



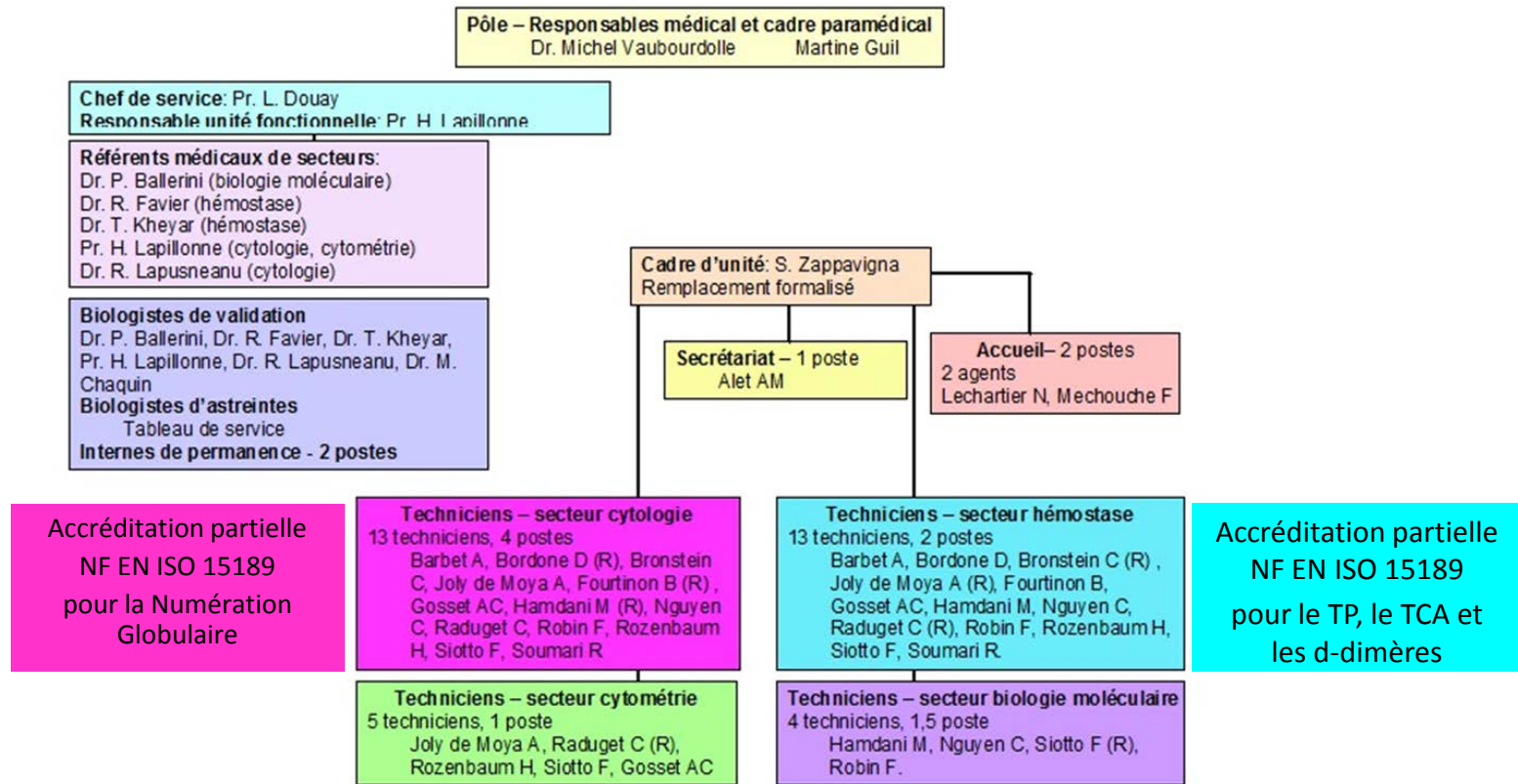
VALIDATION DE METHODE EN PORTEE B : APPLICATION AU DOSAGE DU FIBRINOGENE EN HEMOSTASE

Diplôme Universitaire Assurance Qualité Biologie Médicale –
Paris VI
Année 2014-2015

Hôpital Armand Trousseau - Service Hématologie Biologique

KHEYAR Tassadit – 15/10/2015

Présentation du service d'hématologie



- Activité du laboratoire en 2014 : 5 812 764 de B+BHN dont 1 437 459 dans le secteur d'hémostase
- Effectifs :
 - PM : 7 biologistes
 - PNM : 13 techniciens polyvalents , 1 cadre, 2 agents et 1 secrétaire

Contexte :

Pour 2016, il est planifié 2 portées flexibles en évaluation Cofrac :

HEMOSTASE :
Fibrinogène
Facteurs II et V

CYTOLOGIE :
Formule sanguine

Problématique :

Le dosage du fibrinogène est une méthode quantitative adaptée, le fournisseur du réactif «Siemens» n'a pas validé l'utilisation du réactif sur les automates Stago :

=> démarche en portée flexible de type B

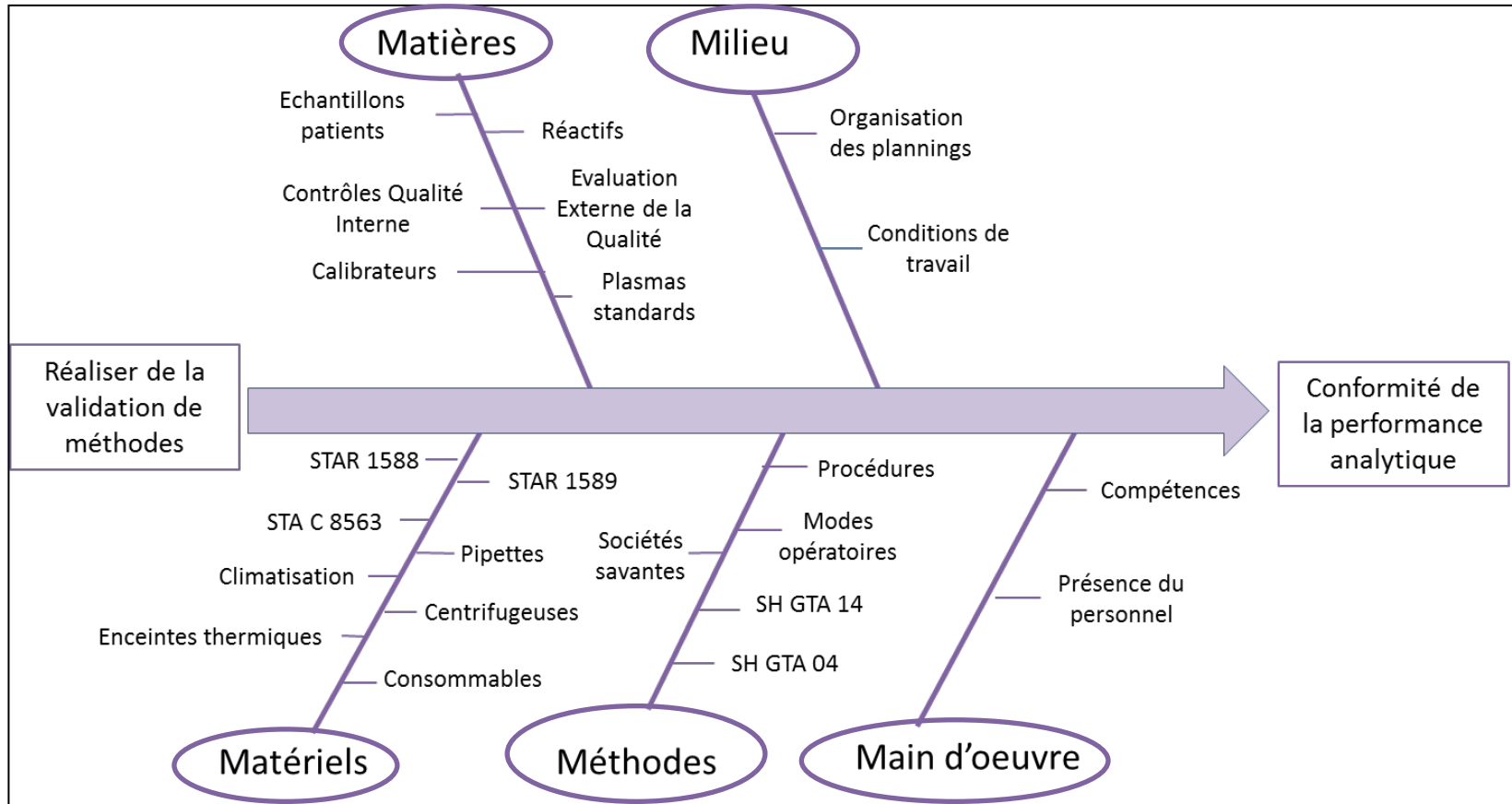
Objectif du projet :

Réaliser la validation de méthode (portée B) pour le dosage du fibrinogène

Les différentes étapes du mémoire

Actions	Calendrier
Recherche de la bibliographie	Mars 2015
Réalisation du mode opératoire de la méthode quantitative en portée B	
Etude de risques du processus analytique	Mai 2015
Réalisation des tests de critères analytiques établis	Avril 2015
Interprétation des résultats	
Elaboration formulaire SH FORM 43	Mai 2015

Analyse des 5M



MAITRISE DES RISQUES				
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matières	Qualité du prélèvement	Faible	Volume, aspect	MO pré-analytique en hémostase
	Réactifs/Contrôles/ Consommables	Moyenne	Stock des réactifs	Gestion des stocks
Milieu	Température	Faible	Spécifications fournisseurs	Respect des températures
Matériel	Centrifugeuses	Moyenne	Programme de centrifugation	Maintenance périodique Vérification métrologique
	Enceintes thermiques Pipettes	Faible	Métrologie	
	Automates	Faible	Réalisation des maintenances	Suivi des maintenances
Méthode	Procédures et modes opératoires	Moyenne	« Décryptage » du procédé analytique portée B	Formalisation des modes opératoires
Main d'œuvre	Compétence du PNM et PM	Faible	Formation du personnel	Habilitation du personnel

Aucun risque majeur n'a été identifié mais

- Surveillance du programme de centrifugation utilisé
- Attention à la disponibilité des réactifs et contrôles
- Formalisation des modes opératoires analytiques

Tableau récapitulatif des critères de performance testés :

	Paramètre à vérifier et/ou à connaître	Validation (portée B)	Bibliographie
1	Répétabilité	OUI	Notice fournisseur Référentiel Ricos 2014 GEHT 2014
2	Fidélité intermédiaire (Reproductibilité intra-laboratoire)	OUI	
3	Exactitude	OUI	GEHT 2014
4	Incertitude/facteurs de variabilité et évaluation	OUI	Absence de bibliographie
5	Comparaison avec une méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareils en miroir, EBMD)	OUI	Guide d'aide à l'accréditation des laboratoires Stago – v1 01/2010
6	Intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité)	OUI	Notice fournisseur
7	Interférences (héparines, d-dimères, lipémie, hémolyse, bilirubine, médicaments...)	OUI	Notice fournisseur
8	Contamination inter échantillons	OUI	Absence
9	Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	OUI	Notice fournisseur
10	Intervalle de référence	OUI	Monagle P. Thromb Hemost, 2006; 95:362-72.

	Critères de performance	Principe	Méthodes de calcul
1	Répétabilité	Analyser un même échantillon dans des conditions identiques dans un délai le plus court possible (même operateur, même lot de réactifs...)	Calcul du Coefficient de variation $CV(\%) = (s/m) \times 100$
2	Fidélité intermédiaire (Reproductibilité intra-laboratoire)	Analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un facteur (opérateur, temps...) sur au moins 15 jours avec 30 déterminations.	Calcul du Coefficient de variation $CV(\%) = (s/m) \times 100$
3	Exactitude	Etablir à partir des résultats des EEQ en comparant la valeur trouvée (x) cible (moyenne de groupe de pairs) assimilée à la valeur vraie (v) de l'échantillon testé.	Inexactitude(%) = $(x-v)/v * 100$
4	Estimation de l'incertitude	La fidélité et la justesse permettent une approche de l'estimation de l' incertitude (u) associée au résultat.	$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$ <p>The diagram illustrates the formula for uncertainty $u(C)$. It is the square root of the sum of two squared terms: $u^2(CIQ)$ and $u^2(EEQ)$. $u^2(CIQ)$ is calculated as $\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2$. $u^2(EEQ)$ is calculated as $\left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \sigma_e^2$.</p>
5	Comparaison entre appareils en miroir	Vérifier un même échantillon sur les automates en miroir et exploiter les résultats (Diagramme de différence de la méthode Bland –Altman)	<ul style="list-style-type: none"> - Calculer les différences $x_i - y_i$ - Calculer les rapports (x_i/y_i) - Le coefficient de corrélation

	Critères de performance	Principe	Méthodes de calcul
6	Intervalle de mesure	<p>Vérifier le domaine de l'intervalle de mesure qui garantit une mesure fiable du résultat entre la limite inférieure de quantification (LIQ) et la limite supérieure de quantification (LSQ) donné par le fournisseur.</p> <p>LIQ : GTA 04 expérience lourde et couteuse, un protocole fournisseur (Stago) est réalisé à partir du plasma lyophilisé standard dilué dans du sérum physiologique de ½ au ½ jusqu'à avoir un résultat supérieur au temps maximum de coagulation (configuration automate du test).</p>	<p>LSQ : Non testé et application de la notice fournisseur (non pertinent cliniquement)</p> <p>LIQ : Dilutions du plasma standard jusqu'à temps max de coagulation égale à 60 secondes</p>
7	Interférences	<p>Etudier l'impact de l'héparine et des d-dimères sur le taux de fibrinogène :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gamme croissante de concentration d'héparine mélangée avec le plasma du patient. - Dilution d'un échantillon à taux élevé de d-dimères et dosage du fibrinogène (avant et après). 	Calcul du Coefficient de variation
8	Contamination inter-échantillon	<p>Un contrôle normal est analysé trois fois consécutivement (H1, H2, H3 de moyenne H) puis un contrôle bas (dilué au 1/3) est passé également trois fois (B1, B2, B3).</p> <p>Les séquences (H1 H2 H3 B1 B2 B3) sont répétées 3 fois afin d'établir la moyenne des B1 (Mb1) et la moyenne des B3 (mB3).</p>	Contamination (%) = $((mB1 - mB3) / ((mH - mB3)) \times 10$
9	Stabilité des réactifs	<p>Le test a été réalisé à différentes heures (H0, H8, H16, H32, H48) correspondant à un temps de consommation d'un flacon égale à 48h dans le laboratoire.</p>	Calcul du Coefficient de variation
10	Intervalle de référence	<p>L'hémostase pédiatrique est un système dynamique, profondément influencé par l'âge gestationnel et post-natal.</p> <p>Chez le nouveau-né, le nourrisson et l'enfant, ce système a son équilibre propre qui protège l'enfant de toute manifestation hémorragique ou thrombotique.</p>	Publication de Monagle P. Thromb Hemost, 2006; 95:362-72.

Résultats (1/2)

Critères de performance	STA-R 1588	STA-R 1589	STA-C 8563	Référentiel	Conclusion																					
Répétabilité	CV CQN=3.17% CV CQP=1.41%	CV CQN=2.45% CV CQP=1.79%	CV CQN=2.04% CV CQP=1.28%	CV < 4,8 % (Notice fournisseur)	Conforme																					
Reproductibilité	CV CQN=5.71% CV CQP=6.18%	CV CQN=4.62% CV CQP= 3.86%	CV CQN=5.9% CV CQP=4.8%	CV repro < 6,5% (GEHT 2014)	Conforme																					
Exactitude	EEQ NV2 Biais= 5.8% EEQ NV3 Biais=9.8%	EEQ NV2 Biais= 1.7% EEQ NV3 Biais=3.5%	EEQ NV2 Biais=5.6% EEQ NV3 Biais=7.9%	Biais NV2 =11,4% Biais NV3 =31,2% (GEHT 2014)	Conforme																					
Incertitude	u(C) CQN =+/-0.38g/l u(C) CQP = +/-0.17g/l	u(C) CQN=+/-0.37g/l u(C) CQP=+/-0.17g/l	u(C) CQN=+/-0.43g/l u(C) CQP=+/-0.15g/l	Absence de bibliographie	Conforme																					
Comparaison avec appareils en miroir	Y= 1.04x + 0.13	Y= 1.04x + 0.13	Y= 1.02x + 0.07	Pente [0,8-1,0] Ordonnée <0,25g/l (GRAAL 2010)	Conforme																					
Intervalle de mesure	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Dilution</th> <th>Concentration mesurée (g/l)</th> <th>Temps coagulation (sec)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pur</td> <td>3</td> <td>16.7</td> </tr> <tr> <td>1/2</td> <td>1.44</td> <td>6.7</td> </tr> <tr> <td>1/4</td> <td>0.75</td> <td>13.3</td> </tr> <tr> <td>1/8</td> <td>0.39</td> <td>26.2</td> </tr> <tr> <td>1/16</td> <td>0.18</td> <td>59.4</td> </tr> <tr> <td>1/32</td> <td>-</td> <td>> temps maximum</td> </tr> </tbody> </table>			Dilution	Concentration mesurée (g/l)	Temps coagulation (sec)	Pur	3	16.7	1/2	1.44	6.7	1/4	0.75	13.3	1/8	0.39	26.2	1/16	0.18	59.4	1/32	-	> temps maximum	Limite inférieur à 0,2 g/l (Notice fournisseur)	Conforme
Dilution	Concentration mesurée (g/l)	Temps coagulation (sec)																								
Pur	3	16.7																								
1/2	1.44	6.7																								
1/4	0.75	13.3																								
1/8	0.39	26.2																								
1/16	0.18	59.4																								
1/32	-	> temps maximum																								

Résultats (2/2)

Critères de performance	STA-R 1588	STA-R 1589	STA-C 8563	Référentiel	Conclusion																		
Interférences Héparine		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentration d'héparine finale (UI/ml)</th> <th>Taux de fibrinogène en g/l plasmatique après mélange</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>2,8</td> </tr> <tr> <td>0.25</td> <td>2,71</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>2,77</td> </tr> <tr> <td>0.75</td> <td>2,77</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>2,79</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration d'héparine finale (UI/ml)	Taux de fibrinogène en g/l plasmatique après mélange	0	2,8	0.25	2,71	0.5	2,77	0.75	2,77	1	2,79	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Moyenne</th> <th>ET</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2,77</td> <td>0,03</td> <td>1,26</td> </tr> </tbody> </table>	Moyenne	ET	CV	2,77	0,03	1,26	Interférence à un taux AXA >0,6UI/ml (Notice fournisseur)	Absence d'interférence
Concentration d'héparine finale (UI/ml)	Taux de fibrinogène en g/l plasmatique après mélange																						
0	2,8																						
0.25	2,71																						
0.5	2,77																						
0.75	2,77																						
1	2,79																						
Moyenne	ET	CV																					
2,77	0,03	1,26																					
Interférences D-dimères	/			Notice fournisseur	En cours																		
Contamination inter échantillons	0.49%	0.49	-0.88	Absence de bibliographie	Conforme																		
Stabilité réactifs (48h)		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>M</th> <th>ET</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pool Normal (g/l)</td> <td>2,83</td> <td>0,03</td> <td>1,16</td> </tr> <tr> <td>CN (g/l)</td> <td>2,87</td> <td>0,08</td> <td>2,62</td> </tr> <tr> <td>CP (g/l)</td> <td>1,24</td> <td>0,06</td> <td>5,16</td> </tr> </tbody> </table>		M	ET	CV	Pool Normal (g/l)	2,83	0,03	1,16	CN (g/l)	2,87	0,08	2,62	CP (g/l)	1,24	0,06	5,16		CV reproductibilité < 6,5% (GEHT 2014)	Conforme		
	M	ET	CV																				
Pool Normal (g/l)	2,83	0,03	1,16																				
CN (g/l)	2,87	0,08	2,62																				
CP (g/l)	1,24	0,06	5,16																				
Intervalle de référence	/			Monagle P. Thromb Hemost, 2006; 95:362-72.	Conforme																		

➤ Point sur les atteintes des objectifs :

- Les tests sélectionnés pour la validation du fibrinogène ont été effectués à 90%.
- L'analyse des risques a été réalisée en collaboration avec la technicienne référente qualité.
- Le formulaire SH 43 version 2012 est rempli à 90%.
- Formalisation d'un mode opératoire pour la réalisation de la validation d'une portée B (à valider dans le GH).

➤ Difficultés rencontrées :

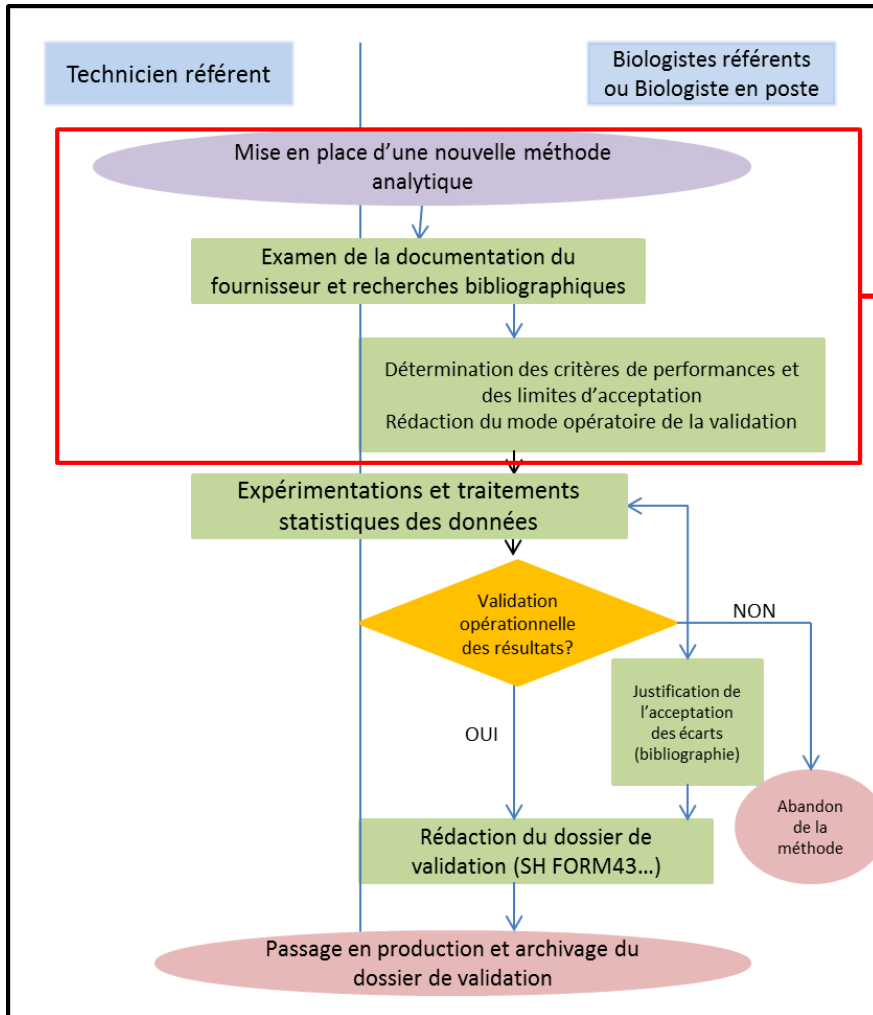
- Pauvreté des sources bibliographiques.
- Planning a été difficile à respecter (manque de personnel, arrêt maladie, vacances...).
- Sous estimation du travail car c'est le 1^{er} examen en portée B réalisé au sein du laboratoire.

➤ Le travail est à poursuivre pour le passage des auditeurs COFRAC (3^e trimestre 2016)

➤ Pour les futurs examens en portée B du laboratoire :

- Mettre en place un groupe de travail (identifier et définir le travail à réaliser, les acteurs (outil QQQQCP), état des lieux, bibliographie, application du PDCA...).
- Bien prendre en compte l'analyse des risques étudiée.
- Impliquer tout le personnel du laboratoire avant de lancer les tests (technicien, cadre, RAQ et les biologistes...).

Processus du travail de validation des méthodes



ETAPE LA PLUS IMPORTANTE (Prendre du temps)

- Formaliser QQQCP
- Définir les rôles des acteurs
- Identifier les moyens nécessaires (humain, matériels, financiers)
- Identification des risques au projet

Projet bien construit, réfléchi et bien mené permet d'être efficient et atteindre ses objectifs

Ouverture à la discussion

- **Marché réactif AGEPS = performance d'achat dans les choix de réactif (rapport qualité/prix)**
 - ✓ Quels sont les critères « qualité »? Tient-il compte de l'ISO15189?
 - ✓ Coût de la validation en portée B est connu pour être élevé. Est-il pertinent de réaliser une validation en portée B pour le fibrinogène (examen de routine)?

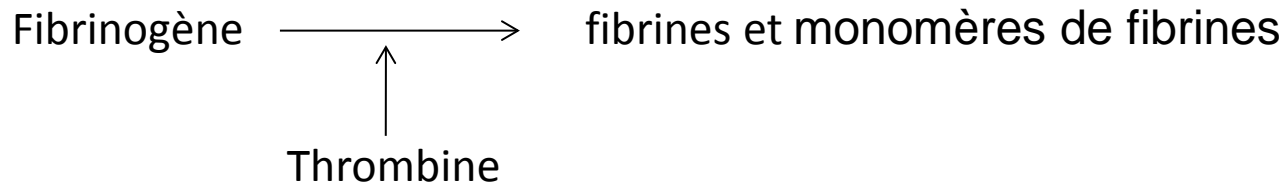
- **Changement nécessaire à l'AGEPS : Intégrer le coût de fonctionnement (RH avec PNM et PM, achat des réactifs et consommables...)**

	Paramètre à vérifier et/ou à connaître	Validation (portée B)	Vérification (portée A)
1	Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	OUI	OUI
2	Justesse	OUI	OUI
3	Incertitude/facteurs de variabilité et évaluation	OUI	OUI
4	Comparaison avec une méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareils en miroir, EBMD)	OUI	OUI
5	Intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité)	OUI	NON (bibliographie suffit)
6	Interférences (lipémie, hémolyse, bilirubine, médicaments)	OUI	NON (bibliographie suffit)
7	Contamination inter échantillons	OUI	NON (bibliographie suffit)
8	Robustesse	OUI	NON (bibliographie suffit)
9	Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	OUI	NON (bibliographie suffit)
10	Intervalle de référence	OUI	NON (bibliographie suffit)



Principe du dosage du fibrinogène

- Principe de la réaction de référence Clauss utilisée au laboratoire
- Dosage réalisé sur automate Stago avec le réactif Dade Thrombine Siemens de marquage CE = méthode adaptée
- Dosage quantitatif en chromométrie du fibrinogène fonctionnel exprimé en G/L



Indication :

- CIVD
- Syndrome inflammatoire
- Dys- fibrinogénémie (Hémorragie , thrombose)

Etude de coût pour une validation en portée B

	COUT	
	Portée A	Portée B
Qualité		
Matériels		Surconsommation de réactifs et consommables
Informatique		Plus de fichier de stockage
Métrologique		
RH	Temps de validation de la méthode rapide	Monopolise du temps technicien, biologistes, RAQ, cadres
Remarques		A refaire quand Changement de version de la notice majeur Change automate, Change marché