

Université Pierre et Marie Curie -
Sorbonne Universités

MEMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE DE
BIOLOGIE MEDICALE »

VERIFICATION DE METHODES QUANTITATIVES EN
PORTEE A : APPLICATION A LA DETERMINATION
DES CHARGES VIRALES VIH-1, VHC ET VHB

Kraske – Florent
2014

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

Kraske Florent

Assistant Généraliste – Assistant Qualité au laboratoire de Biologie Médicale

Laboratoire de Biologie Médicale et environnementale

CHU Nantes

9 Quai Moncousu

44093 Nantes Cedex

Table des matières

Abréviations Utilisées	5
1 Introduction	6
1.1 Présentation du CHU	6
1.2 Présentation du laboratoire de biologie médicale	6
1.3 Présentation du service de virologie	7
1.4 Démarche qualité	7
2 Intérêt et objectifs du mémoire	8
2.1 Exigences normatives	8
2.2 Application pour le service de virologie.....	9
2.3 Intérêts de la détermination des charges virales.....	9
2.4 Mise en place de l'étude.....	10
2.5 Limites de l'étude	10
3 Matériel et Méthode.....	11
3.1 Principe de mesure	11
3.2 Matériel et réactifs utilisés	13
3.3 Méthodologie.....	14
4 Résultats et interprétations.....	19
4.1 Résultats	19
4.2 Interprétation	24
4.3 Analyse de risque.....	25
5 Conclusion	28
Références Bibliographiques.....	29
Liste des annexes	31

Abréviations Utilisées

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

COFRAC : Comité français d'accréditation

CRTE : Centre de réception et de traitement des échantillons

CV : Coefficient de variation, exprimé en pourcentage

DI : Document d'information (système documentaire du laboratoire)

dNTPs : désoxyribonucléotide

DURQ : Direction des usagers, des risques et de la qualité

EEQ : Evaluation externe de la qualité

HD : Hôtel-Dieu

HN : Hôpital Nord Laennec

IM : Imprimé (système documentaire du laboratoire)

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

MO : Mode opératoire (système documentaire du laboratoire)

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PR : Procédure (système documentaire du laboratoire)

PSM : Poste de sécurité microbiologique

QCMD : Quality Control for Molecular Diagnostics

RAQ : Responsable assurance qualité

SIL : Système informatique du laboratoire

UV : Ultra-violet

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type I

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

1 Introduction

1.1 Présentation du CHU

Le CHU de Nantes est un établissement public de santé avec une capacité d'accueil de 2632 lits et 474 places répartis sur 7 sites :

- l'Hôtel-Dieu (HD) comprenant 835 lits de court séjour, médicaux et chirurgicaux et regroupant le service des urgences et le Samu
- l'hôpital Nord Laennec (HN) comprenant 526 lits de court séjour, médicaux et chirurgicaux
- l'hôpital Saint-Jacques regroupant les services de rééducation fonctionnelle, psychiatrie et gériatrie
- l'hôpital Mère-Enfant comprenant 321 lits et regroupant les services de gynécologie-obstétriques et ceux destinés aux soins de l'enfant et l'adolescent
- l'hôpital Bellier comprenant 135 lits de court séjour, de soins de suite et réadaptation
- l'hôpital de la Seilleraye, établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes
- la résidence Beauséjour comprenant 120 lits.

1.2 Présentation du laboratoire de biologie médicale

Le laboratoire de biologie médicale du CHU se répartit en deux plateaux techniques dans lesquels sont répartis les différents services :

- Site HD : biochimie générale et spécialisée, hématologie, bactériologie, virologie, parasitologie, immunologie, pharmaco-toxicologie, génétique
- Site HN : biochimie générale, hématologie et bactériologie (mycobactéries)

Pour chaque site, un centre de réception et de traitement des échantillons (CRTE) est présent. Ces centres font l'interface entre les structures de soins et les services du laboratoire. Ils s'occupent de la réception des échantillons, l'enregistrement des demandes d'examens associées, la gestion des non conformités à réception ainsi que la gestion des envois extérieurs.

1.3 Présentation du service de virologie

Le service de virologie est organisé selon le schéma ci-après :

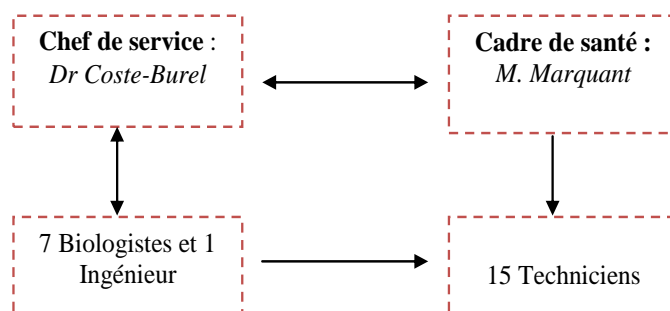


Figure 1 : Organisation du service de Virologie

Trois secteurs d'activités sont présents dans le service de virologie :

- Sérologie : recherche des marqueurs viraux : antigènes et anticorps. Ces analyses sont des dosages immuno-enzymatiques, chimiluminescents.
- Biologie moléculaire : recherche et identification de virus spécifiques, détermination de charges virales.
- Culture cellulaire : inoculations d'échantillons à des lignées cellulaires pour observation d'effets cythopathogènes

1.4 Démarche qualité

L'organisation de la qualité au niveau du laboratoire est détaillée dans le Manuel Qualité. La direction définit la politique qualité à appliquer au laboratoire et participe aux revues de direction annuelles. La mise en œuvre de la politique qualité est assurée par différentes structures :

- Groupe qualité : ce groupe est constitué par un biologiste (au moins) de chaque service de Biologie Médicale et des qualitiens. Sa mission est de proposer des outils et méthodes en lien avec les objectifs de la politique qualité du laboratoire et de suivre les plans d'actions. Des sous-groupes de travail peuvent être organisés sur certaines thématiques (groupe matériel, groupe validation de méthodes, groupe indicateurs...)
- Comité de suivi 15189 (COSU) : Ce comité est constitué de la direction et des qualitiens du Laboratoire, des représentants de chaque service de Biologie Médicale (le cadre de santé, un biologiste et un technicien), un représentant de la DURQ. Ce comité a pour mission d'assurer le suivi du plan d'actions dans le cadre de

la mise en place de la démarche d'accréditation ISO 15189, de suivre les actualités réglementaires et de diffuser toutes informations utiles à la démarche qualité du Laboratoire.

- Comité d'accréditation (COAC) : Ce comité est constitué de professionnels des services de Biologie Médicale qui ont participé à la première phase d'accréditation de 2013 : la biochimie, la génétique, l'immunologie, et la pharmacologie. Les nouveaux services entrant dans la démarche d'accréditation seront associés à ce comité. Ce groupe détermine les actions à réaliser pour répondre aux exigences de la norme ISO 15189

Dans chaque service, un responsable qualité (RAQ) a été nommé (en fonction de la taille du service, il peut y avoir plusieurs RAQ). Il anime et organise la démarche qualité dans son secteur, en appliquant la politique qualité du pôle (revue de direction du service, suivi des indicateurs, suivi de la liste des analyses accréditées, suivi des événements indésirables, gestion documentaire). L'organisation est détaillée en **annexe I**.

Le laboratoire est entré dans la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189. L'audit initial a été réalisé en novembre 2013 pour les domaines suivants : biochimie (62 paramètres), pharmaco-toxicologie (23 paramètres), immunologie (18 paramètres), génétique (27 paramètres). La notification d'accréditation a été reçue en mai 2014. La demande d'extension (nouvelles familles, nouveaux examens inclus ou non dans la portée) a été effectuée en juillet 2014 en incluant les services d'hématologie, de bactériologie, de virologie.

2 Intérêt et objectifs du mémoire

2.1 Exigences normatives

Dans la norme ISO 15189 v. 2012¹, la vérification et la validation des procédures analytiques sont abordées dans les paragraphes 5.5.1.1, 5.5.1.2 et 5.5.1.3 :

- § 5.5.1.1 : « Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue »
- § 5.5.1.2 : Vérification des procédures analytiques : « Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement »
- § 5.5.1.3 : Validation des procédures analytiques : « le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes : méthodes non normalisées, méthodes conçues ou développées par le laboratoire, méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application prévu, les méthodes validées puis modifiées ».

- Note § 5.5.1.3 : « les caractéristiques de performance tiennent compte : de la justesse de mesure, de l'exactitude de mesure, de la fidélité de mesure, de l'incertitude de mesure, de la spécificité analytique, de la sensibilité analytique, de la limite de détection et de la limite de quantification, de l'intervalle de mesure, de la spécificité et de la sensibilité de diagnostic ».

Le guide SH-GTA-04² du COFRAC explicite les exigences de la norme dans le cadre d'une vérification et d'une validation de méthode. Il propose différents moyens de répondre aux critères de validation : répétabilité, reproductibilité, linéarité, contamination.

2.2 Application pour le service de virologie

Le service de virologie participe activement à la démarche d'accréditation et souhaite présenter plusieurs examens dans les familles suivantes, selon le document SH-INF-50³ :

- Sérologie infectieuse (IB1) : Recherche, identification et/ou détermination de la concentration d'anticorps et/ou d'antigènes spécifiques selon des méthodes immunologiques : marqueurs VHB (Ag HBs, Ac anti-HBc, Ac anti-HBs), VHC (Ac anti-VHC), VIH (Ag P24, Ac anti-VIH+Ag P24), Rubéole (IgG anti-rubéole).
- Virologie (VB1) : Détermination de la concentration (quantification) d'acide nucléique viral spécifique (charges virales) : VIH, VHB et VHC.

Les méthodes des charges virales utilisées par le laboratoire s'inscrivent dans une portée flexible standard A. Il s'agit de méthodes « fournisseur » CE/IVD, pour lesquelles seule une vérification est nécessaire. Il s'agit de méthodes de type quantitatif, un résultat chiffré étant fourni.

L'objectif du travail présenté dans ce document est de réaliser la vérification sur site des performances des méthodes de mesure des charges virales VIH, VHB et VHC, afin de garantir la fiabilité des résultats rendus.

2.3 Intérêts de la détermination des charges virales

Une détermination quantitative d'un virus (charge virale) dans le sang circulant peut être réalisée par la mesure de la concentration d'acide nucléique viral spécifique à l'aide de techniques d'amplification (réaction de polymérisation en chaîne : PCR).

La détermination de la charge virale est destinée à être utilisée comme aide pour le suivi de patients souffrant d'infections virales (VHC, VHB, VIH). Ces mesures ne servent pas de test de dépistage, ni de test diagnostique de confirmation de la présence d'une infection virale.

Dans le cadre d'une infection à VIH-1 de groupe M et VIH-1 de groupe O, le test (en association avec d'autres marqueurs biologiques et le tableau clinique) permet d'évaluer le pronostic du patient en détermination le niveau de base d'ARN du VIH-1, d'examiner les effets du traitement antirétroviral en fonction du changement des niveaux d'ARN du VIH-1.

Dans le cas d'une transmission materno-fœtale, le diagnostic de l'infection du nouveau-né par le VIH-1 est possible par la détermination de l'ARN VIH plasmatique (charge virale) ou du génome viral intégré dans les cellules sanguines (PCR ADN) ⁴.

Dans le cadre d'une infection chronique à VHB, la détermination de la charge virale est utilisée pour mesurer les taux d'ADN du VHB de base et au cours du traitement afin d'évaluer la réponse au traitement (interféron alpha, lamivudine, ganciclovir, adéfovir dipivoxil) ; ceci peut également prédire le développement d'une résistance à la lamivudine ⁵.

Dans le cadre d'une infection chronique à VHC, la détermination de la charge virale permet d'évaluer la réponse virale à traitement antiviral (mesures avant, pendant et après le traitement) et d'indiquer l'obtention d'une réponse virologique soutenue (absence d'ARN du VHC détectable 24 semaines après la fin du traitement). Lors du traitement, une réponse virologique précoce (RVP) (diminution de 2 log ou plus après 12 semaines de traitement) est souvent observée ; en cas d'échec virologique précoce le traitement peut être revu ⁶.

2.4 Mise en place de l'étude

La vérification de méthode est réalisée en suivant les étapes suivantes :

- Liste du matériel et réactifs utilisés, description des différentes étapes de la méthode, bibliographie existante
- Définition des critères de performance à valider et des limites acceptables, formalisation sous forme d'un plan d'expérience
- Réalisation des essais de vérification
- Exploitation des données
- Rédaction du rapport de vérification

Parallèlement à ces étapes, une analyse de risque est menée, afin de déterminer les risques potentiels pouvant influencer sur le résultat rendu et les moyens de maîtrises proposés.

2.5 Limites de l'étude

Deux difficultés se posent pour la vérification de méthode des charges virales :

- Peu de données bibliographiques sur les performances de la méthode. Les limites acceptables ont été fixées à l'aide des performances revendiquées par le fournisseur et également en fonction de la pertinence clinique
- Le coût unitaire élevé pour la réalisation d'un test. Le plan expérimental a permis d'estimer la consommation en réactifs et d'optimiser l'organisation pour la réalisation des essais et limiter ainsi le nombre de tests.

3 Matériel et Méthode

3.1 Principe de mesure

La détermination des charges virales est réalisée avec les automates AmpliPrep® (Roche Diagnostics) et TaqMan® 48 (Roche Diagnostics).

3.1.1 AmpliPrep®

L'AmpliPrep®⁷ permet d'automatiser la préparation des échantillons pour le dosage des acides nucléiques. Le principe est résumé dans le schéma ci-dessous :

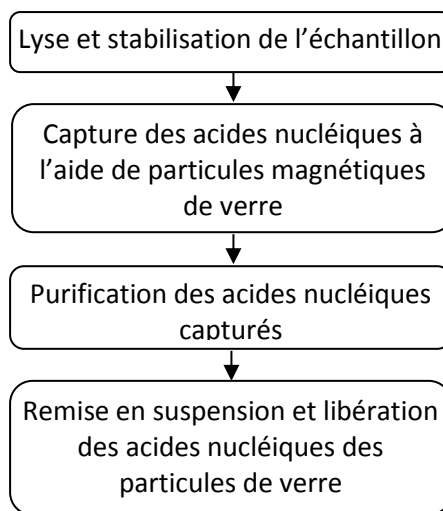


Figure 2 : Principe de l'automate d'extraction AmpliPrep®

Le tube échantillon (plasma) « tube S d'entrée » est traité à l'aide d'une unité de traitement des échantillons « SPU » contenant un embout à filtre (embout K). Ce dispositif permet de maîtriser les contaminations inter-échantillons. Les acides nucléiques extraits sont récupérés dans un tube de sortie (tube K), disposés sur un portoir K « K-carrier ». Ce dernier pourra être chargé directement sur l'automate TaqMan® 48.

Un schéma de l'automate et des unités de traitement SPU sont donnés en **annexes II et III**.

Les particules virales de l'échantillon sont lysées par l'action d'un tampon de lyse et d'une protéinase à température élevée (par les incubateurs de l'automate). Ceci permet la libération des acides nucléiques viraux. Il est également ajouté un standard de quantification (QS), qui permettra de quantifier la charge virale de l'échantillon (cf. § 3.1.2 TaqMan® 48).

L'acide nucléique est ensuite extrait à l'aide de billes magnétiques en verre. L'acide nucléique (échantillon et standard de quantification) se lie aux particules magnétiques. L'échantillon est placé dans une station de séparation équipée d'aimants. Un lavage permet d'aspirer la couche surnageante, mettre en suspension les particules magnétiques dans la solution de lavage. Une séparation consistant à une immobilisation des particules

magnétique sur les parois du tube réactionnel (à l'aide de l'aimant) permet d'éliminer les substances non liées (sels, protéines, impuretés cellulaires).

L'échantillon purifié est ensuite transféré dans un incubateur de libération (incubation à 80°C), permettant d'éluer l'acide nucléique des particules magnétiques. L'échantillon est ajouté à un mélange d'amplification et transféré en tube de sortie « K ».

3.1.2 TaqMan® 48

Un schéma de l'automate TaqMan® 48⁸ est donné en **annexe IV**.

La détection et la quantification de l'acide nucléique viral sont basées sur le principe de la PCR en temps réel.

L'acide nucléique double brin (ADN, hybride) est dénaturé par chauffage pour obtenir un simple brin. Des amorces spécifiques (amorce sens, amorce anti-sens) de la séquence cible s'hybrident sur le brin, par refroidissement. En présence de dNTPs, de Mg²⁺, l'enzyme Z05 (ADN polymérase) permet de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice (phase d'élongation). Ceci correspond à un cycle. Il s'ensuit un deuxième cycle, commençant par la phase de dénaturation. Au fur et à mesure du nombre de cycles, les amplicons synthétisés sont quantifiés.

La détection des amplicons est réalisée à l'aide d'une sonde fluorescente marquée au moyen de marqueurs spécifiques : un fluorochrome émetteur (reporter) et un fluorochrome récepteur (quencher). La fluorescence du reporter est inhibée par le quencher, lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. Un schéma explicatif est présenté en **annexe V**.

Dans chaque échantillon, un standard de quantification est présent (ajouté lors de l'extraction sur l'AmpliPrep®). Il s'agit :

- VIH-1 : ARN recombinant avec des sites de liaisons aux amorces identiques à ceux de la séquence cible (gène gag). La région de liaison à la sonde fluorescente du standard est spécifique (ceci permettant de distinguer l'amplicon du standard de quantification de l'amplicon de l'échantillon ; les sondes possédant des fluorochromes différents émettant à des longueurs d'ondes différentes).
- VHC : ARN recombinant avec des sites de liaisons aux amorces identiques à ceux de la séquence cible. La région de liaison à la sonde fluorescente du standard est spécifique.
- VHB : ADN recombinant avec des sites de liaisons aux amorces identiques à ceux de la séquence cible. La région de liaison à la sonde fluorescente du standard est spécifique.

Le standard de quantification suit le même processus d'analyse que l'échantillon (extraction, transcription inverse, PCR, détection). La charge virale de l'échantillon est déterminée en comparant les signaux de l' « ARN viral » à ceux du standard de quantification pour chaque échantillon. Ceci permet de corriger les variations de l'appareil, les réactions d'inhibition.

3.1.3 Transcription inverse

Pour la détermination des charges virales VHC et VIH-1 (virus à ARN), une étape de transcription inverse est nécessaire pour transformer l'ARN simple brin en hybride ARN/ADNc (ADN complémentaire). Celle-ci est réalisée à l'aide d'enzyme thermostable recombinante Z05, qui présente une activité de transcriptase inverse et une activité d'ADN polymérase. Les amplicons sont générés à partir de cet hybride, selon le processus décrit précédemment.

3.2 Matériel et réactifs utilisés

Le service de virologie est équipé d'un automate AmpliPrep® (Roche Diagnostics) associé à deux automates TaqMan® 48 (Roche Diagnostics), connectés entre eux via le logiciel AmpliLink (Roche Diagnostics).

Les kits réactifs utilisés lors de la vérification de méthodes sont :

- VIH- 1 : Cobas AmpliPrep®/Cobas TaqMan® HIV-1 test, version 2.0 (Roche Diagnostics, réf : 05212294190)
- VHC : Cobas AmpliPrep®/Cobas TaqMan® HCV Quantitative test, version 2.0 (Roche Diagnostics, réf : 05532264190)
- VHB : Cobas AmpliPrep®/Cobas TaqMan® HBV test, version 2.0 (Roche Diagnostics, réf : 04894570190)

Les échantillons testés sont décrits ci-dessous :

- Répétabilité : contrôles positifs forts fournis avec le kit réactif : HBV H(+) C, HIV H(+) C, HCV H(+) C (Roche Diagnostics), contrôles positifs faibles fournis avec le kit réactif : HBV L(+) C, HIV L(+) C, HCV L(+) C (Roche Diagnostics), plasmas de patient (prélevé sur EDTA) positifs pour VIH-1, VHB, VHC. Les dilutions nécessaires ont été réalisées dans du plasma VIH, VHB et VHC négatif (EFS – Pays de la Loire)
- Reproductibilité : contrôles positifs faibles et forts fournis avec le kit réactif
- Exactitude : Programmes EEQ de l'organisme QCMD : HIV RNA A (réf : QAV994108), HBV DNA A (réf : QAV994110), HCV RNA A (réf : QAV994112).
- Contamination inter-échantillon : contrôles positifs faibles et forts fournis avec le kit réactif

- Comparaisons d'automates : contrôles positifs faibles, plasmas de patient (prélevé sur EDTA) positifs pour VIH-1, VHB, VHC. Les dilutions nécessaires ont été réalisées dans du plasma VIH, VHB et VHC négatif (EFS – Pays de la Loire)

3.3 **Méthodologie**

3.3.1 Généralités

La méthodologie employée est basée sur la procédure interne du laboratoire : 7180-PR-022 « Validation de méthodes quantitatives ». Cette procédure décrit les exigences à respecter lors d'une vérification et d'une validation de méthodes. Elle reprend les éléments du guide technique d'accréditation du COFRAC : SH-GTA-04. Les critères de performances à vérifier pour chaque méthode sont donnés dans le tableau 1.

Paramètres à vérifier et/ou à connaître	Vérification sur site Portée de type A
Spécificité	Non
Fidélité (répétabilité – reproductibilité)	Oui
Justesse	Oui
Sensibilité (LOD, LOQ)	Oui pour certains tests
Linéarité	Oui pour certains tests
Contamination entre échantillons	Oui pour certains tests
Stabilité	Non
Robustesse	Non
Interférences	Non
Valeurs normales	Non
Corrélation avec méthode de référence	Oui si existe avec méthode initiale
Corrélation avec méthode déjà utilisée au laboratoire	Oui
Calcul ou approche de l'incertitude de mesure	Oui, dès que possible

Tableau 1 : Critères de performances à étudier lors d'une vérification de méthode ^a

^a Extrait de la procédure interne au laboratoire 7180-PR-022 « Validation des méthodes quantitatives »

L'ensemble de ces critères est repris pour l'élaboration d'un plan d'expérience. Ce dernier est formalisé au laboratoire sous forme de trame^b. Ce plan permet de lister les réactifs et matériel étudiés, les personnes en charge de la vérification, les critères de performance à valider et les limites d'acceptation fixées, le nombre d'essais à réaliser. Les principaux intérêts de travailler avec ce plan sont :

- De définir les critères à vérifier avec les biologistes et techniciens
- De décrire les tests à réaliser pour les techniciens et leur planification
- D'estimer la consommation en réactifs, contrôles, échantillons

3.3.2 Critères de performance à vérifier

3.3.2.1 Répétabilité

La répétabilité consiste à analyser « n » fois (statistiquement significatif) dans la même série le même spécimen dans les conditions les plus strictement identiques.

Niveau	Type d'échantillon	Nombre de mesures	Critères d'acceptabilité
Echantillon patient fort dilué pour avoir plusieurs échantillons faibles (20)	Plasma patient	20	CV < 10 %
Contrôle positif faible	contrôle	12	CV < 10 %
contrôle positif fort	contrôle	12	CV < 10 %

Tableau 2 : Plan expérimental pour l'étude de la répétabilité

Le test étant coûteux, il a été décidé de limiter le nombre d'essais pour les contrôles positifs à 12 mesures. Ces essais de répétabilité ont été associés à l'étude de la contamination inter-échantillon (voir paragraphe contamination inter-échantillon).

Le nombre d'essais pour l'échantillon patient a été limité à 20 : un échantillon présentant une valeur élevée a été dilué dans du plasma négatif pour obtenir des échantillons faiblement positifs.

La moyenne et l'écart-type sont calculés pour chaque type d'échantillon. Le CV obtenu est comparé au CV limite fixé.

Peu de données bibliographiques concernant la répétabilité sont disponibles. La répétabilité est estimée entre 0.7 % et 9 % pour le VHB^{9,10} pour des valeurs allant de 2 log UI/ml à 6 log UI/ml, entre 0.1 % et 7 % pour le VHC¹¹ pour des valeurs allant de 2 log UI/ml à 7 log UI/ml.

^b Enregistrement interne au laboratoire : 7180-IM-062 : « Plan expérimental pour plusieurs examens »

Il a été décidé de fixer le CV limite à 10 %, en vérifiant que l'écart-type calculé soit inférieur à 0.5 log /ml (valeur communément admise en virologie pour une évolution significative de la charge virale).

3.3.2.2 Reproductibilité

La reproductibilité consiste à analyser « n » fois (statistiquement significatif) dans de séries différentes un même spécimen.

Niveau	Type d'échantillon	Nombre de mesures	Critères d'acceptabilité
Contrôle positif faible	contrôle	20	CV < 10 %
contrôle positif fort	contrôle	20	CV < 10 %

Tableau 3 : Plan expérimental pour l'étude de la reproductibilité

La reproductibilité est étudiée de manière rétrospective pour le contrôle positif faible, celui-ci étant inséré systématiquement dans chaque série d'analyse.

Le contrôle positif fort est ajouté aux prochaines séries.

Une reproductibilité sur un échantillon de plasma de patient n'a pas été envisagée, la consommation en échantillon (environ 1 ml par analyse) nécessitant de préparer une quantité importante d'échantillon initial et de s'assurer de sa stabilité.

La moyenne et l'écart-type sont calculés pour chaque type d'échantillon. Le CV obtenu est comparé au CV limite fixé.

Le fournisseur mentionne une reproductibilité comprise entre :

- 2 % et 8.5 % pour une gamme de 2 log copie/ml à 7 log copie/ml pour le VIH-1
- 1 % et 6.5 % pour une gamme de 2 log UI/ml à 7 log UI/ml pour le VHB
- 1 % et 9 % pour une gamme de 2 log UI/ml à 8 log UI/ml pour le VHC

Les données bibliographiques mentionnent une reproductibilité estimée en 0.7 % et 5 % pour le VHB^{9,10} pour des valeurs allant de 2.5 log UI/ml à 4.5 log UI/ml, entre 0.3 % et 7 % pour le VHC¹¹ pour des valeurs allant de 2 log UI/ml à 7 log UI/ml, entre 3 % et 5 % pour des valeurs allant de 2.6 log UI/ml à 4.5 log UI/ml.

Le CV limite a été fixé à 10 %, en vérifiant que l'écart-type calculé soit inférieur à 0.5 log /ml (valeur communément admise en virologie pour une évolution significative de la charge virale).

3.3.2.3 Justesse/exactitude

L'exactitude (justesse dans le cadre de CQI externalisés) permet de déterminer une erreur « systématique » en déterminant le biais entre la valeur mesurée et la valeur « vraie ». Cette

valeur vraie est estimée à l'aide de la valeur moyenne retrouvée par l'ensemble du groupe de pairs.

Les contrôles internes Roche ne sont pas externalisés. L'exactitude est estimée à l'aide des contrôles de qualité externe. L'exactitude est étudiée de manière rétrospective à l'aide des résultats obtenus au programme QCMD.

Le biais est déterminé par la différence « valeur mesurée « x » – valeur vraie « v » ». La valeur vraie correspond au résultat du groupe de pair. Le biais est exprimé en pourcentage à l'aide du rapport :

$$(x - v) / v \times 100$$

Le biais limite en valeur absolue a été fixé 0.5 log /ml (valeur communément admise en virologie pour une évolution significative de la charge virale¹²).

3.3.2.4 Contamination inter-échantillon

La contamination inter-échantillon est maîtrisée à l'aide de différents moyens (Cf. § 4.6 Analyse de risques) : automate fermé, travail sous PSM, UV, protocoles de nettoyages.

Elle est testée à l'aide des contrôles fortement positifs et faiblement positifs, selon les recommandations du guide SH-GTA-04. Après rinçage de l'appareil, un contrôle positif fort est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne H) suivi d'un contrôle positif faible également passé 3 fois (B1, B2, B3). Cette séquence est répétée 4 fois. Il y a ainsi 12 échantillons positifs forts et 12 échantillons positifs faibles passant dans la même série : un portoir d'échantillons permet de recevoir 24 échantillons maximum. Cette étude permet également d'obtenir les données nécessaires pour la répétabilité sur les contrôles.

3.3.2.5 Comparaison intra et inter-automate

Chaque TaqMan® est constitué de 2 thermocycleurs présentant chacun 24 positions. Le service de virologie possède 2 TaqMan®, soit l'équivalent de 4 thermocycleurs. Les échantillons sont chargés sur le thermocycleur à l'aide d'un portoir K « K-Carrier ». La comparaison doit également prendre en compte l'étude des effets de bords. L'étude d'échantillons de concentrations différentes (tel que décrit dans le guide SH-GTA-04) ne permet pas à la fois de s'assurer de l'homogénéité du thermocycleur et de la corrélation entre thermocycleurs.

Il a été décidé de comparer les thermocycleurs d'un même TaqMan® (comparaison intra-automate) à l'aide des données générées pour la reproductibilité. Pour un même lot de contrôle positif faible, le résultat obtenu est associé au thermocycleur utilisé.

Pour la comparaison entre les 2 TaqMan®, le thermocycleur A du TaqMan® 1 est comparé au thermocycleur A du TaqMan® 2. Un plasma patient fort est dilué dans du plasma négatif

(VIH, VHB, VHC négatif) pour obtenir 20 échantillons avec des valeurs basses en charge virale. 10 échantillons sont analysés sur le 1er TaqMan® et 10 échantillons sont analysés sur le 2ème TaqMan® en les plaçant sur les positions du K-carrier ci-dessous (n° souligné et en gras).

23	19	<u>11</u>	15	22
13	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>8</u>	18
<u>9</u>	<u>1</u>	X	<u>2</u>	<u>10</u>
17	<u>7</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	14
21	16	<u>12</u>	20	24

Figure 3 : Positions des échantillons sur le portoir de tubes K (K-Carrier)

Pour chaque échantillon passé, la différence entre les thermocycleurs est calculée :

- Comparaison intra-automate : différence entre le contrôle passé lors de la série actuelle et celui passé lors de la série précédente
- Comparaison inter-automate : différence entre les échantillons disposés sur les mêmes positions d'un K-Carrier

Chaque différence calculée doit être inférieure à 0.5 log /ml

Pour chaque thermocycleur, il est également calculé un CV. Ce dernier doit être inférieur à 10 % (critère fixé pour la répétabilité et reproductibilité).

Comparaison de méthodes		
Concentrations	Effectif	Critères d'acceptabilité
Comparaison 2 thermocycleurs sur CQ faible	10 min	calcul des différences en fonction des positions (différence < 0.5 log; CV < 10 %)
Comparaison 2 TaqMan® sur même échantillon patient	10 sur chaque	calcul des différences en fonction des positions (différence < 0.5 log; CV < 10 %)

Tableau 4 : Plan expérimental pour la comparaison d'automates

3.3.2.6 Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande. Elle peut être estimée à partir de deux composantes qui regroupent les principaux facteurs de variation : l'écart-type de reproductibilité et le biais de la méthode (méthode « CIQ + EEQ » du guide SH-GTA-14¹²).

Les résultats obtenus au cours de la reproductibilité et ceux de l'évaluation externe de la qualité (Programme QCMD) seront utilisés pour calculer l'incertitude.

3.3.2.7 Autres critères de performances

Dans le cadre d'une vérification de méthode, il n'est pas nécessaire de vérifier les critères de performances suivants : spécificité, sensibilité (LOD ; LOQ), linéarité, stabilité, robustesse, interférences, valeurs normales.

Les données bibliographiques^{9,10,14,15,16} permettent d'obtenir ces informations.

4 Résultats et interprétations

Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

4.1 Résultats

4.1.1 Répétabilité

Les résultats obtenus lors de l'étude de répétabilité sont résumés dans le tableau 5.

Test	Echantillon	Nombre	Moyenne (log /ml)	Ecart-type (log /ml)	CV (%)
VIH-1	Contrôle positif faible	12	2.70	0.06	2.3
	Contrôle positif fort	12	5.63	0.05	0.9
	Plasma patient	20	2.89	0.15	5.3
VHC	Contrôle positif faible	12	2.94	0.07	2.5
	Contrôle positif fort	12	6.64	0.07	1.0
	Plasma patient	20	3.26	0.04	1.2
VHB	Contrôle positif faible	12	2.65	0.07	2.7
	Contrôle positif fort	12	6.08	0.05	0.7
	Plasma patient	20	3.13	0.08	2.6

Tableau 5 : Résultats de l'étude de répétabilité

L'ensemble des résultats est conforme aux critères limites fixés : le coefficient de variation est inférieur à 10 % et l'écart-type est inférieur à 0.5 log /ml.

La répétabilité a été étudiée sur les contrôles et sur des dilutions d'un plasma patient. Les amorces et les sondes qui permettent d'amplifier et détecter les contrôles sont les mêmes que celles permettant l'amplification/détection des échantillons : les contrôles comportent des séquences cibles identiques à celles attendues pour un échantillon. Cependant la taille

des acides nucléiques n'est pas la même que celle d'un génome viral complet. Les résultats obtenus permettent de confirmer la répétabilité de la méthode sur échantillons patients.

4.1.2 Reproductibilité

Les résultats obtenus lors de l'étude de reproductibilité sont résumés dans le tableau 6.

Test	Echantillon	Nombre	Moyenne (log /ml)	Ecart-type (log /ml)	CV (%)
VIH-1	Contrôle positif faible	20	2.68	0.08	2.8
	Contrôle positif fort	20	5.60	0.12	2.2
VHC	Contrôle positif faible	20	2.96	0.06	2.0
	Contrôle positif fort	20	6.76	0.08	1.2
VHB	Contrôle positif faible	20	2.56	0.09	3.6
	Contrôle positif fort	20	6.07	0.09	1.5

Tableau 6 : Résultats de l'étude de reproductibilité

L'ensemble des résultats est conforme aux critères limites fixés : le coefficient de variation est inférieur à 10 % et l'écart-type est inférieur à 0.5 log /ml. La méthode est reproductible.

4.1.3 Exactitude

Les résultats obtenus par l'évaluation externe de la qualité (programme QCMD) sont détaillés ci-après (exemples de résultats obtenus pour l'année 2014) :

VIH-1	Valeur Labo (log cp/ml)	Moyenne (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais / groupe de pairs	Biais / moyenne générale	Biais limite (log /ml)
HIVRNA 14A-06 (sous type B)	3.206	3.244	3.247	-0.04	-0.04	0.5
HIVRNA 14A-0A (sous type B)	2.297	2.284	2.298	0.01	0.00	0.5
HIVRNA 14A-07 (sous type B)	3.039	3.04	3.058	0.00	-0.02	0.5
HIVRNA 14A-02 (sous type B)	1.716	2.065	2.082	-0.35	-0.37	0.5
HIVRNA 14A-03 (sous type C)	4.045	3.941	3.942	0.10	0.10	0.5
HIVRNA 14A-08 (sous type C)	2.991	2.92	2.923	0.07	0.07	0.5
HIVRNA 14A-05 (sous type A/G)	4.203	4.198	4.193	0.00	0.01	0.5

Tableau 7 : Résultats de l'étude d'exactitude (VIH-1)

VHC	Valeur Labo (log UI/ml)	Moyenne (groupe de paires)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais / groupe de paires	Biais / moyenne générale	Biais limite (log /ml)
HCV14A-07 (type 1b)	4.612	4.234	4.235	0.38	0.38	0.5
HCV14A-03 (type 1b)	3.523	3.232	3.234	0.29	0.29	0.5
HCV14A-08 (type 3a)	4.174	3.989	3.99	0.19	0.18	0.5
HCV14A-05 (type 3a)	2.987	2.918	2.921	0.07	0.07	0.5
HCV14A-04 (type 3a)	2.124	2.068	2.06	0.06	0.06	0.5
HCV14A-06 (type 3a)	3.938	3.851	3.845	0.09	0.09	0.5
HCV14A-02 (type 3a)	2.973	2.868	2.871	0.11	0.10	0.5

Tableau 8 : Résultats de l'étude d'exactitude (VHC)

VHB	Valeur Labo (log UI/ml)	Moyenne (groupe de paires)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais / groupe de paires	Biais / moyenne générale	Biais limite (log /ml)
HBV14A-06 (type A)	3.814	3.735	3.735	0.08	0.08	0.5
HBV14A-04 (type A)	2.718	2.71	2.707	0.01	0.01	0.5
HBV14A-05 (type A)	1.799	1.801	1.798	0.00	0.00	0.5
HBV14A-03 (type A)	3.752	3.671	3.663	0.08	0.09	0.5
HBV14A-01 (type A)	2.714	2.66	2.659	0.05	0.06	0.5
HBV14A-07 (type D)	3.956	3.696	3.693	0.26	0.26	0.5
HBV14A-02 (type D)	2.851	2.659	2.654	0.19	0.20	0.5

Tableau 9 : Résultats de l'étude d'exactitude (VHC)

L'ensemble des résultats est conforme au critère fixé. Le biais retrouvé est toujours inférieur à 0.5 log cp/ml. La méthode peut être considérée exacte.

4.1.4 Contamination inter-échantillon

La contamination inter-échantillon a été déterminée en alternant des séries de 3 échantillons avec un titre élevé (H1,H2,H3 de moyenne mH) avec des séries de 3 échantillons à titre

faible (B1,B2,B3). Les séquences sont répétées 4 fois. La moyenne B1 et la moyenne B3 a été déterminée et le pourcentage de contamination calculé selon la formule :

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

Les résultats sont détaillés dans le tableau 10.

		Niveau Haut	Niveau bas ₁	Niveau bas ₃	Contamination
VIH - 1	Moyenne	5.63	2.73	2.67	1.96 %
	Ecart type	0.05	0.04	0.07	
	CV%	0.86	1.56	2.50	
VHC	Moyenne	6.64	2.93	2.94	-0.20 %
	Ecart type	0.07	0.07	0.04	
	CV%	1.02	2.51	1.19	
VHB	Moyenne	6.08	2.61	2.65	-0.95 %
	Ecart type	0.05	0.07	0.04	
	CV%	0.74	2.68	1.46	

Tableau 10 : Résultats de l'étude de contamination inter-échantillons

La contamination maximale retrouvée est de 2 %, pour le VIH-1. Un test de Student a été réalisé afin de déterminer si la moyenne mB1 était significativement différente de la moyenne mB3 :

« t » calculé	t° (α = 0.05 ; 6)
1.46	2.45
« t » calculé < t° mB1 n'est pas significativement différent de mB3	

Tableau 11 : Test de Student

mB1 n'est pas significativement différent de mB3 : il n'y a pas de contamination inter-échantillon.

4.1.5 Comparaison de méthodes

4.1.5.1 Comparaison intra-automate

La comparaison des deux thermocycleurs d'un même TaqMan® 48 a été étudiée en utilisant les données de reproductibilité du contrôle positif faible. L'étude sur le VHB est en cours de finalisation (fréquence des séries moindre que le VIH et le VHC).

L'ensemble des résultats est détaillé dans les **annexes VI** et **VII** pour le VIH-1 et le VHC respectivement. Les résultats sont conformes aux critères fixés. Les différences ($X_i - Y_i$) entre 2 thermocycleurs sont toujours inférieures à 0.5 log cp/ml.

Les rapports (Y_i/X_i) sont toujours compris entre 90 % et 110 %. Les coefficients de variations de chaque thermocycleur sont comparables pour un même TaqMan®. Les thermocycleurs d'un même TaqMan® permettent d'obtenir des résultats équivalents.

4.1.5.2 Comparaison inter-automate

Les thermocycleurs (« A » ou « B ») de chaque TaqMan® sont comparés entre eux. Les résultats sont détaillés dans les tableaux présentés en **annexe VIII**.

L'ensemble des résultats est conforme aux critères fixés. Les différences ($X_i - Y_i$) entre 2 thermocycleurs sont toujours inférieures à 0.5 log cp/ml.

Les rapports (Y_i/X_i) sont toujours compris entre 90 % et 120 %. Un rapport à 120 % a été obtenu pour le VIH-1. Ceci s'explique par la préparation manuelle des échantillons dilués à partir d'un échantillon fort. Le résultat prend donc en compte la variabilité due à la dilution et la variabilité due à la mesure analytique. Ce résultat est acceptable, la différence étant égale à 0.5 log cp/ml. Les résultats moyens ainsi que coefficients de variations de chaque TaqMan® sont comparables entre eux. Les 2 TaqMan® permettent d'obtenir des résultats équivalents.

4.1.6 Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est estimée à partir des données de reproductibilité et des résultats d'EEQ (programme QCMD, années 2013 et 2014). Elle est calculée selon la méthode « CIQ + EEQ », décrite dans le guide SH-GTA-14 du COFRAC. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-après.

Test	Niveau	Incertitude de mesure
VIH-1	1	2.68 +/- 0.43 log cp/ml
	2	5.60 +/- 0.28 log cp/ml
VHC	1	2.96 +/- 0.26 log UI/ml
	2	6.78 +/- 0.35 log UI/ml
VHB	1	2.56 +/- 0.32 log UI/ml
	2	6.07 +/- 0.30 log UI/ml

Tableau 12 : Estimation de l'incertitude de mesure

L'incertitude estimée pour chaque niveau et chaque paramètre est inférieure à 0.5 log/ml. L'incertitude est inférieure à valeur communément admise en virologie pour considérer une évolution significative de la charge virale.

4.2 Interprétation

L'ensemble des essais a permis de montrer que la méthode est répétable, reproductible et exacte.

La répétabilité étudiée à la fois sur un échantillon patient dilué et les contrôles internes Roche (séquences cibles identiques ; taille des acides nucléiques différente d'un échantillon patient) ont montré des résultats similaires, permettant de justifier la pertinence d'un suivi automate par les contrôles internes Roche.

Les échantillons issus du programme EEQ (QCMD) ont permis de tester différents types/sous-types de virus : sous-types B et C pour le VIH-1 (sous-type B prédominant en Europe¹⁷), types 1b et 3a pour le VHC (type 1b majoritaire en Europe¹⁸), types A et D pour le VHB (types principaux retrouvés en France¹⁹). Les résultats retrouvés sont en adéquation avec le groupe de pairs (groupe « PCR commerciale ») et le groupe « toute technique ». Les tests de détermination des charges virales permettent d'obtenir des résultats exacts pour les différents types et sous-types de virus testés.

Les tests de contamination n'ont pas mis en évidence de contamination inter-échantillons.

La corrélation entre les thermocycleurs d'un même analyseur TaqMan® et entre les deux TaqMan® disponibles au laboratoire est satisfaisante : les automates peuvent être utilisés en miroir. Le suivi des contrôles internes à long terme permet de vérifier cette corrélation.

Dans le cadre d'une vérification de méthode (portée A), la limite de détection, la linéarité, les interférences n'ont pas été vérifiées. Il aurait été nécessaire de disposer d'un matériau de référence raccordé à standard international pour la limite de détection et de vérifier la

linéarité pour chaque type/sous-type de virus. Le nombre d'essais à réaliser aurait été conséquent afin d'obtenir suffisamment de données à exploiter. La bibliographie et les informations détaillées des fiches techniques permettent d'obtenir ces informations.

4.3 Analyse de risque

Parallèlement à la vérification de méthodes, une analyse de risque a été menée avec les techniciens et biologiste afin de déterminer les points critiques et les moyens de maîtrise proposés. Cette analyse est détaillée en **annexe IX**.

3 risques majeurs ont été identifiés :

- Préparation des tubes « S » à analyser à partir des échantillons de plasma
- Contamination des échantillons
- Dérive du réactif non suivie par les contrôles Roche

4.3.1 Préparation des tubes « S »

Les tubes à placer dans l'automate d'extraction sont des tubes spécifiques « S ». La dilution si nécessaire et le transfert du plasma provenant de l'échantillon dans le tube « S » est une étape manuelle. Lors de cette étape plusieurs risques ont été déterminés, selon la règle des 5 M :

- Inversion d'échantillons (main d'œuvre, méthode)
- Contamination d'échantillons : inter-échantillon, environnement (milieu, matière)
- Erreur de calcul lors de la dilution (main d'œuvre, méthode)

L'inversion d'échantillon est maîtrisée par différents moyens. Les techniciens sont formés et habilités à la préparation des échantillons. L'automate étant connecté au SIL via biolink, une liste de travail est éditée à chaque série à partir des demandes. Cette liste de travail comporte la place des échantillons sur le portoir des tubes S. Lors de la préparation du tube, le technicien vérifie l'adéquation du n° du tube à préparer avec celui indiqué sur la liste de travail pour positionnement sur le portoir. De plus, chaque tube est préparé « un » par « un », en refermant les tubes à chaque fois. Ceci permet d'éviter de transférer le plasma dans un mauvais tube « S ».

En préparant les tubes unitairement, en refermant les tubes à chaque fois, la contamination inter-échantillon lors de la préparation est réduite (utilisation de cônes à filtre à usage unique).

La contamination environnementale ou par l'opérateur est maîtrisée par la préparation des tubes sous PSM, avec utilisation de gants. Le plan de travail, les portoirs et pipettes sont également décontaminés à chaque fin de série à l'aide d'un détergent adapté (ex : Surfanios).

Les échantillons pédiatriques présentent parfois une quantité insuffisante pour réaliser l'analyse. Une dilution est nécessaire dans ce cas. La reproductibilité de l'étape de dilution a été validée lors de la vérification de méthode (préparation d'échantillons dilués à partir d'un échantillon concentré). Les pipettes utilisées pour la dilution sont considérées comme matériel critique et un contrôle métrologique est réalisé périodiquement. Le facteur de dilution appliqué est systématiquement renseigné sur la feuille de travail et le calcul de la charge viral est double vérifié lors de la validation biologique. La limite de détection à appliquer en fonction de la dilution réalisée est également décrite dans un document du laboratoire (9115-DI-099).

4.3.2 Contamination des échantillons lors de l'analyse

Un risque majeur en biologie moléculaire est la contamination d'échantillon. Ceci peut entraîner une inhibition de la PCR, ou bien amplifier un autre acide nucléique que celui de l'échantillon à doser (contamination inter-échantillon).

La contamination par l'environnement ou l'opérateur est limitée par l'utilisation d'un automate fermé. Aucune intervention du technicien lors de l'extraction n'est nécessaire lorsque les tubes « S » sont placés sur l'automate AmpliPrep®. Les tubes K obtenus après extraction sont fermés et ne sont pas ouverts lors du lancement de la PCR en temps réel.

La contamination inter-échantillon a été étudiée lors de la vérification de méthode : aucune contamination n'a été mesurée. Celle-ci est maîtrisée par l'utilisation d'unités réactionnelles SPU, à usage unique (schéma en **annexe II**). Ces unités comportent un cône à usage unique pour le transfert de l'échantillon dans les cuves réactionnelles de l'unité. Elles sont également conçues de manière à ce que l'aiguille réactif ne soit jamais en contact avec l'échantillon (pour limiter la contamination d'un réactif par un échantillon).

La contamination est également maîtrisée par une décontamination rigoureuse et périodique de l'automate. Ces étapes sont détaillées dans un mode opératoire disponible au poste de travail.

4.3.3 Dérive du réactif non suivie par les contrôles Roche

Lors des séries d'analyses un contrôle négatif ainsi qu'un contrôle positif fournis avec le kit Roche sont analysés pour valider automatiquement la série. Les principales défaillances soulevées sont :

- Absence de connaissance des plages d'acceptation fixées par Roche lors de la production des lots
- Changement des lots de contrôle lors du changement du lot de réactif

Le premier point est mineur, l'étude rétrospective des contrôles positifs montrant des valeurs similaires sur plusieurs lots réactifs différents.

Le changement des lots de contrôle lors du changement des lots de réactifs ne permet pas de vérifier la constance de la performance du réactif. Il n'est pas possible d'analyser des contrôles Roche avec des réactifs provenant de kits différents (ceci est mentionné dans les fiches techniques Roche). Un contrôle indépendant (Accurun® multiparamétrique, Ingen) a été mis en place afin de vérifier la performance inter-lot des réactifs.

Un suivi de l'ensemble de contrôles (contrôle indépendant et contrôles Roche), via un tableur Excel validé est réalisé, afin d'assurer de la performance de l'analyse et la similarité des résultats lors d'un changement de lots réactifs. Une démarche de conduite à tenir en cas d'un contrôle non conforme est en cours de préparation.

5 Conclusion

La vérification de méthode pour la détermination des charges virales VIH-1, VHB et VHC a été réalisée, selon les recommandations du guide SH-GTA-04 publié par le COFRAC, afin de s'assurer des performances revendiquées par le fabricant et ainsi de la fiabilité des résultats rendus.

La méthode est répétable et reproductible. Elle est également exacte, les biais évalués étant toujours conformes aux critères fixés. Les thermocycleurs des différents TaqMan® sont corrélés entre eux et ne montrent pas d'effet de bord.

Une analyse de risque a été menée afin d'identifier les risques potentiels et les moyens mis en œuvre pour les maîtriser. Ceci a notamment permis une vérification plus approfondie des performances des réactifs, par la mise en place d'un contrôle qualité interne indépendant.

Cette vérification de méthode a permis d'intégrer le poste de travail « Charge virale » dans la démarche d'accréditation du laboratoire selon la norme ISO 15189 de manière concrète. Un état des lieux des pratiques, de la documentation existante, du circuit de l'échantillon au résultat a ainsi été abordé par les différents acteurs de ce poste (techniciens, biologistes, cadre, centre de réception des prélèvements) grâce à leur implication.

Dans la démarche logique « PDCA », la vérification de méthode a été planifiée et réalisée en rédigeant les rapports de vérifications finaux. L'ensemble sera par la suite évalué lors d'un audit interne (prévu en octobre prochain) afin de déterminer les prochaines pistes d'amélioration.

Références Bibliographiques

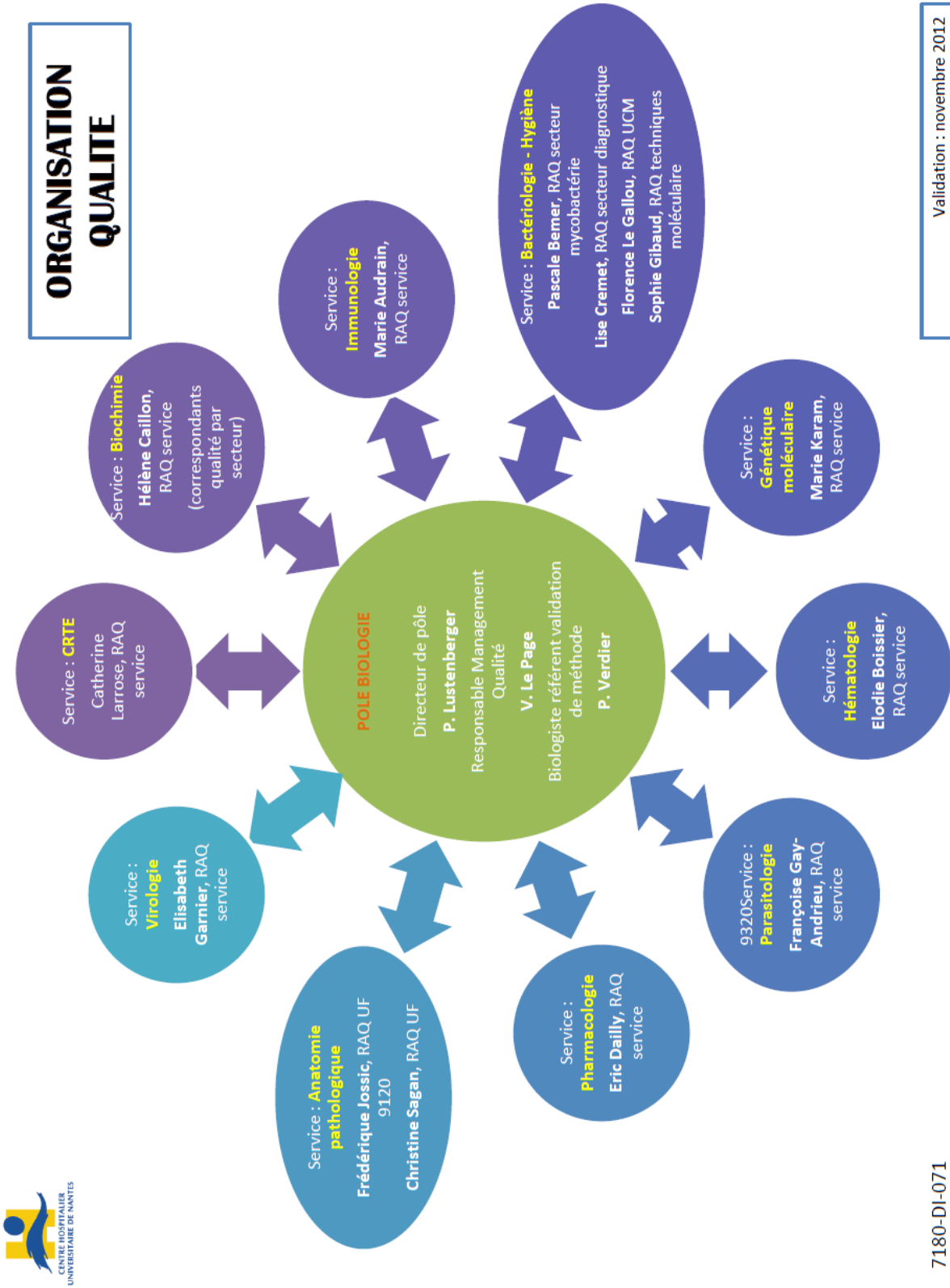
1. Norme NF EN ISO 15189, AFNOR, 2010
2. SH-GTA-04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, rev. 00, COFRAC, 2011
3. SH-INF-50. Portées-types d'accréditation, rev. 01, COFRAC, 2014
4. Fiche technique COBAS AmpliPrep®/COBAS TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0, Roche Molecular Diagnostics
5. Fiche technique COBAS AmpliPrep®/COBAS TaqMan® HBV Test, version 2.0, Roche Molecular Diagnostics
6. Fiche technique COBAS AmpliPrep®/COBAS TaqMan® HCV Test, version 2.0, Roche Molecular Diagnostics
7. Manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS AmpliPrep®, version 1.3, Roche Molecular Diagnostics
8. Manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS TaqMan® 48, version 1.3, Roche Molecular Diagnostics
9. Pyne M. T. et al. Comparison of three Roche hepatitis B virus viral load assay formats. *J. Clin. Microbiol.* 2012 ; 50 (7) : 2337-2342
10. Chevaliez S. et al. Performance of version 2.0 of the Coabs AmpliPrep®/Cobas TaqMan® real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J. Clin. Microbiol.* 2010 ; 48 (10) : 3641 – 3647
11. Pyne M. T., Hillyard D. R. Evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep®/cobas TaqMan® HCV test. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* 2013 ; 77 : 25-30
12. Pawlotsky J. M. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples : can we trust the assays ?. *Hepatology.* 1997 ; 26 (1) : 1-4
13. SH-GTA-14. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, rev. 00, COFRAC, 2011
14. Sizmann D. et al. Improved HIV-1 RNA quantitation by Cobas AmpliPrep®/Cobas TaqMan® HIV-1 test, v 2.0 using a novel dual-target approach. *J. Clin. Virol.* 2010 ; 49 : 41-46
15. Verhmeiren J. et al. Development of a second version of the Cobas AmpliPrep®/Coabs TaqMan® hepatitis C virus quantitative test with improved genotype inclusivity. *J. Clin. Microbiol.* 2011 ; 49 (9) : 3309-3315
16. Zitzer H. et al. Second-generation Cobas AmpliPrep®/Cobas TaqMan® HCV quantitative test for viral load monitoring : a novel dual-probe assay design. *J. Clin. Microbiol.* 2013 ; 51 (2) : 571-577

17. Geretti A. M. et al. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect. Dis.* 2009 ; 48 : 1296–1305
18. Nousbaum J. B. Les sous-types génomiques du virus de l'hépatite C: épidémiologie, diagnostic et conséquences cliniques. *B. Soc. Pathol. Exot.* 1998 ; 91 : 29-33
19. Halfon P. et al. Les génotypes du virus de l'hépatite B : Implications cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques. *Gastroen. Clin. Biol.* 2002 ; 26 : 1005-1012

Liste des annexes

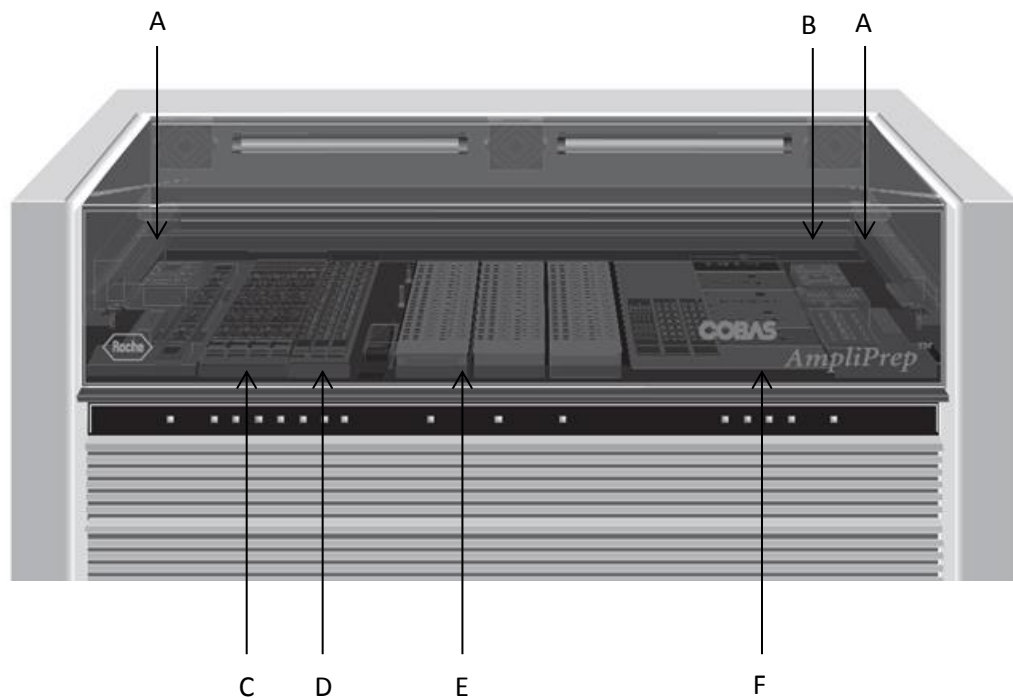
Annexe I : Organisation qualité au laboratoire de biologie médicale	32
Annexe II : Schéma de l'automate AmpliPrep®	33
Annexe III : Schéma d'une unité réactionnelle SPU.....	34
Annexe IV : Principe de fonctionnement d'un automate TaqMan®	35
Annexe V : Principe de la PCR en temps réel avec sonde TaqMan®	35
Annexe VI : Comparaison intra-automate : Thermocycleurs d'un même TaqMan® (VIH-1)..	37
Annexe VII : Comparaison intra-automate : Thermocycleurs d'un même TaqMan® (VHC) ..	38
Annexe VIII : Comparaison des automates TaqMan®	39
Annexe IX : Analyse de risques de la détermination des charges virales.....	41

Annexe I : Organisation qualité au laboratoire de biologie médicale



7180-DI-071

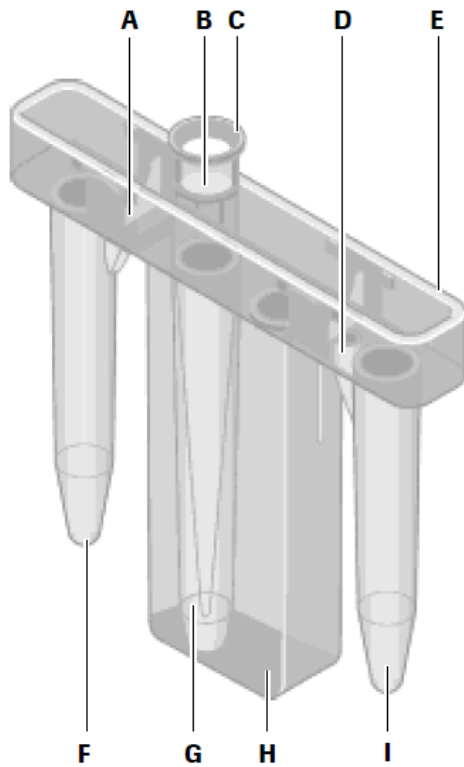
Annexe II : Schéma de l'automate AmpliPrep®



- A : Bras de Transfert + Station de lavage des aiguilles réactifs
- B : Portoir de tubes « K » (K-Carrier)
- C : Rack Réactifs
- D : Zone de chargement des échantillons
- E : Incubateurs de traitement des échantillons
- F : Stations de séparations

Schéma Extrait du manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS AmpliPrep®

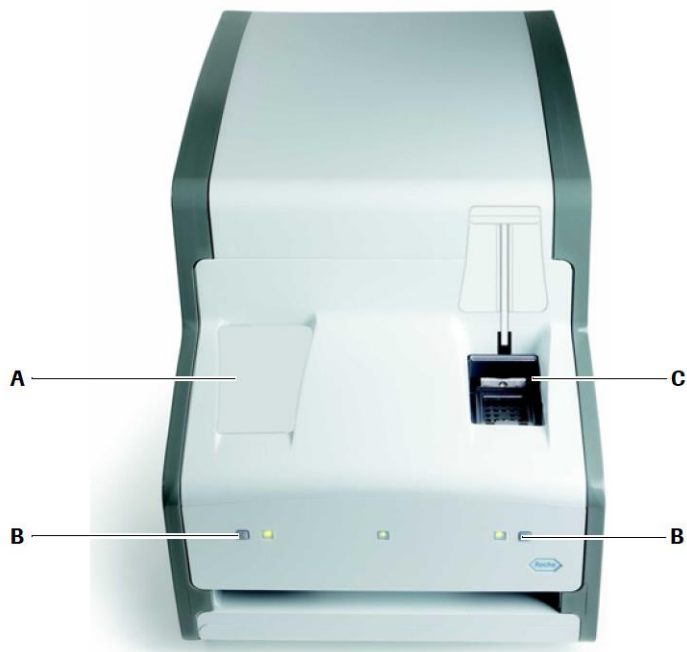
Annexe III : Schéma d'une unité réactionnelle SPU



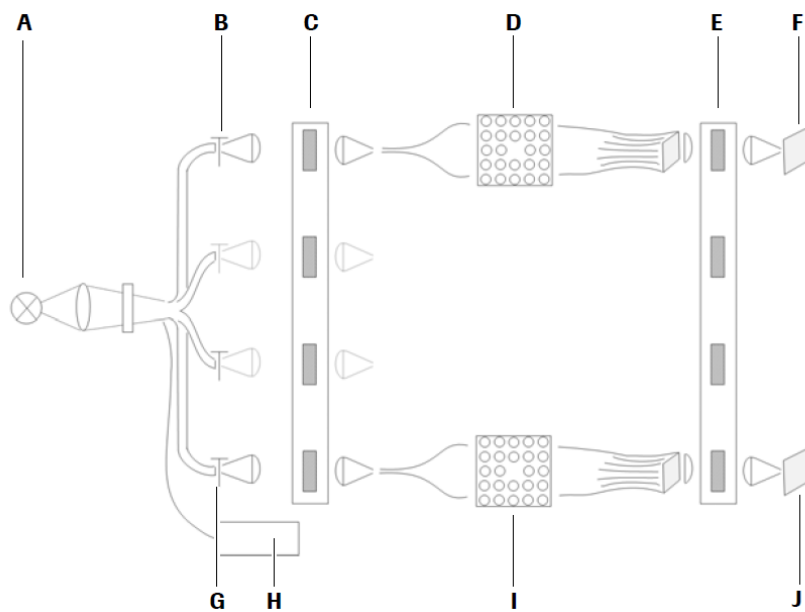
- | | |
|--|---|
| A Entonnoir d'entrée de réactif | F Colonne de traitement à 60 °C (mode spécifique) |
| B Filtre | G Colonne d'embout échantillon |
| C Embout d'échantillon | H Colonne de déchets |
| D Entonnoir d'entrée de réactif | I Colonnes de traitement à 37 °C et 80 °C (mode générique) |
| E Système anti-projection | |

Schéma extrait du manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS AmpliPrep®

Annexe IV : Principe de fonctionnement d'un automate TaqMan®



- A** Thermocycleur A (TCA) aux clapet et plaque coulissante fermés **C** Thermocycleur B (TCB) aux clapet et plaque coulissante ouverts
B Bouton de commande



- A** Source d'excitation **G** Obturateur TCB
B Obturateur TCA **H** Canal de référence
C Roue à filtre d'excitation comportant 4 filtres **I** Thermocycleur B à 24 positions
D Thermocycleur A à 24 positions **J** Photo ASIC TCB
E Roue à filtre d'émission comportant 4 filtres
F Photo ASIC TCA

Schéma et photographie extraits du manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS TaqMan® 48

Annexe V : Principe de la PCR en temps réel avec sonde TaqMan®

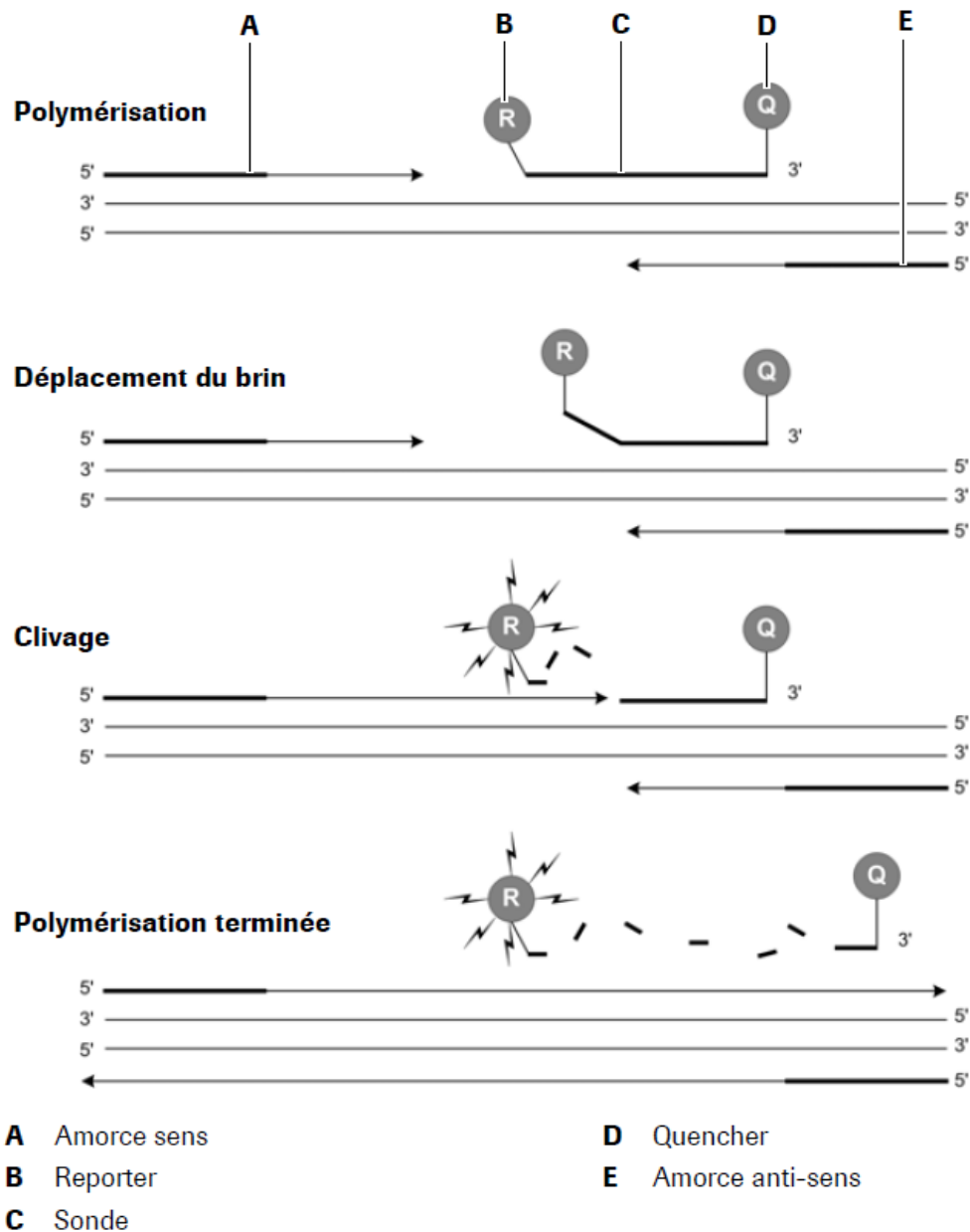


Schéma extrait du manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS TaqMan® 48

Annexe VI : Comparaison intra-automate : Thermocycleurs d'un même TaqMan® (VIH-1)

VIH-1	Série X TaqMan® 1103 Thermocycleur A	Série Y TaqMan® 1103 Thermocycleur B	Moyenne (X _i ; Y _i)	Différences [X _i - Y _i]	Rapport (Y _i / X _i) %
1	2.69	2.85	2.8	-0.2	106
2	2.79	2.77	2.8	0.0	99
3	2.91	2.75	2.8	0.2	95
4	2.78	2.68	2.7	0.1	96
5	2.55	2.70	2.6	-0.2	106
6	2.63	2.66	2.6	0.0	101
7	2.71	2.56	2.6	0.2	94
8	2.79	2.73	2.8	0.1	98
9	2.64	2.63	2.6	0.0	100
10	2.62	2.60	2.6	0.0	99
Moyenne	2.71	2.69	/	/	/
CV (%)	3.9	3.2	/	/	/
Minimum	/	/	/	-0.2	94
Maximum	/	/	/	0.2	106

Comparaison des thermocycleurs (VIH-1) – TaqMan® n°1103

VIH-1	Série X TaqMan® 1637 Thermocycleur A	Série Y TaqMan® 1637 Thermocycleur B	Moyenne (X _i ; Y _i)	Différences [X _i - Y _i]	Rapport (Y _i / X _i) %
1	2.69	2.75	2.7	-0.1	102
2	2.64	2.69	2.7	0.0	102
3	2.64	2.69	2.7	0.0	102
4	2.68	2.82	2.8	-0.1	105
5	2.77	2.75	2.8	0.0	99
6	2.81	2.62	2.7	0.2	93
7	2.76	2.75	2.8	0.0	100
8	2.82	2.85	2.8	0.0	101
9	2.68	2.69	2.7	0.0	100
10	2.38	2.45	2.4	-0.1	103
Moyenne	2.69	2.71	/	/	/
CV (%)	4.7	4.1	/	/	/
Minimum	/	/	/	-0.1	93
Maximum	/	/	/	0.2	105

Comparaison des thermocycleurs (VIH-1) – TaqMan® n°1637

Annexe VII : Comparaison intra-automate : Thermocycleurs d'un même TaqMan® (VHC)

VHC	Série X TaqMan® 1103 Thermocycleur A	Série Y TaqMan® 1103 Thermocycleur B	Moyenne (X _i ; Y _i)	Différences [X _i - Y _i]	Rapport (Y _i /X _i) %
1	2.84	2.65	2.7	0.2	93
2	2.83	2.81	2.8	0.0	99
3	2.85	2.83	2.8	0.0	99
4	2.78	2.89	2.8	-0.1	104
5	2.85	2.87	2.9	0.0	101
6	2.92	2.85	2.9	0.1	98
7	3.06	3.00	3.0	0.1	98
8	3.20	2.97	3.1	0.2	93
9	3.09	2.95	3.0	0.1	95
10	3.04	2.96	3.0	0.1	97
Moyenne	2.95	2.89	/	/	/
CV (%)	4.8	3.6	/	/	/
Minimum	/	/	/	-0.1	93
Maximum	/	/	/	0.2	104

Comparaison des thermocycleurs (VHC) – TaqMan® n°1103

VHC	Série X TaqMan® 1637 Thermocycleur A	Série Y TaqMan® 1637 Thermocycleur B	Moyenne (X _i ; Y _i)	Différences [X _i - Y _i]	Rapport (Y _i /X _i) %
1	2.78	2.78	2.7	-0.1	102
2	2.68	2.81	2.7	0.0	102
3	2.84	2.83	2.7	0.0	102
4	2.75	2.75	2.8	-0.1	105
5	2.85	2.87	2.8	0.0	99
6	2.84	2.83	2.7	0.2	93
7	2.99	2.95	2.8	0.0	100
8	2.88	3.03	2.8	0.0	101
9	2.92	3.01	2.7	0.0	100
10	3.01	2.94	2.4	-0.1	103
Moyenne	2.85	2.88	/	/	/
CV (%)	3.6	3.4	/	/	/
Minimum	/	/	/	-0.1	93
Maximum	/	/	/	0.1	105

Comparaison des thermocycleurs (VHC) – TaqMan® n°1637

Annexe VIII : Comparaison des automates TaqMan®

VIH-1	Série X TaqMan® 1103 Thermocycleur A	Série Y TaqMan® 1637 Thermocycleur A	Moyenne ($X_i ; Y_i$)	Différences [$X_i - Y_i$]	Rapport (Y_i / X_i) %
1	2.84	2.73	2.8	0.1	96
2	2.89	3.09	3.0	-0.2	107
3	2.71	2.97	2.8	-0.3	110
4	2.83	3.03	2.9	-0.2	107
5	2.96	2.87	2.9	0.1	97
6	2.64	2.89	2.8	-0.2	109
7	2.99	2.91	2.9	0.1	97
8	2.55	3.01	2.8	-0.5	118
9	2.91	3.19	3.1	-0.3	110
10	2.87	2.80	2.8	0.1	98
Moyenne	2.88	2.95	/	/	/
CV (%)	4.9	4.7	/	/	/
Minimum	/	/	/	-0.5	96
Maximum	/	/	/	0.1	118

Comparaison des automates TaqMan® (VIH-1)

VHC	Série X TaqMan® 1103 Thermocycleur B	Série Y TaqMan® 1637 Thermocycleur B	Moyenne ($X_i ; Y_i$)	Différences [$X_i - Y_i$]	Rapport (Y_i / X_i) %
1	3.21	3.22	3.2	0.0	100
2	3.31	3.31	3.3	0.0	100
3	3.27	3.15	3.2	0.1	96
4	3.31	3.31	3.3	0.0	100
5	3.28	3.27	3.3	0.0	100
6	3.28	3.26	3.3	0.0	99
7	3.28	3.27	3.3	0.0	100
8	3.24	3.26	3.3	0.0	101
9	3.22	3.26	3.2	0.0	101
10	3.25	3.28	3.3	0.0	101
Moyenne	3.26	3.26	/	/	/
CV (%)	1.1	1.4	/	/	/
Minimum	/	/	/	0.0	96
Maximum	/	/	/	0.1	101

Comparaison des automates TaqMan® (VHC)

VHB	Série X TaqMan® 1103 Thermocycleur A	Série Y TaqMan® 1637 Thermocycleur A	Moyenne (X _i ; Y _i)	Différences [X _i - Y _i]	Rapport (Y _i / X _i) %
1	3.21	3.13	3.2	0.1	98
2	3.18	3.09	3.1	0.1	97
3	3.03	3.16	3.1	-0.1	104
4	3.24	3.01	3.1	0.2	93
5	3.05	3.08	3.1	0.0	101
6	3.30	3.10	3.2	0.2	94
7	3.11	3.05	3.1	0.1	98
8	3.17	3.08	3.1	0.1	97
9	3.16	3.09	3.1	0.1	98
10	3.25	3.04	3.1	0.2	94
Moyenne	3.13	3.08	/	/	/
CV (%)	2.8	1.4	/	/	/
Minimum	/	/	/	-0.1	93
Maximum	/	/	/	0.2	104

Comparaison des automates TaqMan® (VHB)

Annexe IX : Analyse de risques de la détermination des charges virales

Données d'entrée	Défaillances possibles	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) Type de récipient (tube, additifs, ...)	Erreur de tube initial à prélever	description des conditions de prélèvements dans le manuel de prélèvement gestion des non conformités à la réception
Prétraitement de l'échantillon : (centrifugation, dilution, ...)	<u>Erreur de dilution :</u> - pipette défectueuse - erreur technicien	Métrologie des pipettes : Maintenance des pipettes (7180-MO-004), Charte organisationnelle de la métrologie des pipettes (7180-DI-065) Habilitation du technicien Mode opératoire 9115-MO-180 validé lors de la validation de méthode, double vérification de la saisie manuelle.
Main d'œuvre : (habilitation du personnel) :	<u>Préparation des tubes "S" pour passage sur AmpliPrep® à partir des aliquotes de plasma :</u> - Inversion d'échantillons sur le portoir	Création de la liste de travail à partir de la liste Dxlab : attribution d'une place sur le portoir pour chaque échantillon, vérification de l'adéquation n° d'échantillon et liste de travail lors de la préparation par le technicien. Préparation des tubes "un par un" (pas d'ouverture de plusieurs tubes en même temps).
	<u>Erreur dans l'utilisation de l'automate AmpliPrep®/TaqMan® :</u> - Blocage de l'instrument	Habilitation des techniciens et maintien des compétences Description de l'utilisation de l'automate : chargement des réactifs et consommables (9115-MO-174), utilisation en début/fin de journée (9115-MO-172; 9115-MO-187), lancement et transfert d'une série (9115-MO-180)
Conditions ambiantes requises : (température, organisation des locaux, éclairage, ...)	<u>Préparation des tubes "S" pour passage sur AmpliPrep® :</u> Contamination des échantillons (contamination inter-échantillon, contamination extérieure)	Travail sous PSM pour la préparation des échantillons. Utilisation de cônes à filtre stériles (usage unique) pour chaque échantillon. Préparation des tubes "un par un" (pas d'ouverture de plusieurs tubes en même temps). Utilisation de gants lors de la préparation d'échantillons. Décontamination du plan de travail, du portoir, des pipettes après chaque série (détergent de type Surfanios ou équivalent).
	Conditions d'utilisation des appareils AmpliPrep® et TaqMan® non respectées (15°C-32°C)	Travail en pièce climatisée
	<u>Transfert des échantillons entre l'AmpliPrep® et le TaqMan® :</u> - Risque d'altération des échantillons par une exposition prolongée à la lumière - 2h max. pour transfert sur TaqMan®	Les parois de l'AmpliPrep® sont en plastique transparent teinté (pas d'exposition à la lumière). Les échantillons ne sont pas déchargés en attendant d'être placés sur le TaqMan®. Pas de série lancée sur l'AmpliPrep® après 14h00.
Réactif : (référence fournisseur, version, ...)	Utilisation de réactifs périmés	En pratique peu probable (consommation importante de réactifs) Enregistrement des réactifs et suivi des péremptions par Gesstock Date de péremption enregistrée dans le code à barre réactif => alarme de l'automate

Données d'entrée	Défaillances possibles	Modalités de maîtrise
Réactif : (référence fournisseur, version, ...)	Stabilité après ouverture / stabilité sur l'automate	Suivi automatique du kit en cours d'utilisation par l'automate (logiciel Amplilink) => alarme automate
	Contamination du réactif par un échantillon	Aiguille de prélèvement de l'automate utilisée uniquement pour le prélèvement de réactif. Pas de contact entre un échantillon et l'aiguille réactif par l'utilisation des SPU.
	Contamination du réactif	Nettoyage des aiguilles réactif sur une tour de lavage après chaque transfert Nettoyage quotidien des tours de lavage à l'éthanol à 70%
	Stockage des réactifs non suivi : altération des réactifs	Stockage des réactifs à 2°C-8°C conformément aux recommandations fournisseur dans un réfrigérateur cartographié et suivi en température.
	Suivi des versions	Alerte par myRoche Diagnostics et sticker fluo Fichier avec dernière version en cours d'application.
Matériau de référence : (témoins, ...)	CQI non conforme / Absence de suivi de performance des réactifs	CQI fournisseur bloquant, CQI indépendant : suivi des contrôles et marche à suivre en cas de CQI non conforme décrite dans la procédure de gestion des contrôles (9115-DI-134)
Equipements :	Absence de maintenance: dérèglement de l'appareillage	Maintenance quotidienne et périodique (9115-MO-181, 9115-IM-096) Maintenance préventive assurée par Roche
	Absence d'identification pour accès sur l'automate : Traçabilité incomplète	Mise à jour des profils utilisateurs
	Contamination inter-échantillons dans l'automate	Utilisation du système SPU limitant les contaminations inter-échantillons. Test de contamination réalisé en vérification de méthode : pas de contamination retrouvée.
	Contamination des échantillons dans l'automate	Décontamination hebdomadaire des portoirs (portoirs SPU, sample racks et racks réactifs), des K-Karrier, par DNAway éthanol à 70% et eau distillée Nettoyage quotidien de l'automate (éthanol 70%, eau distillée) Purge du système de rinçage 1 à 2 fois par semaine Ces opérations sont détaillées dans le mode opératoire de maintenance. Décontamination de l'automate par la présence de lampes UV
	Contamination par déchets de l'automate, consommables (embouts de pipettes, tubes,..)	Document CV-fin de journée 9115-MO-187 pour la gestion des déchets
Exigences métrologiques* :	Pipettes pour dilution des échantillons	Métrologie des pipettes : Maintenance des pipettes (7180-MO-004), Charte organisationnelle de la métrologie des pipettes (7180-DI-065)
Exigences informatiques spécifiques* :	Connexions SIL amplilink automate	vérification à chaque série liste de travail et liste amplilink

Résumé

Dans le cadre de l'accréditation selon la norme ISO 15189, le laboratoire de biologie médicale du CHU de Nantes présente une demande d'extension pour des examens en virologie : marqueurs sérologiques et charges virales (VIH, VHB et VHC). Dans cette démarche, le laboratoire doit prouver la maîtrise du processus analytique grâce à une vérification des méthodes d'analyses employées.

Ce mémoire présente la méthodologie et les résultats obtenus pour la vérification de la détermination des charges virales. Ces dernières sont réalisées à l'aide des réactifs et automates Roche Cobas AmpliPrep® et TaqMan® 48. L'utilisation des guides techniques SH-GTA-04 et SH-GTA-14 publiés par le COFRAC a permis de définir les critères de performances à vérifier : répétabilité, reproductibilité, exactitude, estimation de l'incertitude de mesure, contamination, comparaison d'automates. Les essais ont été réalisés sur les contrôles internes, contrôles externes et plasma humain. Ils ont permis de conclure que les méthodes d'analyses sont répétables, reproductibles (coefficient de variation inférieur à 10 %, écart-type inférieur à 0.5 log /ml) et exactes (biais inférieur à 0.5 log/ml). L'absence de contamination inter-échantillon a été démontrée. La corrélation satisfaisante des deux automates Cobas TaqMan® permet une utilisation en miroir.

Parallèlement à la vérification des performances de l'automate, une analyse de risque a été menée afin d'identifier les risques potentiels et les moyens mis en œuvre pour les maîtriser. Ceci a permis de mettre en place une vérification plus approfondie des performances des réactifs grâce à l'acquisition d'un contrôle qualité interne indépendant.