norme et permettra de fournir un des éléments obligatoires, cités ci-dessus, du dossier d'entrée dans la démarche d'accréditation pour 2013.

Après la présentation du laboratoire, le mémoire, structuré en roue de Deming, explique la méthodologie utilisée pour cette étude de vérification des performances de la méthode. Puis, il décrit les modalités de réalisation des tests d'évaluation effectués. Suivent ensuite les résultats, la discussion de ces résultats et les perspectives que ce travail a suscitées.

1.2. Présentation du laboratoire

1.2.1. L'Institut Alfred Fournier

L'Institut Alfred Fournier est une association loi 1901 déclarée d'utilité publique.

Il a été créé par Alfred Fournier (1832-1914), professeur agrégé titulaire de la chaire des maladies cutanées et syphilitiques de l'hôpital Saint Louis, chaire créée pour lui en 1879. Il fonda la « Société française de Prophylaxie Sanitaire et Morale » en 1901, lieu de prévention, de soins et d'enseignement sur les maladies infectieuses, travaillant en étroite collaboration avec le service de dermatologie de l'hôpital Saint-Louis. En 1923, le Professeur Janselme, successeur d'Alfred Fournier, fonda « la ligue nationale contre le péril vénérien », installée dans l'immeuble actuel, construit pour cette activité et inauguré le 9 mai 1932.

L'Institut Alfred Fournier est aujourd'hui un centre de Santé spécialisé dans les infections sexuellement transmissibles (IST). Il est articulé sur trois secteurs :

- Les consultations médicales (médecine générale, médecine des voyages, gynécologie, dermatologie, andrologie, infectiologie) et l'imagerie (échographie et mammographie).
- La consultation de dépistage anonyme et gratuite (CDAG) et la consultation d'information, de diagnostic et de dépistage des IST (CIDDIST).

- Le laboratoire polyvalent, Centre National de Référence des gonocoques.

1.2.2. L'activité

Le laboratoire accueille les patients provenant des consultations médicales de l'Institut mais également ceux provenant des consultations de ville ou d'hôpitaux.

Il présente une activité polyvalente qui permet de répondre aux demandes de la plupart des analyses fréquemment prescrites en biochimie, hématologie, hémostase, hormonologie, immunologie, bactériologie, virologie, mycologie, parasitologie et spermologie. L'activité de l'Institut étant orientée vers les infections sexuellement transmissibles, la majorité des examens effectués sur place sont du domaine de la bactériologie, de la virologie et de la sérologie bactérienne et virale.

Un contrat de collaboration a été établi avec le laboratoire Biomnis® pour pallier les demandes des analyses non pratiquées.

En outre, il a établi des conventions avec les centres de planification du Val-de-Marne, de l'Essonne et des Hauts-de-Seine, ainsi qu'avec une clinique parisienne, structures médicales pour lesquelles il effectue les examens microbiologiques.

1.2.3. Les ressources humaines

L'effectif du laboratoire est composé d'un biologiste responsable (à temps-plein), deux biologistes médicaux (à temps-plein), une biologiste qualicienne (présente un jour par semaine), douze technicien(ne)s (à temps-plein), un stagiaire qualité, trois infirmières (deux à temps-plein et une à mi-temps), quatre secrétaires (à temps-plein) un agent d'entretien à temps-plein mais dont l'activité est partagée avec les autres secteurs de l'Institut.

L'organigramme du laboratoire figure en annexe I.

1.3. La qualité au laboratoire

L'implication du laboratoire dans la démarche qualité est très récente, elle date de 2010. En accord avec la direction de l'Institut, la première étape fut l'inscription à l'association Bio Qualité®, quelques mois avant la parution de l'arrêté du 14 décembre 2010 (3). Parallèlement, de sa propre initiative, la biologiste responsable de la qualité a déposé sa

candidature pour suivre le D.U. Paris 6 « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale ». Pour faciliter, en priorité, la gestion des documents et des non-conformités, un logiciel qualité (Kalilab®) a été acquis en mars 2011. En septembre 2010, une stagiaire qualité en contrat d'alternance a été recrutée pour une durée d'un an. Elle a terminé son contrat fin août 2011.

La biologiste responsable de la qualité a quitté l'Institut fin avril 2011. J'ai alors proposé à la direction de l'Institut et du laboratoire de devenir responsable qualité et ai demandé à bénéficier pour cela de la formation du D.U. qualité.

En février 2012, une stagiaire qualité en licence professionnelle a été embauchée pour 5 mois. Sa tâche principale a été d'intégrer dans Kalilab® notre système documentaire. En mars 2012, une biologiste qualitiennne a été engagée pour une journée par semaine dans le but de piloter notre démarche. En octobre 2012, un stagiaire qualité en contrat d'alternance a été embauché pour un an.

Aujourd'hui, après ces nombreux bouleversements et interruptions dans le déroulement de la démarche qualité, nous commençons à utiliser Kalilab® en 2012 pour la gestion documentaire, la gestion des non-conformités et la gestion des stocks. Des réunions et formations internes sont organisées pour sensibiliser et faire participer tout le personnel du laboratoire.

L'installation de la démarche qualité au laboratoire n'est pas chose aisée. Elle nécessite des investissements humains, matériels et l'implication de tous. C'est probablement ce dernier point qui est le plus difficile à atteindre. Les mentalités doivent évoluer: de la rigueur à chaque étape du déroulement des processus d'une analyse dans le strict respect des procédures; éviter la transmission orale, apprendre à tout écrire et à tout tracer; reconnaître les dysfonctionnements et acter les actions correctives pour ne plus qu'ils se reproduisent (non-conformités); ne pas perdre de vue que la qualité ne s'arrête jamais mais consiste en une amélioration continue et infinie (roue de Deming) pour tendre vers la satisfaction du patient et du prescripteur (enquêtes de satisfaction), mais aussi celle du personnel du laboratoire. Il faut pour cela évaluer le travail et les compétences (évaluations, audits, revue de direction, revue de contrat). Cela demande beaucoup de travail, des investissements et des formations plus ou moins coûteuses, et prendra plusieurs années.

Notre démarche est donc bien entamée, la direction nous soutient, il semble que le laboratoire bénéficie maintenant des conditions pour réussir ce vaste projet qu'est l'accréditation.

Le laboratoire étant inscrit à l'association Bio Qualité[®], nous avons choisi la voie B de l'arrêté du 14 décembre 2010 (3) pour constituer notre dossier d'entrée dans la démarche d'accréditation. Cette voie permet au laboratoire de bénéficier d'un délai de 6 mois (31 mai 2013 au lieu du 31 octobre 2012) pour envoyer le dossier d'accréditation partielle au COFRAC. Le dossier pour la qualification Bio Qualité[®] doit être prêt pour la fin de l'année et il est prévu de l'envoyer courant novembre 2012 de façon à obtenir l'attestation de qualification pour mai 2013.

2. PRESENTATION DU TRAVAIL

Le sujet de ce mémoire est la vérification des performances d'une méthode de biologie moléculaire pour la détection simultanée de deux bactéries pathogènes sexuellement transmissibles, *C. trachomatis* (CT) et *N. gonorrhoeae* (GC). Il a été choisi pour satisfaire à plusieurs exigences :

- Celles de la norme EN ISO 15189 (2) qui mentionne :
au chapitre 5.3.2. :

« Il doit être démontré (lors de l'installation et au cours de l'utilisation courante) que le matériel est capable d'atteindre les performances requises et qu'il est conforme aux spécifications se rapportant aux analyses concernées. »

et au chapitre 5.5.2. :

« Le laboratoire doit utiliser uniquement des procédures validées pour s'assurer qu'elles conviennent à l'utilisation prévue. Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaires pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné(e). Le laboratoire doit enregistrer les résultats obtenus et la procédure utilisée pour la validation. »

- Celles de l'arrêté du 14 décembre 2010 (3) qui mentionne que le dossier de vérification d'entrée dans la démarche d'accréditation doit comporter trois dossiers de vérification de méthode portant sur des méthodes quantitatives et qualitatives.

Enfin, à titre personnel, ce thème m'a intéressée parce qu'il s'agit du domaine de l'analytique qui est le cœur du métier de biologiste, dans le secteur de biologie moléculaire dont je suis responsable. De plus, aucune vérification de performances de méthode d'analyse telle qu'elle est décrite dans le guide technique d'accréditation SH GTA 04 (4) n'a encore été

pratiquée dans le laboratoire. Ce travail constitue donc un élément de référence pouvant être appliqué dans d'autres domaines d'analyses du laboratoire.

Pour mener à bien ce travail, j'ai suivi la démarche recommandée dans le guide SH GTA 04 (4) et j'ai utilisé la roue de Deming ou PDCA:

Planifier (to plan = P) : la planification du travail commence par la définition des moyens à mettre en œuvre pour la réalisation de cette activité. Cette étape sera abordée à l'aide de la méthode des 5M.

La planification se poursuivra dans un second temps par la rédaction de la procédure de vérification/validation de méthodes. Elle permet de définir les modalités et les actions à entreprendre pour réaliser cette activité (cf. annexe II). Celle-ci indique qu'après avoir bien défini la méthode, il faut procéder à une étude bibliographique afin de savoir s'il existe des documents ou publications concernant la vérification ou validation des performances de la méthode. Ces documents nous aideront à définir les paramètres à évaluer, leurs critères d'acceptabilité et la méthodologie utilisée.

Réaliser (to do = D): une fois établies les modalités de réalisation, la vérification expérimentale sera effectuée en mai et juin.

Vérifier (to check = C): en juin, les résultats obtenus seront exploités, analysés et les conclusions seront établies.

Ajuster (to act = A): au final, il s'agira de déterminer s'il existe des axes d'amélioration pour la réalisation d'une vérification de performances d'une méthode d'analyse.

date	action	Responsable(s) de l'action
mars	Rédaction de la procédure Recherche bibliographique Détermination des critères de performance à évaluer	Biologiste – Technicienne Biologiste Biologiste
avril	Recherche d'un contrôle externe de qualité	Biologiste
Mai-juin	Vérification expérimentale Analyses des résultats	Technicienne Biologiste – Technicienne - Responsable technique Gen- Probe®

3. METHODOLOGIE (P = PLANIFIER)

Le guide SH GTA 04 (4) est un outil indispensable pour la réalisation des validations ou vérifications des performances analytiques d'une méthode. Il procède en une démarche logique dont je me suis inspirée pour structurer le travail en roue de Deming.

3.1. Moyens mis en œuvre

Pour cette étude, il a fallu d'abord déterminer les ressources dont nous avons besoin pour la réaliser.

La méthode : La méthode de détection simultanée de *C. trachomatis* (CT) et *N. gonorrhoeae* (GC) commercialisée par la société Gen-Probe® sous le nom de Aptima Combo 2® est une méthode donnant un résultat qualitatif extrapolé à partir de la mesure d'un signal quantifiable en RLU (Relative Light Unit) avec interprétation par rapport à un seuil fixe. Elle est donc assimilée à une méthode quantitative selon les critères du guide SH GTA 04 (4).

La matière : les tests de validation ont été pratiqués sur des échantillons de panels fournis par le fournisseur. Nous verrons plus loin les raisons qui ont motivé ce choix.

Le matériel : les dosages ont été réalisés en utilisant les réactifs spécifiques à la technique sur l'automate Panther® (cf. annexe III) de la société Gen-Probe®. Pour les calculs, nous avons utilisés l'application Excel® de Microsoft® disponible au laboratoire.

La main d'œuvre : pour préparer et réaliser l'étude, une technicienne, la biologiste qualicienne et le responsable technique de Gen-Probe® ont été sollicités.

Le milieu : les tests ont été réalisés au laboratoire, dans la pièce où est installé l'automate.

3.2. Rédaction de la procédure de vérification d'une méthode

La procédure D1-PR02-01 intitulée « Vérification des performances d'une méthode d'analyse de type quantitatif (Portée A) » (cf. annexe II) a été rédigée à l'aide du SH GTA 04 (4), de l'article d'A. Vassault (5) et du modèle de procédure proposé par l'association Bio Qualité® (14). Par souci de clarté, deux procédures ont été écrites, une pour les méthodes quantitatives et une pour les méthodes qualitatives de façon à bien distinguer les paramètres à vérifier et les méthodologies dans chacun des deux cas. Ces deux procédures se rapportent uniquement à des techniques effectuées conformément aux recommandations du fournisseur, c'est-à-dire des techniques de portée A.

3.3. Descriptif de la méthode

La méthode choisie permet de détecter simultanément, en un seul dosage, l'ARN ribosomal de *Chlamydia trachomatis* (CT) et l'ARN ribosomal de *Neisseria gonorrhoeae* (GC), deux bactéries pathogènes sexuellement transmissibles. La technique, nommée Aptima Combo 2[®] commercialisée par la société américaine Gen-Probe[®], est une technique d'amplification d'ARN appelée TMA (Transcription Mediated Amplification). Cette détection est effectuée à l'aide d'un automate dédié, nommé Panther[®] (cf. annexe III), commercialisé par Gen-Probe[®]. C'est à l'Institut Fournier qu'a été installé le premier automate Panther[®] au monde, en décembre 2010. En juin 2012, il existe une vingtaine d'automates Panther[®] en fonctionnement, principalement en Europe.

La recherche de *Chlamydia trachomatis* (CT) et *Neisseria gonorrhoeae* (GC) s'effectue à partir de prélèvements cervico-vaginaux, d'auto-prélèvements vaginaux ou à partir de premier jet d'urine. Les écouvillons ayant servi au prélèvement sont immédiatement introduits par le préleveur dans un tube contenant un milieu spécifique de transport et de conservation appelé STM (Sample Transport Medium). Lorsque l'on dispose d'un premier jet d'urine, un aliquote est transféré dans un tube spécifique pour le test urinaire contenant ce même milieu de transport. Les échantillons ainsi obtenus sont acheminés vers l'automate Panther[®]. Il s'agit d'un automate complet de biologie moléculaire qui gère la totalité de la phase analytique : les tubes bouchés sont placés tels quels dans le portoir réservé aux échantillons placés à la suite de deux tubes de contrôle : un contrôle positif pour CT et négatif pour GC, et un contrôle négatif pour CT et positif pour GC. Une série peut comporter plusieurs portoirs échantillons. Un seul couple de contrôles sur le portoir en début de série est préconisé par le fabricant. L'automate peut fonctionner en chargement continu mais pour des raisons d'organisation, le travail par série a été préféré. Les bouchons des tubes comportent une particularité: la partie supérieure est une feuille d'aluminium percée, lors du pipetage par l'automate, par un embout à usage unique. Les portoirs sont introduits dans l'automate. Les réactifs sont ensuite chargés. Le processus analytique est lancé. Dans l'automate, les réactions se font par série de cinq tubes. Les cinq premiers résultats sont disponibles en trois heures trente, puis cinq autres toutes les 5 minutes, sans aucune autre intervention humaine. Les résultats sont automatiquement interprétés par le logiciel de l'automate. Ils sont exprimés en RLU (Relative Light Unit) et rendus négatif, positif ou équivoque par rapport à un seuil fixe défini par le fournisseur. Pour chaque échantillon, une seule valeur de RLU pour deux interprétations distinctes est rendue par le logiciel de l'automate: une pour *Chlamydia trachomatis* (CT) et une pour *Neisseria gonorrhoeae* (GC) (cf. annexe IV).

La méthode répond donc à la définition d'une méthode quantitative telle qu'elle est décrite dans le guide SH GTA 04 (4). Le déroulement des phases pré-analytique et analytique s'effectue en suivant intégralement les préconisations du fournisseur. Ainsi, il s'agit d'une technique adoptée sans aucune adaptation, ce qui correspond aux critères d'une portée A flexible.

Au laboratoire, cette technique est utilisée sur l'automate Panther[®] depuis janvier 2011. A cette période, la méthode avait été validée uniquement en procédant à une comparaison de résultats avec la technique précédemment utilisée, la technique Aptima Combo 2[®] semi-automatique effectuée à l'aide d'un incubateur, d'une laveur et d'un lecteur. Les résultats discordants avaient été analysés. Il n'avait pas été établi les graphes des différences, quotients et droite de régression. Les résultats de cette comparaison, complétés des graphes, seront présentés dans ce mémoire avec l'ensemble des autres paramètres testés.

3.4. Etude bibliographique

Les paramètres à évaluer varient en fonction du type de méthode et du type de portée (cf. annexe V). Dans le cas d'une technique quantitative de portée A, les paramètres recommandés pour vérifier les performances sont la spécificité analytique, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), la justesse, l'incertitude de mesure, la contamination entre échantillons, les interférences (si nécessaire), l'intervalle de référence, la comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire.

De façon à savoir si les critères de performances de la méthode avaient déjà été évalués, j'ai effectué une recherche bibliographique. Les publications portent sur des évaluations cliniques et des comparaisons de sensibilité et spécificité des techniques de détection combinée de CT et GC: par exemple, en 2003, la technique Aptima Combo 2[®] a été évaluée sur des échantillons d'urine et de prélèvements endo-cervicaux par rapport à deux autres techniques (une technique combinée et une technique de détection de CT) chez des patientes symptomatiques et asymptomatiques (6). Les résultats de sensibilité et spécificité obtenus étaient comparables ou supérieurs à ceux des autres techniques. Depuis 2003, les techniques de détection combinée de CT et GC se sont développées. En 2012, plusieurs études de comparaison de la technique Aptima Combo 2[®] avec d'autres techniques de détection combinée ont été publiées (7,8,9). Elles ont été menées sur différents types d'échantillons: urine d'hommes et de femmes, écouvillons endo-cervicaux, auto-prélèvements vaginaux, prélèvements urétraux chez l'homme. La technique Aptima Combo 2[®] a été réalisée sur un système semi-automatique ou un système totalement

automatisé appelé Tigris[®]. Le système Panther[®] n'a pas encore fait l'objet de publication. Les résultats des calculs de sensibilité et spécificité montrent que les techniques sont très performantes et comparables chez les patient(e)s symptomatiques ou asymptomatiques.

Ainsi, ces publications vont permettre de compléter le dossier de vérification de cette méthode en ce qui concerne la spécificité, conformément aux recommandations du guide SH GTA 04 (cf. annexe V).

En revanche, à ce jour, il n'existe pas de documents provenant de sociétés savantes de biologie clinique ou de microbiologie, telles que la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), qui fournissent des recommandations spécifiques ou des données précises sur l'évaluation de la répétabilité, reproductibilité et les autres paramètres pour la validation et la vérification des méthodes de détection combinée de CT et GC.

Pour déterminer les paramètres à évaluer et définir les critères d'acceptabilité, la seule source disponible actuellement sont les données du fournisseur. J'ai donc exploité la notice technique (10) de la méthode Aptima Combo 2[®]. Celle-ci contient des résultats de tests de validation de la technique effectués par la société Gen-Probe[®]. Ces données ont servi de référence pour effectuer la vérification de performances et fixer les limites d'acceptabilité.

3.5. Détermination des paramètres à évaluer

3.5.1. Fidélité

Ce test a pour objectif de vérifier qu'une technique donne la meilleure performance possible dans des conditions standardisées en évaluant la dispersion des résultats obtenus pour un même échantillon analysé plusieurs fois dans un délai le plus court possible (donc dans une même série d'analyse), avec un même lot de réactifs, un même opérateur et le même étalonnage. La technique doit donner des résultats dont la variabilité sera jugée acceptable au regard de l'utilisation de la technique. Pour cela, il convient de définir des limites d'acceptabilité (écart-type et coefficient de variation) en fonction de l'état de l'art (sociétés savantes, publications, données du fournisseur) et de la pertinence clinique. Les résultats obtenus lors de ce test seront comparés à ces limites. Les limites d'acceptabilité choisies sont celles données par le fournisseur dans sa notice technique (10).

Dans le guide SH GTA 04 (4), il est recommandé de procéder à 30 déterminations pour une analyse statistique optimale. Il est précisé que ce chiffre peut être modulé en fonction de la cadence de l'analyseur et du coût des réactifs. Il convient habituellement d'effectuer ces

dosages à l'aide de contrôle interne de qualité (CIQ) et à 2 niveaux de concentration (un niveau faible et un fort). Si l'on veut suivre ces recommandations pour notre technique, plusieurs adaptations doivent être envisagées.

Le volume de l'échantillon: il doit être suffisant pour effectuer 30 déterminations. Or, la technique à évaluer dispose de CIQ sous forme de tubes de 1,9 ml. La prise d'essai est de 400µl. Selon les recommandations de la notice technique (10), chaque tube ne peut être utilisé que pour 3 dosages au maximum afin de respecter le volume mort nécessaire pour obtenir des résultats fiables. La solution adoptée est donc de travailler sur plusieurs tubes d'échantillons du même lot, introduisant un risque d'erreur systématique.

Le type d'échantillons: le guide SH GTA 04 (4) propose de travailler avec les échantillons de CIQ de concentration connue. Dans la notice technique de la méthode Aptima Combo 2[®] (10) figure un tableau des résultats de l'évaluation entreprise par le fournisseur (cf. annexe VI). Celle-ci comporte des tests de fidélité. Ces tests ont été pratiqués non pas sur des échantillons de CIQ mais sur des tubes de panels dont la concentration est connue. De façon à approcher au mieux les conditions des tests effectués par le fournisseur, nous avons décidé de travailler avec ces tubes de panels. De plus, chacun des deux CIQ fournis donne une valeur positive et deux interprétations : l'un est positif pour CT et négatif pour GC, l'autre est négatif pour CT et positif pour GC (cf. annexe IV). Le laboratoire ne dispose donc pas de CIQ négatif. Et enfin, les CIQ ont des titres qui ne correspondent pas à ceux des panels utilisés lors de l'évaluation du fournisseur. Ces panels se présentent sous forme de tube de 1,9 ml et présentent différents niveaux de concentration dans différents types de milieux, ainsi que différents types de cibles détectées (soit *C. trachomatis* (CT), soit *N. gonorrhoeae* (GC) soit les deux, soit aucune).

Le milieu: Les tests du fournisseur ont été effectués sur le milieu STM (Sample Transport Medium), l'urine ou le milieu PreservCyt[®] utilisé pour l'anatomie et la cytologie pathologiques. Les tubes de panels fabriqués par la société Gen-Probe[®] sont des tubes contenant du milieu STM auxquels ont été ajoutées des quantités définies de *C. trachomatis* (CT) et/ou de *N. gonorrhoeae* (GC) pour obtenir différentes concentrations. La société Gen-probe[®] ne dispose pas de tubes d'urine à tester de concentration en analyte(s) définie et le laboratoire n'utilise pas le milieu PreservCyt[®] pour cette méthode. De ce fait, l'étude a été effectuée sur le milieu STM.

Les niveaux de concentration: dans le milieu STM, la société Gen-Probe[®] a testé 11 niveaux de concentrations : 1 négatif, 3 positifs CT, 3 positifs GC, 4 positifs CT et GC. Ils figurent dans le tableau suivant :

Niveaux de Concentrations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CT (IFU/mL)	0	0.25	2.5	25	0	0	0	2.5	2.5	1000	1000
GC (CFU/mL)	0	0	0	0	12.5	125	1250	125	2500	2500	125

(IFU/mL : Inclusion Forming Unit/mL ; CFU/mL : Colony forming Unit/mL)

Le niveau 1 négatif (appelé panel A) et le niveau 8, positif pour les deux cibles (appelé panel D) ont été choisis. Ce dernier permet d'évaluer les deux analytes simultanément. Les valeurs de RLU étant environ le double de celles obtenues lors de la présence d'un seul de l'un ou l'autre analyte, il n'y a donc pas de doute entre la présence d'un seul analyte et la présence des deux.

Le panel D est un panel doublement positif que le fournisseur utilise pour des tests à l'installation des automates. L'idéal aurait été de choisir un niveau proche de la zone décisionnelle, mais la société Gen-Probe® ne dispose pas d'un panel de concentration proche de la limite de positivité. En effet, d'après la notice technique (10), les limites, exprimées en RLU, pour l'interprétation des résultats (négatif, positif ou équivoque) en fonction de l'absence ou de la présence de l'une ou l'autre ou les deux bactéries sont les suivantes :

	Négatif	Equivoque	Positif
CT/GC	1 à 84	85 à 249	250 à 4500

Le tableau de résultats des tests de la notice technique (cf. annexe VI) montre qu'aucune moyenne de RLU obtenue lors des dosages des 11 concentrations de panels n'est proche du seuil de 250.

Le nombre de déterminations : compte-tenu du coût des réactifs et des consommables ainsi que de la durée de l'analyse, l'étude a été limitée à 15 déterminations (soit 5 tubes) pour chacun des deux niveaux, c'est-à-dire la moitié du nombre de déterminations recommandées.

Exploitation des résultats : les calculs de moyenne (\bar{x}), d'écart-type (S) et de coefficient de variation (CV) seront effectués à l'aide du tableur Excel en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Moyenne} = \bar{x} = \sum_{i=1}^n x_i / n$$

$$\text{écart-type} = S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2} \qquad CV (\%) = \frac{S_{FI}}{\bar{x}} \times 100$$

x_i = résultats obtenus n = nombre de dosages

Limites d'acceptabilité: les limites d'acceptabilité fixées par le laboratoire sont celles obtenues par le fournisseur et figurent dans la notice technique (colonne « intra-série » du tableau en annexe VI): pour le test intra-série et le panel A, l'écart-type a été calculé à 1.02 et le CV à 15.7; pour le panel D, l'écart-type a été trouvé à 52.99 et le CV à 2.2. Il faut noter que ces valeurs ont été obtenues avec une méthodologie différente, selon les directives du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS EP5-A2) (11). Les opérateurs ont effectué deux séries d'analyses par jour, pendant 24 jours, chaque échantillon de panels étant présent en double dans les séries. Au total, le nombre de dosages par type de panel était de 96. Dans ce cas, les formules de calcul utilisées par le NCCLS diffèrent également (11).

3.5.2. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (appelée aussi reproductibilité) a pour but d'évaluer la dispersion des résultats obtenus en analysant le même échantillon mais dans des conditions opératoires différentes, en faisant varier au moins un des facteurs pouvant intervenir lors du déroulement de l'analyse d'une série à l'autre: le lot de réactifs, l'étalonnage, l'opérateur, le temps. L'échantillon doit donner des résultats situés dans les limites d'acceptabilité d'écart-type et de coefficient de variation définies.

Pour ce test, le guide SH GTA 04 (4) recommande d'effectuer 30 déterminations pour deux niveaux minimum. Pour ce paramètre également, la méthodologie a été adaptée.

Type d'échantillons, niveaux de concentration et milieu: le test sera effectué sur des tubes de panels. dans le tableau de la notice technique Aptima Combo2® présente les résultats de tests de reproductibilité effectués sur 11 niveaux de concentration, comme pour la répétabilité (colonne « d'une série à l'autre » du tableau en annexe VI). Les deux panels choisis sont les mêmes panels que pour la répétabilité, panel A (négatif) et panel D (positif pour CT et GC) en milieu STM.

Le nombre de déterminations: compte-tenu du coût des réactifs, l'étude a été limitée à 15 déterminations pour chacun des deux niveaux.

Exploitation des résultats: les modalités de calcul sont identiques à celles utilisées pour la répétabilité : calcul de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation.

Limites d'acceptabilité: pour le test effectué par le fournisseur (colonne « d'une série à l'autre » du tableau en annexe VI), les valeurs d'écart-type et de CV obtenues pour le panel A et le panel D sont zéro. Il y a une remarque en bas du tableau: «La variabilité de certains facteurs peut être numériquement négative, phénomène pouvant survenir si la variabilité due à ces facteurs est très minime. Dans ce cas, SD = 0 et CV = 0%». Ces résultats sont probablement liés à la méthodologie et aux formules de calcul employées. Nous ne disposons donc pas dans ce document de réelles valeurs d'écart-type et de CV pour effectuer une comparaison. D'après l'article de A.Vassault (12), un lien peut être établi entre la répétabilité et la reproductibilité à l'aide de la formule ci-dessous:

$$\text{CV reproductibilité} = 1,33 \times \text{CV répétabilité}$$

Cette formule sera appliquée pour notre méthode.

3.5.3. La justesse et l'incertitude de mesure

D'après le guide SH GTA 14 (13), la justesse peu s'évaluer de différentes façons:

- Soit à l'aide de matériaux de référence certifiés. Or, en biologie médicale il existe peu de matériaux de référence certifiés et notre technique en particulier n'en dispose pas.
- Soit à l'aide de contrôles internes de qualité (CIQ) externalisés ou, à défaut, en comparant les valeurs obtenues à partir d'échantillons d'évaluation externe de qualité (EEQ) aux valeurs cibles (moyennes de l'ensemble des participants).

Le calcul de l'incertitude de mesure est lié au calcul de la justesse. Il nécessite donc également d'avoir des résultats quantitatifs d'échantillons d'EEQ.

Depuis la mise en service de l'automate, le laboratoire ne dispose pas de contrôle externe de qualité (CEQ) pour cette méthode. Disposer d'un CEQ permet de contrôler et de prouver la qualité des résultats d'une méthode et de répondre aux exigences de l'arrêté du 14 décembre 2010 (3) qui stipule que le laboratoire doit apporter pour 2013 la preuve de l'abonnement à des programmes d'évaluation externe de la qualité des résultats auprès d'organismes d'évaluation externe de la qualité pour au moins la moitié des examens de biologie médicale qu'il réalise. Nous avons choisi d'intégrer cette technique dans le groupe des techniques du laboratoire qui disposent d'EEQ.

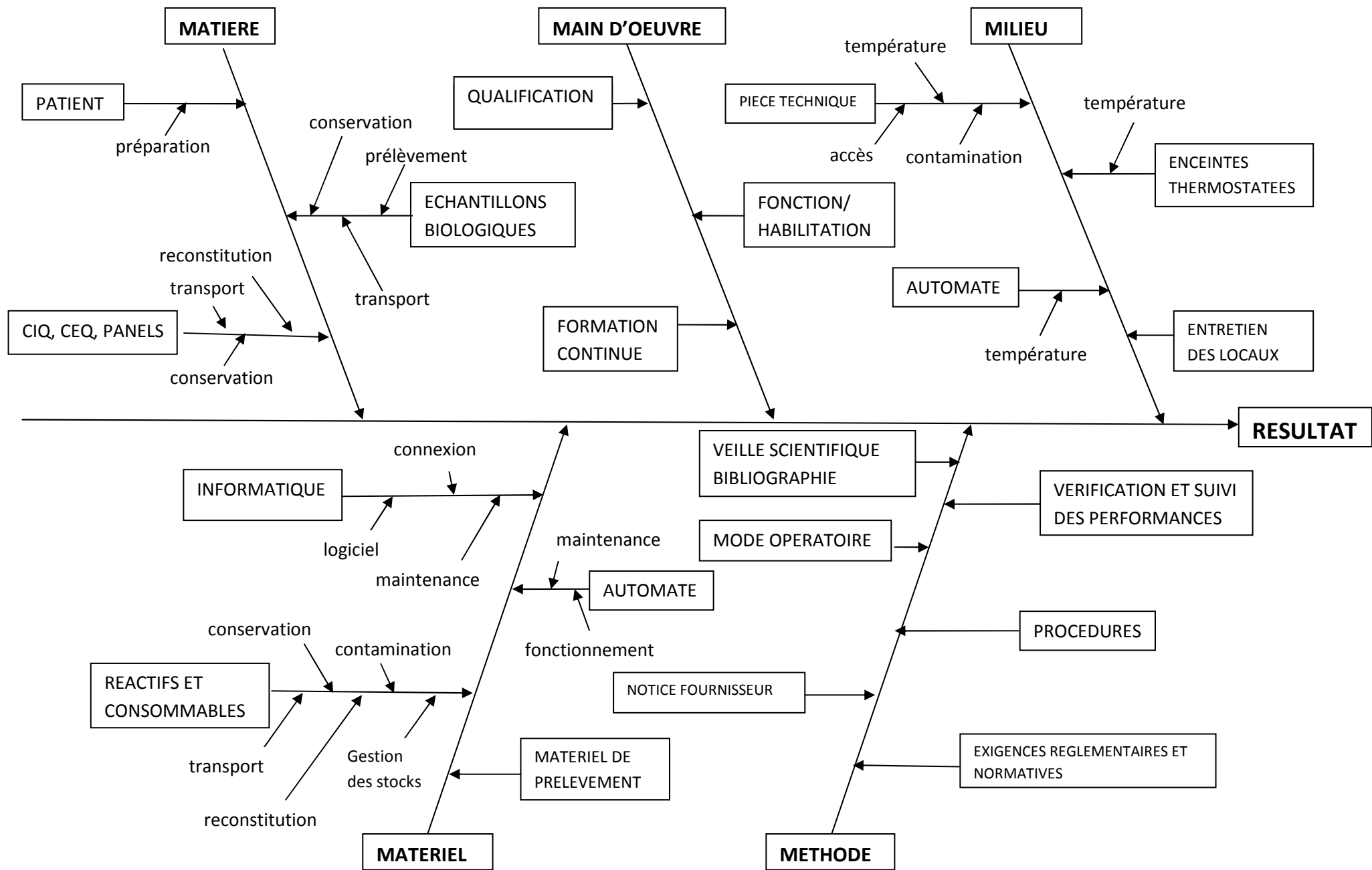
En avril, je me suis donc mise à la recherche d'un programme d'EEQ correspondant à notre technique. Trois fournisseurs ont été contactés: Biologie Prospective (BP), Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique (CTCB) et Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD), organisme écossais. Tous les trois proposent des échantillons d'EEQ pour CT, seul QCMD propose un CEQ pour GC. Le choix s'est donc porté sur QCMD, mais, au mois d'avril, cet organisme ne disposait déjà plus d'échantillons de GC pour cette année. Pour disposer d'échantillons d'EEQ pour CT, un organisme français a été choisi: Biologie Prospective a été contacté et a pu fournir deux échantillons à tester pour le deuxième semestre 2012, un pour septembre et un pour novembre. Le laboratoire ne dispose donc pas aujourd'hui de résultats de CEQ. Le nombre de participants à ce programme est de 43, et le groupe de pairs est de 2. En effet, l'automate Panther[®] est un automate très récent, il a été mis sur le marché en décembre 2010. En 2012, il est présent dans une dizaine de laboratoires en France.

Quelque soit le fournisseur du programme, les résultats sont interprétés de façon qualitative (néгатif ou positif) et non quantitative. La justesse sera donc évaluée de façon qualitative uniquement. Le calcul de l'incertitude de mesure n'est pas applicable pour cette méthode.

3.5.4. Evaluation et maitrise des facteurs d'incertitude

Cependant, le calcul mathématique de l'incertitude de mesure d'un résultat d'analyse n'est qu'un élément de son estimation. D'autres paramètres peuvent influencer ce résultat tout au long des phases pré-analytique, analytique et post-analytique.

Selon le SH GTA 14 (13), il appartient au laboratoire de procéder à une analyse de risque afin d'établir les éléments de variabilité des processus pré-analytique et analytique. Cette analyse de risque va permettre de mettre en évidence les points critiques à maitriser dans le laboratoire afin d'assurer la fiabilité des résultats. Des moyens de maitrise doivent être mis en place pour les paramètres jugés d'influence significative. Il est d'usage d'utiliser la méthode des 5M pour cette analyse. Le diagramme d'Ishikawa est un outil qui va nous aider à analyser le processus. Il s'agit de déterminer, pour chacun des M (Matière, Matériel, Main d'œuvre, Méthode et Milieu), les facteurs susceptibles d'influencer le résultat. Ensuite, pour chaque paramètre d'influence, les moyens de maitrise seront détaillés sous forme d'un tableau d'analyse de risque.



Analyse de risque

	Facteurs à maîtriser	Moyens de maîtrise
<p><u>Matière :</u> Patient</p> <p>CIQ,CEQ, panels, échantillons biologiques</p>	<p>Préparation du patient</p> <p>Prélèvement, recueil (pour les échantillons biologiques)</p> <p>Transport</p> <p>Stabilité et Conservation</p> <p>Reconstitution (CEQ)</p>	<p>Respect des préconisations pour le patient et des conditions de prélèvement (manuel de prélèvement)</p> <p>Habilitation du personnel préleveur Respect des procédures de prélèvement (manuel de prélèvement)</p> <p>Respect des procédures de transport Traçabilité du temps de transport et de la température de transport Critères d'acceptation des échantillons</p> <p>Respect des conditions de conservation Surveillance et traçabilité de la température des enceintes de conservation (réfrigérateur, congélateur, pièce de stockage à température ambiante)</p> <p>Respect des préconisations du fournisseur</p>
<p><u>Matériel :</u> Matériel de prélèvement</p> <p>Réactifs et consommables</p> <p>Automate</p>	<p>Utilisation du matériel</p> <p>Transport, conservation, reconstitution</p> <p>Contamination</p> <p>Gestion des stocks</p> <p>Bon fonctionnement</p> <p>Maintenance</p>	<p>Respect des préconisations du fournisseur</p> <p>Respect des préconisations du fournisseur</p> <p>Pièce dédiée Port de blouses et de gants Respect des préconisations du fournisseur</p> <p>Respect de la procédure « achat et stockage des réactifs et consommables »</p> <p>Vérifications faites par le logiciel de l'automate à chaque étape du processus analytique Contrôle et enregistrement du résultat du CIQ à chaque série Respect du mode opératoire Gestion des pannes</p> <p>Respect des maintenances journalières, hebdomadaires, mensuelles, semestrielles,... Contrat de maintenance et SAV</p>

Informatique du laboratoire	Logiciel	Respect de la procédure « maîtrise du système informatique du laboratoire » Respect des préconisations du fournisseur	
	Connexion	Vérification et validation de la connexion	
	Maintenance	Contrat de maintenance et SAV	
Main d'œuvre : Préleveur,technicien,biologiste	Qualification	Présentation des diplômes Fiche de poste	
	Fonction/Habilitation	Respect de la procédure « Recrutement et habilitation » Fiche de fonction Fiche d'habilitation Matrice des compétences	
	Formation continue	Respect de la procédure « Formation » Plan de formation Fiche de formation Evaluation de la formation	
Méthode :	Utilisation de la technique	Respect des exigences réglementaires et normatives Notice du fournisseur Respect du mode opératoire	
	Performance/Suivi de performance	Respect des procédures de vérification des méthodes Bibliographie Veille scientifique	
Milieu : Pièces techniques	Accès limité	Signalétique, logos sur les portes d'accès	
	Température	Ventilation/Climatisation Contrôle et enregistrement de la température ambiante	
	Contamination	Respect des préconisations du fournisseur Pièces séparées Port de blouses et de gants Traitement des déchets Entretien des locaux	
	<u>Enceintes thermostatées :</u> Réfrigérateur	Température	Contrôle et enregistrement des températures
	Automate	Températures de réaction	Températures contrôlées et enregistrées par le logiciel de l'automate
Locaux	Propreté	Entretien des locaux	

3.5.5. Contamination entre échantillons

Une étude de contamination inter-échantillons est à mener lorsque les paramètres sont sensibles à cette influence. Les techniques de biologie moléculaire y sont particulièrement sensibles. En effet, les tests d'amplification d'acides nucléiques permettent de copier en très grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN présente parfois en très faible quantité, ce qui en fait des techniques de très grande sensibilité. Une contamination même infime à partir d'un échantillon positif peut conduire à un résultat faussement positif.

Un test visant à détecter une contamination a donc paru intéressant à mettre en œuvre pour notre technique. Bien que l'automate utilise des embouts à usage unique pour pipeter les échantillons, il convient de tester l'efficacité des moyens employés par l'automate pour limiter le risque de contamination.

Pour cela, la méthode employée sera proche de celle couramment utilisée : un tube de panel D (doublement positif) sera analysé 3 fois consécutives (H1,H2,H3), suivi d'un tube de panel A (négatif) analysé également 3 fois (B1,B2,B3). L'opération sera répétée 4 fois (4 tubes du même lot de panel D et 4 tubes du même lot de panel A alternés).

Le pourcentage de contamination sera calculé selon la formule suivante :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(mB1-mB3)}{(mH-mB3)} \times 100$$

m = moyenne

Limite d'acceptabilité: il est indiqué dans le SH GTA 04 (4) que le niveau de la contamination doit être proche de zéro.

3.5.6. Comparaison avec la méthode déjà utilisée au laboratoire

Avant de disposer de l'automate Panther[®] pour effectuer la détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, le laboratoire utilisait la même technique (Aptima Combo 2[®]) mais elle était réalisée manuellement à l'aide d'un incubateur, d'un laveur et d'un lecteur. Cette méthode semi-automatique a été abandonnée dès que la conclusion du test de comparaison entre les deux techniques a été établie lors de la mise en fonction de l'automate en janvier 2011. Le laboratoire ne dispose pas d'automate en miroir, ni en « back up ». Il ne s'agit donc pas d'une corrélation permettant d'accorder deux techniques fonctionnant en parallèle. Seule la

technique automatisée sera utilisée ultérieurement, c'est donc un test de comparaison qui avait été mis en œuvre pour valider les performances de l'automate. Ainsi, il s'agit d'une comparaison de techniques et non pas de méthodes.

Lors de la mise en fonction de l'automate en janvier 2011, 70 échantillons de patients ont été testés en parallèle avec la technique semi-automatique et la technique totalement automatisée.

Le guide SH GTA 04 (4) préconise de calculer des « limites de suivi » à l'aide des écarts-types de fidélité intermédiaire des deux techniques. La suite consiste à calculer pour chaque échantillon la différence (d) et le rapport (q) des résultats obtenus entre les deux techniques:

$$d_i = x_i - y_i$$

$$q_i = y_i / x_i$$

x_i = résultats obtenus avec la méthode utilisée

y_i = résultats obtenus avec la méthode testée

Les graphiques correspondants sont ensuite tracés et les limites sont reportées sur ces graphiques.

Dans notre cas, l'écart-type de fidélité intermédiaire n'avait pas été calculé pour la technique semi-automatique, celle-ci n'ayant pas été évaluée par des tests de fidélité lors de sa mise en place en 2008. Les graphiques seront donc tracés sans y inclure de limites. Une droite de régression de type « droite des moindres rectangles » va être établie suivant ces calculs:

$$y = bx + a$$

$$a = \overline{y_i} - b \cdot \overline{x_i}$$

$$b = S_{y_i} / S_{x_i}$$

$\overline{y_i}$ = moyenne des valeurs y_i

S_{y_i} = écart-type des valeurs y_i

$\overline{x_i}$ = moyenne des valeurs x_i

S_{x_i} = écart-type des valeurs x_i

Les graphiques seront interprétés et une analyse des discordances sera réalisée pour essayer d'en déterminer les causes.

4. VERIFICATION EXPERIMENTALE (D = REALISER)

Les paramètres à évaluer et leurs modalités de réalisation ayant ainsi été déterminés, les tests ont pu être effectués.

Répétabilité : l'essai a été pratiqué le 24 mai 2012 sur 15 dosages d'échantillons de panel A (négatif) et 15 dosages d'échantillons de panel D (positif).

Fidélité intermédiaire : du 24 mai au 25 juin 2012, un échantillon de panel A et un échantillon de panel D ont été testés dans 15 séries, soit par la technicienne référente, soit par une stagiaire habilitée.

Contamination entre échantillons : l'essai a été effectué le 24 mai 2012: trois dosages de panel D suivis de trois dosages de panel A ont été répétés 4 fois.

Comparaison de méthodes : en janvier 2011, 70 échantillons cervico-vaginaux et urinaires pris au hasard ont été testés en parallèle avec les deux techniques.

5. RESULTATS – DISCUSSION (C = EVALUER)

5.1. Fidélité

Dans le tableau ci-dessous figurent les valeurs obtenues des 15 dosages successifs d'échantillons de panel A et de panel D, les calculs de moyenne, écart-type et coefficient de variation (CV) correspondant à notre test et à celui du fournisseur Gen-Probe®.

Lot réactif : 607575

24/05/2012	panel A lot 606029		panel D lot 604847	
Dosage	RLU		RLU	
n°1	6		2319	
n°2	6		2387	
n°3	8		2122	
n°4	6		2302	
n°5	6		2265	
n°6	5		2356	
n°7	6		2303	
n°8	5		2266	
n°9	7		2261	
n°10	7		2362	
n°11	5		2317	
n°12	8		2370	
n°13	5		2264	
n°14	10	Genprobe®	2287	Genprobe®
n°15	8	Panel A	2062	Panel D
moyenne	6,5	6	2283	2456
écart-type	1,46	1,02	88,40	52,99
CV %	22	15,7	3,87	2,2

On constate que pour les deux niveaux de panel, l'écart-type et le coefficient de variation ont des valeurs supérieures à celles obtenues par le fournisseur. Les limites d'acceptabilité choisies sont donc dépassées. Dans ce cas, le guide SH GTA 04 (4) précise, en bas du tableau des paramètres à vérifier (cf.annexe V), qu' « En cas de dépassement des spécifications choisies a priori par le laboratoire, celui-ci justifie l'acceptation des écarts pour pouvoir conclure à l'aptitude de la méthode et l'enregistre. »

Une analyse de l'ensemble du processus a donc été menée pour essayer de déterminer les raisons de ces écarts et voir s'ils pouvaient être acceptés.

Du point de vue technique, le processus analytique s'est déroulé correctement, les CIQ ont été validés. Lorsque l'on regarde l'ensemble des valeurs obtenues pour chaque panel, on constate qu'il n'y a pas de valeur aberrante.

L'écart peut-être lié à l'échantillonnage qui est petit. Le fournisseur a, lui, effectué ce test avec 96 échantillons, ce qui n'était pas envisageable au laboratoire. Mais surtout, la supériorité des valeurs trouvées au laboratoire par rapport à celle obtenues par le fournisseur est probablement liée à la méthodologie : Gen-Probe® est une société

américaine qui a fait ses tests de performance en accord avec les recommandations du NCCLS (11) qui préconise d'effectuer deux séries d'analyses par jour, pendant au moins 20 jours, chaque échantillon de panels étant présent en double dans les séries. Les formules de calcul sont également différentes.

Au final, les valeurs des écart-types et CV trouvées au laboratoire restent proches de celles du fournisseur et reflètent que la dispersion des valeurs obtenues au laboratoire lors de ce test, comprises entre 6 et 10 pour le panel A et entre 2062 et 2387 pour le panel D, sont cohérentes et se situent loin des valeurs limites d'interprétation mentionnées au paragraphe 3.5.1. La dispersion des valeurs n'a donc aucun impact sur l'interprétation des résultats.

Ainsi, au regard de la pertinence clinique et des pratiques de l'état de l'art, la décision a été de valider le test de fidélité.

Echantillons	Nombre	Moyenne	Ecart-type	CV(%)	CV(%) fournisseur	CV(%) limite (hors fournisseur)	Conclusion
Niveau 1 (Panel A)	15	6,5	1,46	22	16	-	acceptable
Niveau 2 (Panel D)	15	2283	88,4	3,87	2,2	-	acceptable

5.2. Fidélité intermédiaire

Dans le tableau ci-dessous figurent les valeurs obtenues des 15 dosages d'échantillons de panel A et de panel D effectués sur 15 jours, les calculs de moyenne, écart-type et coefficient de variation (CV) correspondant à notre test.

				panel A lot 606029			panel D lot 604847	
dosage	date	N° lot réactif	Initiale de l'opérateur	RLU			RLU	
n°1	24/05/2012	607575	G	6			2200	
n°2	25/05/2012	607575	G	7			2143	
n°3	29/05/2012	607575	G	6			2046	
n°4	30/05/2012	607575	G	6			2241	
n°5	31/05/2012	607575	G	13			2219	
n°6	04/06/2012	607575	G	11			2032	
n°7	05/06/2012	607575	G	8			2242	
n°8	06/06/2012	607575	M	15			2159	
n°9	11/06/2012	610024	M	6			2210	
n°10	12/06/2012	610024	M	5			2077	
n°11	18/06/2012	610024	M	6			2129	
n°12	19/06/2012	610024	G	5			2282	
n°13	21/06/2012	610024	G	6			2268	
n°14	22/06/2012	610024	G	4			2192	
n°15	25/06/2012	610024	M	6			2331	
					Genprobe® Panel A			Genprobe® Panel D
moyenne				7,3	6	2185	2456	
écart-type				3,15	0	87,02	0	
CV%				43,02	0	3,98	0	

J'ai expliqué dans la partie « méthodologie » que nous ne disposons pas de valeurs d'écart-type et de CV puisque celles données par le fournisseur sont zéro et qu'il sera appliqué la formule suivante:

$$\text{CV reproductibilité} = 1,33 \times \text{CV répétabilité.}$$

Ce calcul donne comme valeurs limites de CV:

Pour le panel A : CV limite de reproductibilité = 29,26%

Pour le panel D : CV limite de reproductibilité = 5,15%

Nous constatons que, pour le panel A, le CV obtenu au laboratoire (43,02%) est supérieur à 29,26%. Une analyse du processus a été effectuée pour essayer de déterminer l'origine de cet écart. Concernant le panel D, le CV obtenu (3,98%) est inférieur à 5,15%, il est donc acceptable.

Durant la période du test, il y a eu un changement de lot de réactif et deux opérateurs. En observant les valeurs obtenues, on constate l'apparition d'un écart pour 3 valeurs, celles des dosages n°5,6 et 8. Ces écarts sont survenus avec l'un ou l'autre opérateur. On en déduit que l'opérateur n'a pas influencé les résultats. En revanche, on constate que le changement de lot de réactif a permis de retourner aux valeurs obtenues en début de test. Après discussion avec le responsable technique de Gen-Probe® et la technicienne, l'hypothèse que ces écarts pouvaient être liés à l'utilisation de la fin du lot a été émise. La technicienne a regardé si le lot approchait de la date limite d'utilisation après reconstitution ou de la date limite de stabilité à bord de l'automate. Ce n'était pas le cas. Après ces vérifications, le responsable technique de Gen-Probe® a soumis ces résultats à son service technique. Les spécialistes de ce service ont analysé toutes les données fournies par l'automate (contrôles, résultats des patients et autres données purement techniques) sur une période d'un mois incluant la période d'essai, car ils ont jugé, à juste titre, que notre test n'était pas statistiquement représentatif compte-tenu du faible nombre de l'échantillonnage, que la valeur de CV obtenue pour le panel A n'est pas significative. D'après eux, les données ne montrent aucune tendance à la hausse des valeurs, ni dans le temps, ni en rapport avec les numéros de lots utilisés. Les cinétiques observées sont tout à fait normales. Il n'est donc pas inquiétant d'obtenir parfois des valeurs supérieures à 10 pour le panel A, ce que nous avons observé est aléatoire. Enfin et surtout, ces valeurs sont en dessous du seuil de positivité mentionné dans le paragraphe 3.5.1, et ne changent en rien l'interprétation du résultat.

On constate donc que cette technique ne comporte pas de témoin doublement négatif, le fournisseur ne le préconise pas. La technique fonctionne avec deux contrôles : un contrôle positif pour CT et négatif pour GC, et un contrôle négatif pour CT et positif pour GC (cf. annexe IV). La suggestion d'inclure un témoin doublement négatif dans les préconisations du fournisseur a été adressée au responsable technique de Gen-Probe®. Cela permettrait d'obtenir une meilleure visibilité sur les performances de la technique. En fait, lors du passage des contrôles, les résultats apparaissent sous la forme d'une seule valeur positive suivie de deux interprétations pour chaque contrôle (CT positif/GC négatif pour l'un, CT négatif/GC positif pour l'autre) (cf. annexe IV). Le logiciel applique un algorithme de calcul interprétant des données de cinétique n'apparaissant pas à l'écran mais validant la négativité des contrôles. Ainsi, passer un échantillon de panel A à chaque série n'est pas justifié.

Compte-tenu du faible échantillonnage, de l'absence d'impact de ces écarts de valeurs sur l'interprétation des résultats, la décision a été de valider le test de reproductibilité.

Echantillons	Nombre	Moyenne	Ecart-type	CV(%)	CV(%) fournisseur	CV(%) limite (hors fournisseur)	Conclusion
Niveau 1 (Panel A)	15	7,3	3,15	43,02	-	-	acceptable
Niveau 2 (Panel D)	15	2185	87,02	3,98	-	-	acceptable

5.3. Contamination entre échantillons

Dans le tableau ci-dessous figurent les valeurs obtenues lors d'une série de 4 passages alternés de 3 dosages de panel D (H1, H2, H3) et 3 dosages de panel A (B1, B2, B3) puis les calculs nécessaires à l'obtention du pourcentage de contamination.

	H1	H2	H3	B1	B2	B3
1 ^{er} passage	2228	2225	2271	6	7	12
2 ^{ème} passage	2318	2246	2223	6	6	5
3 ^{ème} passage	2335	2271	2336	6	5	6
4 ^{ème} passage	2277	2228	2169	6	7	6

Moyenne des valeurs H (mH)	2260,58
Moyenne des valeurs B3 (mB3)	7,25
Moyenne des valeurs B1 (mB1)	6
mH-mB3	2253,33
Contamination en % = $(mB1-mB3/mH-mB3)*100$	-0,055

Le pourcentage de contamination est en dessous de zéro. On peut donc considérer qu'il n'y a pas de contamination entre échantillons avec cette méthode.

5.4. Comparaison avec la méthode déjà utilisée

70 échantillons de patients ont été testés en parallèle avec la technique semi-automatique et la technique totalement automatisée.

Le tableau des valeurs de RLU obtenues avec les deux techniques, les graphes des différences, des quotients et la droite de régression figurent en annexe VII.

Analyse du graphe des différences: les points n'ont pas une répartition linéaire car il ne s'agit pas d'une méthode quantitative proportionnelle. On distingue cependant 3 populations homogènes:

- La population des résultats négatifs avec 55 valeurs de différences allant de -39 à 11 RLU.
- La population des résultats positifs en CT **ou** en GC avec 11 valeurs de différences allant de 26 à 284.
- La population des 3 résultats positifs pour les deux bactéries avec 3 valeurs de différences : 196 - 480 - 514.

On remarque une valeur de différence isolée (-555): il s'agit d'une discordance. La technique testée a donné un résultat négatif (RLU=6) alors que la technique utilisée a donné un résultat positif (RLU=561) pour CT. L'échantillon a été testé une seconde fois dans les deux techniques et a donné les mêmes conclusions : positif pour la technique utilisée (RLU=244) et négatif pour la technique testée (RLU=8). Cette différence n'a pas pu être expliquée, seule l'hypothèse d'une contamination survenue avec la technique manuelle a été retenue. L'échantillon a été rendu « ininterprétable, résultats discordants. Analyse à refaire sur un nouvel échantillon ». Il s'agissait d'une patiente du CDAG. Le médecin n'a pas demandé un nouvel auto-prélèvement et a préféré traiter la patiente de crainte qu'elle ne revienne pas une troisième fois pour chercher son résultat. En effet, les patient(e)s du CDAG sont asymptomatiques et ne réalisent pas toujours la gravité de cette infection.

Analyse du graphe des quotients : les 3 mêmes populations homogènes sont observées:

- La population des résultats négatifs avec 55 valeurs de quotients allant de 0,13 à 3,75.
- La population des résultats positifs en CT **ou** en GC avec 11 valeurs de quotients allant de 1,03 à 1,32.
- La population des 3 résultats positifs pour les deux bactéries avec 3 valeurs de quotients : 1,09 - 1,25 - 1,26.

Le résultat discordant avec un quotient de 0,01 apparaît distinctement.

Analyse de la droite de régression :

L'équation de cette droite est :

$$y = bx + a = 1,18x - 11,19$$

Ce graphe présente, de même, un aspect particulier car la répartition des valeurs n'est pas linéaire. Là aussi, il nous montre les 3 populations homogènes qui se trouvent concentrées autour de la droite. Le point discordant est isolé en dehors de la droite avec son abscisse à 561 et son ordonnée à 6.

Au final, bien qu'il ne s'agisse pas d'une méthode quantitative proportionnelle et que la comparaison aurait pu être uniquement analysée du point de vue qualitatif, les graphes de comparaison de méthodes nous ont permis de voir que les 3 populations de valeurs sont bien homogènes et concentrées autour de la droite de régression : les deux techniques sont comparables.

6. PERSPECTIVES (A=AJUSTER)

La dernière étape de la roue de Deming consiste à corriger et améliorer le processus en question. Le laboratoire dispose maintenant de bases solides pour effectuer les vérifications de méthodes dans le laboratoire (les procédures, l'expérience). Il reste cependant certains paramètres d'évaluation qui n'étaient pas justifiés ici et qu'il faudra maîtriser également dans le cas d'autres vérifications de performances analytiques (incertitudes de mesure, limite de détection, seuil de quantification, intervalle de mesure, intervalle de référence). D'autres vérifications de méthodes sont programmées pour la fin de l'année: la détection chez les femmes de papillomavirus à partir de prélèvements cervicaux sur l'automate Panther[®], les dosages de biochimie et les immuno-dosages sur deux automates Siemens[®].

La technique testée est, nous venons de le voir, une technique présentant de très bonnes performances et nous avons conclu à l'aptitude de la méthode au regard de la pertinence clinique et de l'état de l'art.

7. CONCLUSION

Ce travail a amélioré mes connaissances et m'a donné de nouveaux moyens d'être plus critique vis-à-vis des méthodes mises sur le marché. Il m'a familiarisé avec les outils utilisés en qualité (PDCA, 5M) et avec la démarche utilisée lors de la vérification de méthodes. Bien que ce processus soit bien décrit par le guide SH GTA 04 (4), il existe de nombreuses méthodes différentes et des questions persistent toujours quant au choix des paramètres à évaluer, au choix du type d'échantillons à tester, au nombre de dosages à effectuer, *etc.* Encore beaucoup de techniques ne disposent pas de données issues de sociétés savantes ni de publications et il faut alors se référer aux données du fournisseur qui sont parfois incomplètes et dont la méthodologie peut-être différente. Ainsi, l'attrait de ce type de travail repose sur les moyens à employer pour évaluer au mieux la technique testée et sur les conclusions à produire quant à l'aptitude de la méthode. Ces conclusions n'étant pas toujours favorables, il faut essayer d'en déterminer les causes.

Ces évaluations apportent des informations complémentaires qui renforcent l'exigence que doivent avoir les laboratoires de biologie médicale en ce qui concerne les performances de méthodes. La généralisation de ces vérifications dans tous les LBM va obliger les fournisseurs à être plus rigoureux dans l'établissement des critères d'évaluation des techniques à mettre sur le marché.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Ordonnance N° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Journal Officiel de la République Française n°0012, [s.l.], 15 janvier 2010.
- (2) Norme ISO EN 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale : exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR, [s.l.], août 2007.
- (3) Arrêté du 14 décembre 2010 définissant les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation. Journal Officiel de la République Française n°0017, [s.l.], 21 janvier 2011.
- (4) SH GTA 04-REV.00. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. COFRAC Section santé humaine, [s.l.], avril 2011.
- (5) Vassault A. Procédure de validation d'une technique. Spectra Biologie, vol 16, n°90, Novembre 1997.
- (6) Gaydos CA, Quinn TC, Willis D, Weissfeld A, Hook EW, Martin DH, Ferrero DV, Schachter J. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. J Clin Microbiol. 2003 Jan; 41(1):304-9.
- (7) Van Der Pol B, Taylor SN, Lebar W, Davis T, Fuller D, Mena L, Fine P, Gaydos CA, Martin DH, Hook EW 3rd. Clinical evaluation of the BD ProbeTec™ *Neisseria gonorrhoeae* Qx amplified DNA assay on the BD Viper™ system with XTR™ technology. Sex Transm Dis. 2012 Feb;39(2):147-153.
- (8) Van Der Pol B, Liesenfeld O, Williams JA, Taylor SN, Lillis RA, Body BA, Nye M, Eisenhut C, Hook EW 3rd. Performance of the cobas CT/NG test compared to the Aptima AC2 and Viper CTQ/GCQ assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol. 2012 Jul; 50(7):2244-9.
- (9) Mushanski LM, Brandt K, Coffin N, Levett PN, Horsman GB, Rank EL. Comparison of the BD Viper System with XTR Technology to the Gen-Probe APTIMA COMBO 2 Assay using the TIGRIS DTS system for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. Sex Transm Dis. 2012 Jul; 39 j(7):514-7.

- (10) Test APTIMA COMBO 2. Notice technique. Gen-Probe. Rev A.
- (11) National Committee for Clinical Laboratory Standards.2004.NCCLS EP5-A2 : Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods : Approved Guideline (2nd edition, Vol 24, N°25).
- (12) Vassault A., Grafmeyer D., de Graeve J., Cohen R., Beaudonnet A., Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Annales de Biologie Clinique. Volume 57, Numéro 6, 685-95, Novembre-Décembre 1999.
- (13) SH GTA 14-REV.00. Guide d'évaluation des incertitudes de mesure des analyses de biologie médicale. COFRAC Section Santé humaine, [s.l.], octobre 2011.

Site internet :

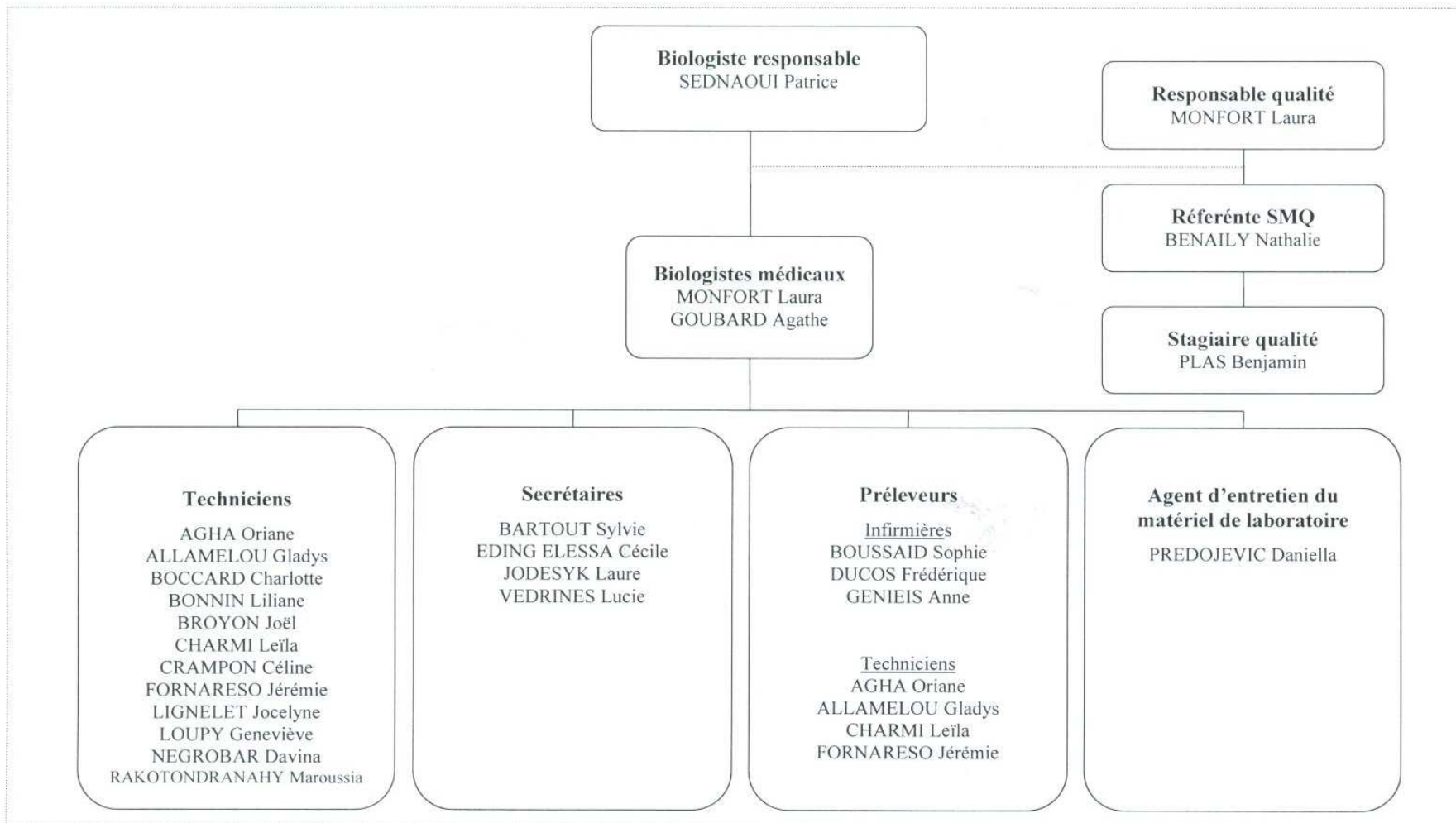
- (14) Bioqualite.fr

LISTE DES ANNEXES

Annexe I :	Organigramme du laboratoire	39
Annexe II :	Procédure « Vérification de performances d'une méthode d'analyse de type quantitatif (portée A)	41
Annexe III :	L'automate Panther®	49
Annexe IV :	Exemple de feuille de résultats	51
Annexe V :	Tableau des paramètres à vérifier extrait du guide SH GTA 04	53
Annexe VI :	Tableau des performances analytique du système Panther® extrait de la notice technique Aptima Combo 2	55
Annexe VII :	Comparaison de techniques : tableau des valeurs de RLU, graphes et droite de régression	57

ANNEXE I

Organigramme du laboratoire



ANNEXE II

**Procédure « Vérification de performances d'une méthode d'analyse
de type quantitatif (Portée A)»**

1. Objet et domaine d'application

Cette procédure décrit les modalités de vérification des performances d'une méthode d'analyse quantitative adoptée par le laboratoire (**portée flexible standard A**).

Cette procédure ne concerne pas les méthodes adaptées ou développées par le laboratoire.

La vérification peut être effectuée à l'installation d'un automate avant son utilisation en routine, ou bien rétrospective, après la mise en fonction de l'appareil.

Elle est applicable sur toutes les méthodes quantitatives adoptées et utilisées par le laboratoire. On distingue deux types de techniques quantitatives :

- Techniques fournissant un résultat chiffré à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule,...) ou une activité donnée de l'analyte (enzyme).
- Techniques fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable avec interprétation par rapport à un seuil.

En fonction de ces paramètres, des besoins du laboratoire et de la pertinence clinique, le choix des critères de performance à vérifier et leur méthodologie seront amenés à varier et il seront donc définis le moment venu pour chaque technique individuellement, en s'appuyant au départ sur le tableau page 2.

2. Documents associés

- DE-A0-085** « Dossier de vérification de méthode quantitative »
PG-A0-029 « Estimation des incertitudes de mesure »
MT-A0-035 « Gestion de la portée d'accréditation »

Documents externes :

- SH GTA 04** « Validation/Vérification des méthodes en Biologie Médicale »
SH FORM 43 « Fiche type quantitatif : Vérification (Portée A) / validation (Portée B) d'une méthode de biologie médicale »

3. Responsabilités

Le biologiste médical est désigné comme responsable de la vérification des méthodes d'analyses au sein du laboratoire.

4. Déroulement de l'activité

4.1. Les étapes de la vérification de méthode

- Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire
- Etude bibliographique

- Détermination des paramètres importants à évaluer
- Définition des limites acceptables sur chacun des paramètres en s'appuyant sur les besoins propres du laboratoire au regard de la pertinence clinique attendue et sur les recommandations des sociétés savantes ou des pratiques de l'état de l'art.
- Evaluation des performances de la méthode – expérimentations
- Traitement des données et expression des résultats
- Conclusion sur l'avis d'aptitude de la méthode adoptée

Lors de la mise en place d'une nouvelle méthode ou d'une modification de méthode, un dossier de validation (**DE-A0-085**) est réalisé et la portée d'accréditation est mise à jour (**MT-A0-035**).

4.2. Paramètres à connaître et/ou à vérifier

Paramètres à vérifier et/ou à connaître	Bibliographie	Vérification sur site
Spécificité analytique	Oui	Non
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	Oui
Justesse (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible
Intervalle de mesure Limite de détection, de quantification, linéarité	Oui	Si nécessaire
Incertitudes / Facteurs de variabilité	Oui	Oui
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles
Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués)	Oui	Non
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)	Oui	Si nécessaire
Intervalle de référence	Oui	Oui, dès que possible si justifié
Comparaison avec une méthode de référence	Oui	Non
Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode (appareil en miroir)	Oui (si existe)	Oui (si possible)
Analyse des discordances	Oui	Oui

4.3. Vérification expérimentale

Cette étape s'effectue après avoir déterminé les paramètres à évaluer et défini les critères d'acceptabilité.

a. Evaluation de la répétabilité

Cet essai permet de connaître la meilleure performance possible en terme de fidélité dans les conditions opératoires du laboratoire. Il sera réalisé sur au moins deux niveaux :

- Sauf argumentation pertinente (coût des analyses, durée, etc...), 30 mesures seront réalisées sur un même échantillon dans un intervalle de temps le plus court possible et dans des conditions identiques : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage.
- Évaluer la moyenne, l'écart-type de répétabilité S_r , et le coefficient de variation CV_r associé :

$$\text{Moyenne} = \bar{x} = \sum_1^n x_i / n$$

$$\text{écart-type} = S_r = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2} \qquad CV_r (\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

- Comparer les résultats obtenus aux limites d'acceptabilité définies par le laboratoire.

b. Evaluation de la fidélité intermédiaire (FI)

Cet essai consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon en faisant varier les conditions opératoires. Les résultats des CIQ pourront être exploités (2 niveaux au minimum). Dans la mesure du possible et pour une meilleure représentativité, la fidélité intermédiaire sera établie sur au moins 15 jours et avec 30 déterminations.

- Les modalités de calcul sont identiques à ceux de la répétabilité : moyenne, écart-type de fidélité intermédiaire S_{FI} , coefficient de variation CV_{FI} .

$$\text{Moyenne} = \bar{x} = \sum_1^n x_i / n$$

$$\text{écart-type} = S_{FI} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2} \qquad CV_{FI} (\%) = \frac{S_{FI}}{\bar{x}} \times 100$$

- Comparer les résultats obtenus aux limites d'acceptabilité définies par le laboratoire.

c. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude (dès que possible)

L'évaluation de la justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un échantillon à une valeur cible. Le biais pourra donc être déterminé à l'aide des résultats de l'externalisation des CIQ. En cas d'absence d'externalisation des CIQ, l'inexactitude sera évaluée en exploitant les résultats d'EEQ.

- Calcul du biais à l'aide de l'externalisation des CIQ (en %) :

$$\text{Biais (\%)} = \frac{\text{Moyenne Labo} - \text{Valeur Cible}}{\text{Valeur Cible}} \times 100$$

- Calcul de l'inexactitude à l'aide d'un résultat d'EEQ :

$$\text{Inexactitude (\%)} = \frac{\text{Valeur Labo} - \text{Valeur Cible}}{\text{Valeur Cible}} \times 100$$

- Comparer les résultats obtenus aux limites d'acceptabilité définies par le laboratoire.

Remarque : La valeur cible sera la moyenne de l'ensemble des participants si les seuils de décision pour le paramètre concerné sont standardisés, sinon la valeur cible retenue sera la moyenne des résultats obtenus par le groupe de pairs.

d. Approche de l'estimation de l'incertitude

Pour ce paramètre, se reporter à la procédure **PG-A0-029** « Estimation des incertitudes de mesure ».

e. Evaluation de la contamination inter échantillons (pour les paramètres sensibles)

Cet essai permet d'évaluer la contamination inter échantillons sur un système automatisé. Il sera réalisé sur l'ensemble des paramètres sensibles à cette influence.

- Après rinçage de l'appareil, analyser successivement :
 - Un échantillon élevé 3 fois : H1, H2, H3, moyenne H
 - Un échantillon bas 3 fois : B1, B2, B3
 - Répéter le cycle n fois (n = 5 par exemple)

Limites acceptables :

Calculer le taux de contamination (en %) :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{mB1 - mB3}{mH - mB3} \times 100$$

Comparer le résultat obtenu aux limites d'acceptabilité définies par le laboratoire.

f. Comparaison avec une méthode déjà utilisée (si possible)

Cet essai permet de vérifier la corrélation entre deux méthodes ou deux équipements sur un même paramètre. Il sera étudié pour les paramètres pour lesquels le laboratoire possède deux appareils en miroir ou un appareil de « back-up ». Il pourra être étudié également lors de la substitution d'une technique par une autre. Il ne peut être réalisé qu'une fois la vérification des critères précédents sur chacune des deux méthodes effectuée (au minimum répétabilité, fidélité intermédiaire et justesse).

- Sélectionner au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physio-pathologique avec les deux méthodes.

- Analyser ces échantillons, frais de préférence, en simple par les deux méthodes et dans un délai le plus court possible et relever les valeurs :

x_i : valeurs méthode A

y_i : valeurs méthode B

- Calculer les différences $d_i = x_i - y_i$ et les quotients $q_i = y_i/x_i$
- Tracer graphiquement d_i et q_i en fonction de x_i
- A l'aide des données bibliographiques et/ou fournisseurs, fixer des limites de discordance, les reporter sur les graphiques.
- Les limites acceptables sur les d_i pourront être calculées par la formule suivante en fonction des écart-types de fidélité intermédiaire des deux méthodes :

$$\pm 3 \sqrt{S_{FiA}^2 + S_{FiB}^2}$$

- Tracer la droite de régression. Définir la pente et l'ordonnée à l'origine. La similitude est optimale lorsque la pente est égale à 1 et l'ordonnée à l'origine égale à 0.

Analyse des discordances

- Identifier les échantillons discordants, rechercher les causes de discordance qui subsistent après vérification (aspect, fibrine, hémolyse, etc...).

En cas de différences significatives, le biologiste médical formalisera la conduite à tenir (adaptation des valeurs de référence, information des cliniciens prescripteurs, ...)

g. Evaluation de la limite de détection et de la limite de quantification (si nécessaire)

Ces essais seront réalisés dans le cas où le laboratoire souhaite rendre des résultats en dessous de l'intervalle de mesure annoncé par le fournisseur.

Pour évaluer la limite de détection, effectuer 30 mesures répétées d'un blanc de matrice (sérum dépourvu de la substance à doser, calibrateur zéro, diluant) dans une même série.

Calculer la moyenne m_0 et l'écart-type s_0 . Évaluer la limite de détection en calculant :

$$\text{Limite de détection : } m_0 + 3s_0$$

Pour évaluer la limite de quantification, effectuer des dilutions d'un étalon ou du CIQ niveau bas avec le diluant selon le schéma suivant : 100 + 0 ; 90 + 10 ; ... ; 10 + 90 ; 0 + 100

Analyser 10 fois chacun des 11 échantillons dans une série unique.

Pour chaque série, calculer le CV.

La limite de quantification sera égale à la valeur pour laquelle le CV est acceptable. On pourra prendre un CV acceptable égal à 10%.

h. Evaluation de la limite supérieure de linéarité (si nécessaire)

Cet essai consiste à vérifier la linéarité entre les dilutions effectuées et les concentrations obtenues. Elle sera réalisée pour les examens pour lesquels les étendues de mesure sont particulièrement élevées et en cas d'une pré-dilution des échantillons.

La linéarité de la méthode sera appréciée par rapport aux critères définis par le laboratoire.

i. Intervalle de référence (dès que possible, si justifié)

Les valeurs de référence sont à vérifier expérimentalement sur site. L'intérêt est de vérifier la pertinence des valeurs reconnues et éventuellement d'adapter ces valeurs à la population des patients du laboratoire. La vérification de ces valeurs pourra se faire après une période d'utilisation afin d'avoir un nombre de valeurs significatif pour chaque sexe et tranche d'âge :

A partir de patients exempts de pathologie, écarter les valeurs et vérifier la répartition gaussienne de la population.

Ecarter toutes les valeurs supérieures à $m+2S$ et inférieure à $m-2S$

Recalculer la moyenne normalisé m_n et l'écart-type normalisé S_n avec les valeurs retenues.

Les valeurs de référence seront données par l'intervalle [m_n-2S_n ; m_n+S_n]

Vérifier la concordance par rapport aux valeurs de référence annoncées par le fournisseur. Sur la base de notre étude, celles-ci pourront être réajustées.

j. Contamination inter-réactifs (si nécessaire)

Ce phénomène peut se produire lorsque le système de distribution est commun à tous les réactifs (par exemple réactifs de la LDH avec réactifs ALAT).

Après rinçage de l'appareil, sur un même échantillon (sérum), mesurer n fois la LDH dans des conditions de répétabilité. Calculer la moyenne m_{LDH} .

Analyser en alternance ALAT / LDH (n cycles). Calculer la moyenne $m_{LDH/ALAT}$.

Comparer les 2 moyennes et vérifier qu'il n'y a pas de différence significative.

4.4. Exploitation des résultats et conclusion

Les résultats seront analysés à l'aide des outils fournis par le fabricant ou à défaut à l'aide du tableur Excel. Une conclusion sur l'aptitude de la méthode sera établie. Le dossier de vérification de méthode (**DE-A0-085**) sera complété.

4.4. Confirmation des performances en routine

Afin de s'assurer que la méthode utilisée conserve des performances acceptables au cours du temps par rapport aux besoins définis par le laboratoire, des moyens sont mis en place afin de suivre certains critères en routine :

- Suivi des résultats de CIQ
- Le cas échéant, suivi des résultats d'EEQ

5. Classement et archivage

Les **dossiers de validation des méthodes** sont scannés dans Kalilab dans la rubrique de l'automate correspondant et sont conservés dans le classeur réservé à l'automate ou à la technique pendant la durée d'utilisation de la méthode puis archivés 3 ans.

ANNEXE III

L'automate Panther®



L'automate Panther®

ANNEXE IV

Exemple de feuille de résultats

RESULTS BY WORKLIST

Serial Number: 00098	System SW Version: 3.2.5.9	Date Range: 8/10/2012 12:39:21 PM to 8/10/2012 1:19:20 PM
Assay: CT/GC		
Worklist IDs: 00098-20120810-02 Version: 1.38 (For In Vitro Diagnostic Use) ML: 614541 Exp: 11/15/2013		
Operators: admin		
Specimen Tested: 42	CT POS: 5 GC POS: 2 GC EQUIV: 1	
Status Flag Legend: M - Sample ID of a new test request was manually entered via the keyboard when a barcode was not readable by the instrument.		
Reviewed By: _____	Date: _____	Verified By: _____ Date: _____

CT/GC

Version: 1.38 (For In Vitro Diagnostic Use)

Worklist ID: 00098-20120810-02

Time	Rack-Tube #	Sample ID	Total RLU	CT Result	GC Result	Flags
8/10/2012 12:39:21 PM	293-00	CT Positive Control - Lot 608400	1259	CT POS	GC neg	
8/10/2012 12:39:21 PM	293-00	GC Positive Control - Lot 610260	1153	CT neg	GC POS	
8/10/2012 12:39:21 PM	293-00	AF 1232 6225	6	CT neg	GC neg	M
8/10/2012 12:39:21 PM	293-00	01100071414601	4	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:39:21 PM	293-00	13100071345802	3	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:44:21 PM	293-00	01100071415601	7	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:44:21 PM	293-00	01100071415901	2575	CT POS	GC POS	
8/10/2012 12:44:21 PM	293-00	01100071416101	4	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:44:21 PM	293-00	01100071416401	4	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:44:21 PM	293-00	01100071416701	3	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:49:21 PM	293-00	01100071418101	7	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:49:21 PM	293-00	01100071418201	1310	CT POS	GC neg	
8/10/2012 12:49:21 PM	293-00	01100071418501	5	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:49:21 PM	293-00	01100071418901	5	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:49:21 PM	293-00	01100071420901	5	CT neg	GC neg	
8/10/2012 12:54:21 PM	271-00	01100071421101	1383	CT POS	GC neg	
8/10/2012 12:54:21 PM	271-00	01100071421201	8	CT neg	GC neg	

ANNEXE V

Tableau des paramètres à vérifier extrait du guide SH GTA 04

9.1.1 Vérification/validation initiale d'une méthode quantitative

Le dossier de vérification/validation peut renvoyer à d'autres documents (bibliographie, notices fournisseurs, documents internes au laboratoire, etc.), correctement référencés et accessibles. Le LBM pourra s'appuyer sur la **Fiche Type QUANTITATIF** (Portée A/B ; **SH FORM 43**) présenté en ANNEXE III du présent guide.

Ce dossier apporte les éléments de vérification suivants, par recherche bibliographique et/ou par vérification sur site :

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
Spécificité analytique	Oui	Non	Oui
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	Oui	Oui
Justesse (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible	Oui
Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)	Oui	A vérifier si nécessaire ⁴	Oui
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Oui	Oui	Oui
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles	Oui
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Oui	Non	Oui
Robustesse	Non	Non	si besoin
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)	Oui	à vérifier si nécessaire ⁵	Oui
Intervalle de référence « ex-valeurs normales »	Oui	à vérifier dès que possible, si justifié	Oui à établir
Comparaison avec une méthode de référence	Oui (si existe)	Non	Oui (si possible)
Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD) ⁶	Oui (si existe)	Oui (si possible)	Oui
Analyse des discordances ⁷	Oui	Oui	Oui
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude⁸ de la méthode ou du système analytique.			

⁴ Pour des techniques avec une zone étendue de valeurs possibles.

⁵ Pour confirmer ou en cas d'interférences non décrites.

⁶ Appareils en miroir : privilégier les appareils utilisant des techniques de principes analytiques identiques sinon il est possible d'utiliser des codes examens différents pour le même paramètre ou d'utiliser un facteur de corrections (pour les techniques linéaires) **de manière transitoire**. Le laboratoire doit avoir une stratégie d'uniformisation des techniques pour un même paramètre.

⁷ Pour les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (absorbance par exemple), avec un effet de seuil (étude des faux positifs et des faux négatifs par exemple).

⁸ En cas de dépassement des spécifications choisies a priori par le laboratoire, celui-ci justifie l'acceptation des écarts pour pouvoir conclure à l'aptitude de la méthode et l'enregistre.

ANNEXE VI

**Tableau des performances analytiques du système Panther® extrait
de la notice technique Aptima Combo 2®**

Caractéristiques de la performance analytique du système PANTHER

Tableau 26 : Précision du test APTIMA COMBO 2 pour le système PANTHER

Matrice	CT (IFU/mL)	GC (CFU/mL)	N*	RLU moyenne	% Concord.	Entre instruments		Entre lots		D'une série à l'autre		Intra-série		Total	
						SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
STM	0	0	96	6	100	0,06	1	0,88	13,5	0	0	1,02	15,7	1,3	20,1
	0,25	0	95	1226	100	70,03	5,7	20,03	1,6	8,43	0,7	47,05	3,8	87,1	7,1
	2,5	0	96	1249	100	77,97	6,2	6,11	0,5	0	0	32,87	2,6	84,8	6,8
	25	0	95	1268	100	72,85	5,7	15,3	1,2	0	0	39,58	3,1	84,3	6,6
	0	12,5	96	1081	100	18,44	1,7	28,59	2,6	0	0	26,68	2,5	43,2	4
	0	125	96	1266	100	29,81	2,4	0	0	8,86	0,7	27,58	2,2	41,6	3,3
	0	1250	96	1309	100	29,41	2,2	0	0	9,83	0,8	31,83	2,4	44,4	3,4
	2,5	125	96	2456	100	86,58	3,5	0	0	0	0	52,99	2,2	101,5	4,1
	2,5	2500	96	2509	100	73,13	2,9	0	0	19,8	0,8	46,77	1,9	89	3,5
	1000	2500	96	2496	100	31,72	1,3	6,14	0,2	0	0	193,66	7,8	196,3	7,9
1000	125	96	2471	100	83,63	3,4	9,36	0,4	0	0	52,35	2,1	99,1	4	
Urine	0	0	94	6	100	0,2	3,2	0,66	10,8	0,36	5,9	1	16,3	1,3	21,2
	0,25	0	95	863	100	70,73	8,2	165,65	19,2	47,97	5,6	132,27	15,3	228,6	26,5
	2,5	0	95	1129	100	56,02	5	89,56	7,9	8,56	0,8	74,19	6,6	129,4	11,5
	25	0	96	1246	100	60,45	4,9	13,97	1,1	13,36	1,1	43,03	3,5	76,7	6,2
	0	12,5	96	1016	100	18,83	1,9	31,81	3,1	7,88	0,8	49,53	4,9	62,3	6,1
	0	125	96	1209	100	49,32	4,1	23,5	1,9	1,68	0,1	40,28	3,3	67,9	5,6
	0	1250	96	1252	100	53,01	4,2	40,34	3,2	7,72	0,6	40,23	3,2	78,2	6,2
	2,5	125	95	2290	100	73,92	3,2	40,88	1,8	10,43	0,5	56,12	2,5	101,9	4,4
PreservCyt	0	0	96	7	100	0	0	0,8	11,7	0	0	1,54	22,4	1,7	24,7
	0,25	0	96	1113	100	92,29	8,3	30,08	2,7	0	0	63,57	5,7	116	10,4
	2,5	0	96	1194	100	62,54	5,2	24,83	2,1	0	0	47,01	3,9	82,1	6,9
	25	0	95	1222	100	65,14	5,3	26,36	2,2	14,67	1,2	34,97	2,9	79,8	6,5
	0	12,5	93	994	100	33,28	3,3	36,92	3,7	15,97	1,6	26,15	2,6	58,4	5,9
	0	125	95	1189	100	40,1	3,4	4,45	0,4	10,87	0,9	21,44	1,8	47	4
	0	1250	95	1239	100	37,69	3	7,47	0,6	13,61	1,1	18,04	1,5	44,6	3,6
2,5	125	95	2333	100	99,68	4,3	35,27	1,5	12,61	0,5	48,86	2,1	117,2	5	

Remarque : La variabilité de certains facteurs peut être numériquement négative, phénomène pouvant survenir si la variabilité due à ces facteurs est très minime. Dans ces cas, SD = 0 et CV = 0 %.

* Nombre total de réplicats pour chaque panel = 96. Dans certaines séries spécifiques, les réplicats individuels invalides n'ont pas été réanalysés.

Spécificité analytique

La spécificité analytique n'a pas été évaluée pour le système PANTHER. Se référer au chapitre *Caractéristiques de performance analytique du système TIGRIS DTS pour l'Étude d'équivalence de la spécificité analytique*.

Étude de l'équivalence des substances interférentes

Le sang, une substance que l'on trouve couramment dans les échantillons urogénitaux, peut interférer avec certains tests d'amplification. Le degré d'interférence éventuel produit par la présence de sang a été déterminé en utilisant du sang entier. Cette interférence potentielle au niveau de la détection de la présence ou de l'absence de CT et de GT a été évaluée en rajoutant du sang frais aux pools cliniques d'échantillons vaginaux sur écouvillon, de frottis en milieu liquide PreservCyt traités et d'urine. Des concentrations équivalentes estimées de

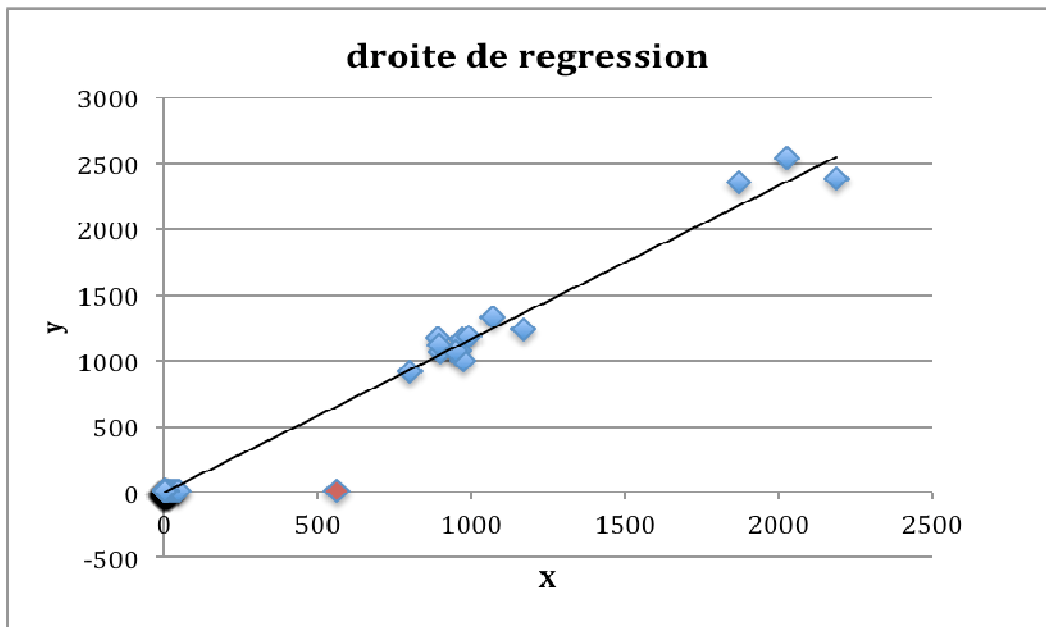
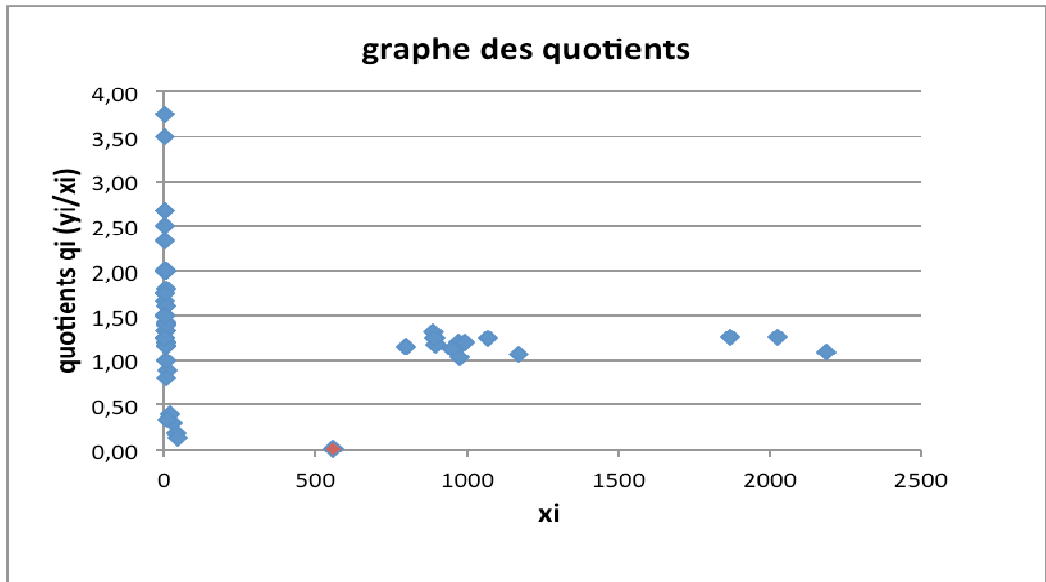
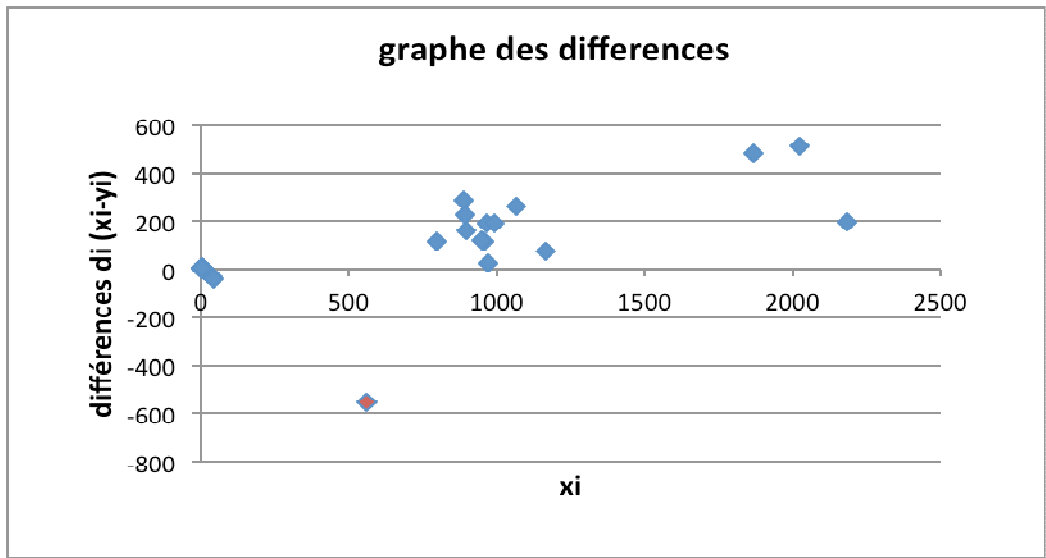
ANNEXE VII

**Comparaison de techniques : tableau des valeurs de RLU, graphes
et droite de régression**

Comparaison de méthodes : tableau des valeurs de RLU obtenues avec les deux techniques

Echantillon n°	x (RLU)	y (RLU)
1	2186	2382
2	897	1057
3	958	1071
4	972	998
5	969	1160
6	799	916
7	1167	1240
8	949	1071
9	561	6
10	890	1174
11	1067	1329
12	1870	2350
13	893	1118
14	2024	2538
15	991	1183
16	3	4
17	4	6
18	3	6
19	5	8
20	2	7
21	3	6
22	2	5
23	5	6
24	9	8
25	3	8
26	3	6
27	6	7
28	3	6
29	3	8
30	4	8
31	4	5
32	6	8
33	3	6
34	6	7
35	6	8
36	6	7
37	5	9
38	3	7
39	5	7
40	27	8
41	3	5
42	5	8
43	20	8
44	5	10

Echantillon n°	x (RLU)	y (RLU)
45	4	15
46	5	10
47	5	7
48	5	10
49	7	10
50	4	6
51	5	5
52	5	6
53	5	7
54	6	8
55	5	7
56	12	4
57	5	4
58	39	7
59	45	6
60	4	7
61	5	7
62	4	5
63	4	7
64	6	7
65	5	8
66	5	7
67	5	7
68	4	6
69	4	5
70	4	6



RESUME

Le laboratoire polyvalent de l'Institut Alfred Fournier est spécialisé dans les infections sexuellement transmissibles. Le sujet de ce mémoire est la vérification des performances d'une méthode de biologie moléculaire pour la détection simultanée de deux bactéries pathogènes transmises par voie sexuelle, *C. trachomatis* (CT) et *N. gonorrhoeae* (GC). Cette étude satisfait aux exigences de la norme EN ISO 15189 et fournit un des éléments obligatoires du dossier d'entrée dans la démarche d'accréditation pour 2013.

Le travail a été structuré en adoptant la démarche recommandée dans le guide SH GTA 04 du COFRAC et en utilisant la roue de Deming ou PDCA. Le projet a alors été planifié en définissant les moyens mis en œuvre, en rédigeant la procédure de vérification des performances d'une méthode, en effectuant une étude bibliographique, en déterminant les paramètres à évaluer et les limites d'acceptabilité. Des tests de fidélité, fidélité intermédiaire, contamination entre échantillons et comparaison avec la méthode déjà utilisée ont ensuite été menés. La justesse et l'incertitude de mesure ont été évaluées par une analyse de risque consécutive à l'élaboration d'un diagramme d'Ishikawa. Les résultats des tests de fidélité ont été analysés à l'aide de calculs de moyenne, d'écart-type et de coefficient de variation. La contamination a été évaluée à l'aide du calcul du pourcentage de contamination. Une étude de comparaison de deux techniques a été effectuée en traçant les graphes des différences, des quotients et une droite de régression.

Ces tests ont permis de conclure aux bonnes performances de la méthode au regard de la pertinence clinique et de l'état de l'art.

L'intérêt de ce de travail a reposé sur l'élaboration de la méthodologie adoptée pour l'évaluation de la technique testée et sur les conclusions à produire quant à l'aptitude de la méthode.