

D.U. « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale »
Année 2012-2013

Validation de méthode en portée B et analyse de risques : méthodes CLHP

* * *

Exemple du dosage de la clozapine

Dr Frédérique LANCELIN
CH Sainte Anne
75014 Paris
Présentation: 23 oct. 2013



Présentation du laboratoire

- Laboratoire:

- Centre Hospitalier Sainte-Anne, Paris 75014.
- Laboratoire de biologie polyvalente, 24h/24h.
- Secteur spécialisé: dosage des médicaments psychotropes

- Rôle:

- Praticien hospitalier responsable de l'unité de **toxicologie-pharmacologie.**

- Assurance qualité:

- Qualification **Bioqualité** obtenue en février 2013.

Contexte

- **Dosages de 50 psychotropes:**
techniques chromatographiques **mises au point** au laboratoire de pharmacologie.
- **Exigence de la norme NF EN ISO 15189:**
Validation les méthodes développées par le laboratoire (§ 5);
Evaluer l'impact des risques potentiels sur le résultat (§ 4).

Qu'en est-il au laboratoire?

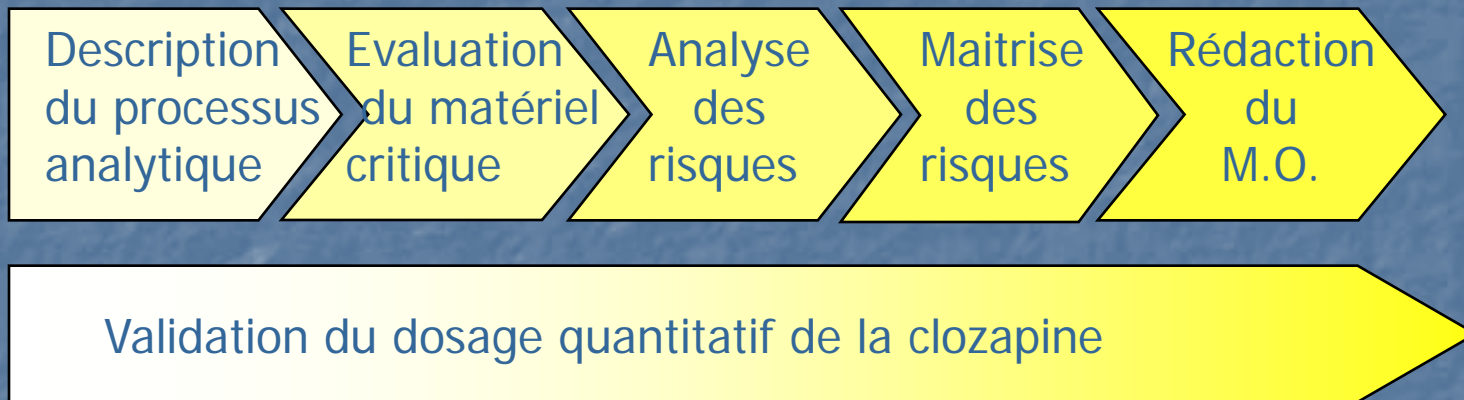
- **Etat des lieux en janvier 2013:**
 - Méthodes de dosage partiellement validées.
 - Analyse de risque non réalisée.
 - Mode opératoire de validation de méthode non rédigé.

Objectif de l'étude

- Réaliser une analyse de risques du processus analytique;
- Rédiger un mode opératoire de validation de méthode;
- Valider le dosage quantitatif de la clozapine sur le système Ultimate 3000

Déroulement de l'étude

■ Les étapes :



■ Les participants :

- Les techniciens habilités en pharmacologie.
- Le service biomédical.
- Le référent qualité en métrologie.

Processus analytique

Etape I: Etalonnage	1- pesée des poudres étalons 2- préparation des solutions stocks et de travail (dilution)
Etape II: Extraction	3- prise d'essai des échantillons patients et des CQ
Etape III: Chromatogra- -phie	4- Intégration des pics chromatographiques 5- Calcul des concentrations (paramétrage)

Matériel critique

Matériel de mesure
Pipettes,
balance,
verrerie volumétrique.



Critique?

OUI



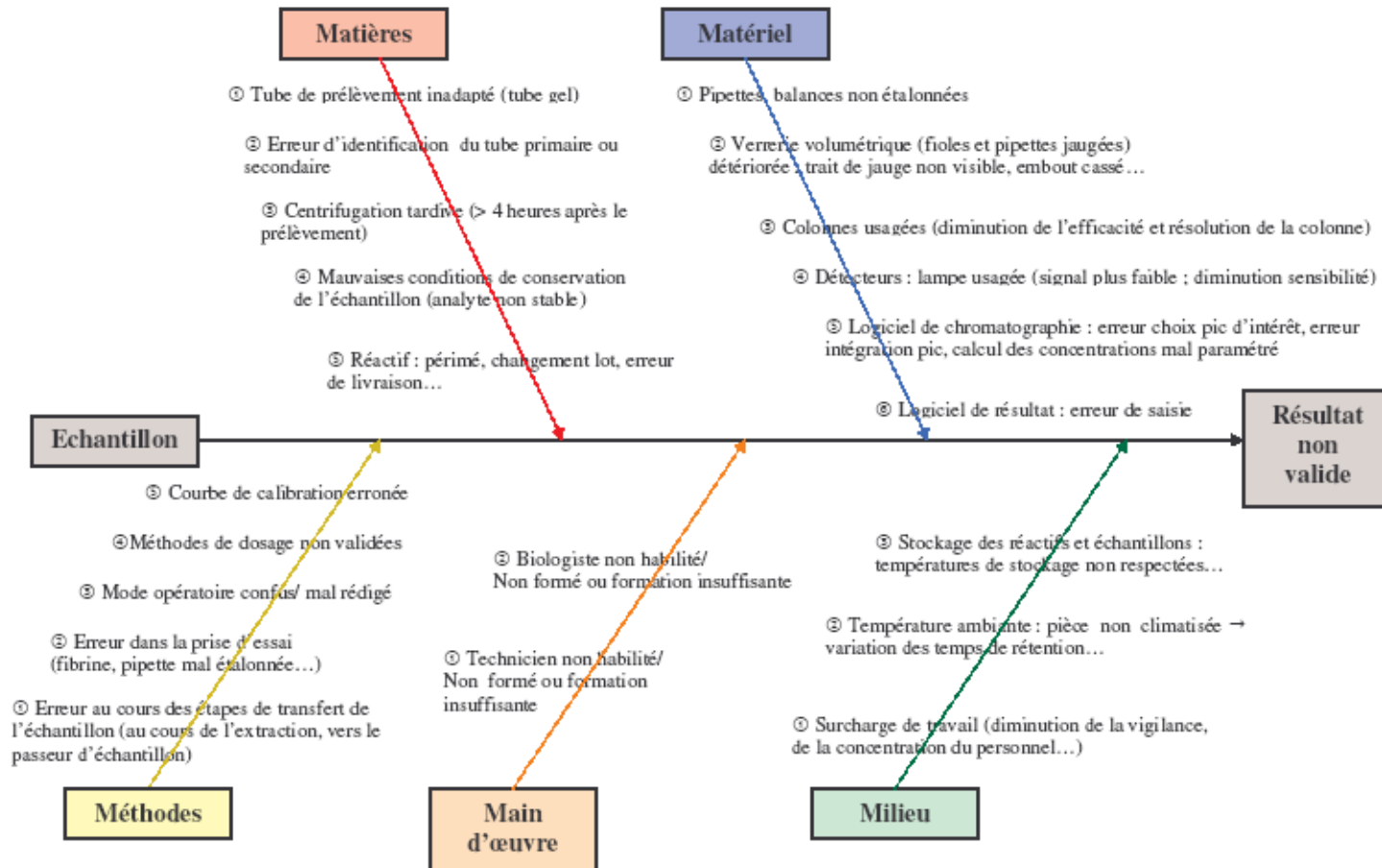
Suivi
métrologique ?



Conforme
à la norme?

Certificat d'étalonnage?
Constat de vérification?
Prestataire accrédité?

Diagramme d'ISHIKAWA



Maitrise des risques

- **Analyse des causes de défaillance du processus analytique:**
 - Comment sont-elles maitrisées ?
 - Que doit-on améliorer ?
- **Tableau de maitrise des risques**

Etape du processus analytique	Description des défaillances	Les causes de défaillance	Actions de prévention	Actions d'amélioration (à prévoir)
-------------------------------	------------------------------	---------------------------	-----------------------	------------------------------------

Tableau III : maitrise des risques au cours du processus analytique.

Etape du processus analytique	Description des défaillances	Les Causes de défaillances	Actions de prévention (à faire)	Actions d'amélioration (à prévoir)
Construction de la courbe de calibration	Courbe de calibration erronée (erreur de pesée, erreur de dilution du matériel d'étalonnage)	Mauvaise utilisation de la balance Balance non justifiée Pipettes non justifiées	MO utilisation de la balance (OPC-LABO-MO 407) Utilisateur en français Vérification en interne de la balance avec un poids de classe E2 avant chaque pesée (OPC-LABO-MO 407) Contrôle volumétrique des pipettes par le technicien référent en métrologie (OPC-LABO-MO 246) + fiche de suivi (OPC-LABO-FE 18)	Faire un raccordement métrologique annuel + vérification de la balance par un prestataire accrédité sur site. Faire un raccordement métrologique annuel + vérification des pipettes par un prestataire accrédité (contrat de location en discussion avec le service biomédical).
Dosage des échantillons	Protocole de dosage non respecté, confus; Méthode de dosage non validée, non adaptée	Formation insuffisante du personnel technique Absence de mode opératoire ; Mode opératoire mal rédigé ; Pas de mise à jour. Absence de MO de validation de méthode	Habilitation du personnel technique en pharmacologie (OPC-LABO-FE 50 tech.) MO pour chaque dosage. Mise à jour tous les deux ans des documents qualifiés (QPR-LABO-PRO 02) Le MO de validation de méthodes mises au point en pharmacologie OPC-LABO-MO 357 est en cours de rédaction	
Détection	Analyte mal ou non détecté	Dysfonctionnement du détecteur Colonne usagée (diminution de l'efficacité et de la résolution)	Fiche de vie des détecteurs ; Changement de la lampe défectueuse. Fiche de suivi des colonnes ; Changement de la colonne défectueuse.	Rédiger un MO pour le changement de lampes de détecteurs UV et fluorimétriques. Rédiger un mode opératoire expliquant la démarche à suivre pour changer une colonne.
Traitement des données chromatographiques	Calcul des concentrations erroné ; Intégration des chromatogrammes	Erreur paramétrage des logiciels d'acquisition et d'intégration des chromatogrammes Intégration du chromatogramme erronée (choix de pics d'intérêt, forme des pics...)	MO du paramétrage des logiciels : OPC-LABO-MO 252 (Empower) ; OPC-LABO-MO 254 (Chromleon) ; OPC-LABO-MO 343 (AZUR). Habilitation du personnel médical en pharmacologie (OPC-LABO-FE 50 bio.) ; Document d'aide à la validation technique et biologique des dosages de médicaments (OPC-LABO-MO 38)	Sécuriser le paramétrage par des codes d'accès ; Vérifier l'intégrité du paramétrage des logiciels de chromatographie.
Validation technique	Validation à tort de la droite d'étalonnage	Absence de CIQ Interprétation du CIQ erronée	Un CIQ est passé dans chaque série de dosage. Suivi de CIQ sur fichier excel ; Fourchettes d'acceptation du CIQ (concentration, pics du fournisseur)	

Courbe d'étalonnage erronée

Causes Pipette ou balance non juste

La vérification et le raccordement métrologique du matériel critique

Vérifier et sécuriser le paramétrage des logiciels de Chromatographie

Calcul des concentrations erroné

Causes: Erreur ou modification du paramétrage de calcul

Rédaction du mode opératoire

- Documents supports :
 - Guides du COFRAC (SH GTA 04),
 - Sociétés savantes (SFBC, SFTA), FDA...
- Les critères de performances :
 - La fidélité, la justesse, l'exactitude, etc...
- Les limites d'acceptabilité
- Les vérifications expérimentales

Validation du dosage de la clozapine

- Date de mise en service :
 - Mars 2012
- Opérateurs :
 - Techniciennes habilitées en pharmacologie (V. Olin et C. Boyer);
- Période d'évaluation :
 - 18/04/2012 au 23/08/2013;

Description de la méthode

Analyte/mesurande	Clozapine
Principe	CLHP couplée à DAD
Type échantillon	Plasma
Prétraitement	Extraction liquide/liquide
Intervalle de référence	350 à 600 ng/ml
Instrument	Ultimate 3000 (Dionex)
Matériau d'étalonnage	Clozapine base (pureté \geq 98%)
Type d'étalonnage	Droite 7 points (10 à 800 ng/ml)



FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...):

Répétabilité: Echantillons niveau 1 et 2 : sérums « drug-free » surchargés en clozapine ; Echantillons niveau 3 et 4 : contrôle interne de qualité.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ³)*	Conclusion ⁴
Echantillon niveau 1	10	9.5	0.56	5.9%	/	20%	Conforme
Echantillon niveau 2	10	44.4	1.83	4.1%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 3	10	192.8	7.53	3.9%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 4	10	468.6	24.9	5.3%	/	15%	Conforme

* Guidance for industry: bioanalytical method validation, Food and Drug Administration (May 2001);
Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (July 2011).

Conclusions : conforme

Fidélité intermédiaire : Echantillons niveau 1 et 2 : sérums « drug-free » surchargés en clozapine ; Echantillons niveau 3 et 4 : contrôle interne de qualité.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ³)*	Conclusion ⁴
Echantillon niveau 1	10	9.2	0.68	7.4%	/	20%	Conforme
Echantillon niveau 2	10	44.6	3.60	8.1%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 3	10	143.6	15.9	11.1%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 4	10	705.4	62.6	8.9%	/	15%	Conforme

* Guidance for industry: bioanalytical method validation, Food and Drug Administration (May 2001);
Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (July 2011).

Conclusions : conforme

Justesse (approche de la) : évaluée à partir de CIQ non externalisés.

Cas des contrôles internes externalisés

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo ²	Cible ^① (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) ^② /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais* (%) limite ³	Conclusion ⁴
Echantillon CIQ niveau 1	10	143.6	147.0	/	-2.3%	/	15%	Conforme
Echantillon CIQ niveau 2	10	705.4	747.0	/	-5.6%	/	15%	Conforme

①Cible fournisseur ; ②Biais (%) /cible fournisseur.

* Guidance for industry: bioanalytical method validation, Food and Drug Administration (May 2001);

Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (July 2011).

Conclusions : Conforme

Exactitude :

Cas des contrôles externes ponctuels (année 2012 et 2013)

Echantillons	Nombre* (N)	Valeur Labo ⁵	Cible fournisseur	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /cible	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ⁶	Conclusion
Mars 2012	72	141.0	121.2	122.9	+16.3	+14.7	+/-15%	Conforme
Avril 2012	81	61.8	66.9	68.7	-7.6	-10.0	+/-15%	Conforme
Mai 2012	78	<10	0	/	/	/	+/-15%	Conforme
Juin 2012	83	154.5	150.3	147.6	+2.8	+4.7	+/-15%	Conforme
Juillet 2012	85	542.7	556.4	551.9	-2.5	-1.7	+/-15%	Conforme
Août 2012	82	294.0	290.1	290.6	+1.3	+1.2	+/-15%	Conforme
Septembre 2012	82	102.1	100.2	101.8	+1.9	+0.3	+/-15%	Conforme
Octobre 2012	84	1213.8	1225.0	1216.6	-0.9	-0.2	+/-15%	Conforme
Novembre 2012	88	199.4	196.1	194.8	+1.7	+2.4	+/-15%	Conforme
Décembre 2012	84	382.6	378.3	377.4	+1.1	+1.4	+/-15%	Conforme
Janvier 2013	80	780.0	788.2	790.4	-1.0	-1.3	+/-15%	Conforme
Février 2013	73	95.3	97.1	97.4	-1.8	-2.2	+/-15%	Conforme
Mars 2013	74	274.9	266.6	266.6	+3.1	+3.1	+/-15%	Conforme
Avril 2013	76	1194.9	1120.9	1100.8	+6.6	+8.5	+/-15%	Conforme
Mai 2013	79	60.3	68.4	70.1	-11.8	-13.9	+/-15%	Conforme
Juin 2013	78	28.5	30.3	32.4	-5.9	-12.0	+/-15%	Conforme
Juillet 2013	82	116.4	121.0	121.4	-3.8	-4.4	+/-15%	Conforme

* nombre total de participants

INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :

Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	<p>Méthode Cofrac CIQ + EEQ</p> $u_1 = S_{\text{repro}} \text{ (CIQ)}$ $u_2 = \text{biais}/\sqrt{3} \text{ (EEQ)}$ <p>(Biais calculé à partir de la moyenne des écarts entre la valeur laboratoire et la valeur cible)</p> $u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2}$ $U = 2 \times u_c$
Quantification de l'incertitude (niveau bas) :	44.6 +/- 7.0 ng/ml
Quantification de l'incertitude (niveau moyen) :	143.6 +/- 16.0 ng/ml
Quantification de l'incertitude (niveau haut) :	705.4 +/- 18.4 ng/ml
Interprétation :	/

Conclusions :

COMPARAISON DE METHODES :

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	NA
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	Détecteur UV monochromatique (Shimadzu SPD-6AV)
Nombre de mesures :	7
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	30 à 500 ng/ml
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres rectangles
Equation de la droite de régression :	$Y = 1.017 X - 0.864$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = 0
Conclusions et dispositions' :	Conforme

INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B)
(si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :

Mode de détermination :	Tests de dilution ; CV inter-essais
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	10 ng/ml (CV inter-essais < 20%)
Limite supérieure de linéarité :	4000 ng/ml

INTERFERENCES

(ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :

Vérification bibliographique :	/
Vérification :	Les molécules médicamenteuses suivantes n'interfèrent pas avec le dosage de la clozapine : cyamémazine, chlorpromazine, loxapine, halopéridol, olanzapine, risperidone, 9-OH risperidone, aripiprazole, amisulpride, quétiapine, norquétiapine, miansérine, paroxétine, fluoxétine, escitalopram, venlafaxine, ODM venlafaxine, duloxétine, diazépam, oxazépam, lorazépam, prazépam, lamotrigine.

CONTAMINATION

(indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)

Inter échantillon pour les paramètres sensibles	Séquence H1H2H3B1B2B3 %de recouvrement = - 0.03% Contamination non significative
Inter réactif si nécessaire	NA

Commentaires éventuels :

Vérification de l'absence de pics interférents aux temps de rétention de la clozapine et de l'étalon interne dans les matrices biologiques utilisées pour réalisés les points de gamme de la droite de calibration.

Conclusion

- Les points positifs :

- Bilan sur les actions d'amélioration;
- M.O de validation de méthode rédigé;
- Validation du dosage de la clozapine (SH form 43).

- Les perspectives :

- Etudier la robustesse et la stabilité des réactifs;
- Valider l'ensemble des méthodes.

- Les difficultés ... à venir :

- Le temps pour valider tous les dosages;
- Le coût (ex.: suivi métrologique).