

Université Pierre et Marie Curie -
Sorbonne Universités

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

**VALIDATION/VERIFICATION DE DEUX METHODES DE
BIOLOGIE MOLECULAIRE SELON LA NORME ISO 15189**

Joly Isabelle
Année 2015 / 2016

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

JOLY Isabelle

Technicienne de laboratoire médical

Service de Parasitologie et Mycologie

Pôle de biologie médicale et pathologie

Groupe Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière Charles Foix

Remerciements

Merci à l'ensemble des intervenants de ce DU pour avoir partagé votre expérience à travers vos enseignements.

Remerciement au comité de formation du groupe hospitalier de m'avoir permis de suivre ce DU d'assurance qualité en acceptant ma candidature et en finançant cette formation.

Tous mes remerciements à l'ensemble de l'encadrement du pôle pour son soutien à ma candidature.

Merci à Mme Grégoire Nadia , cadre du service de Parasitologie Mycologie qui a fait tout son possible pour me dégager du temps afin de réaliser ce projet.

Toute ma gratitude à Mme Touafek Feriel biologiste responsable du secteur de biologie moléculaire et référent qualité du service pour sa disponibilité, sa patience, sa confiance et ses précieux conseils.

Merci à l'ensemble du personnel du service et plus particulièrement à mes collègues techniciens du secteur de biologie moléculaire Barbara, Sylvie , Clothilde, Géraldine et Christophe pour leur contribution directe ou indirecte à ce projet et cela toujours dans la bonne humeur.

Merci à mes enfants Laura et Gaëtan pour leur patience, leur compréhension et leur soutien indéfectible en toute circonstance.

Merci à Emilie Lafeuille pour nos échanges et son soutien pendant ce DU

Sommaire

I. INTRODUCTION	1
A. Le Groupe Hospitalier-Universitaire Pitié Salpêtrière Charles Foix (GHU PSL-CFX).....	1
B. Le pôle de Biologie Médicale et Pathologie	2
C. La démarche qualité au sein du pôle de Biologie Médicale et Pathologie	3
D. Le service de Parasitologie et Mycologie	4
E. Objectifs.....	5
F. Etapes du projet.....	5
II. VERIFICATION /VALIDATION DE METHODES	6
A. Choix des méthodes à vérifier/valider	6
B. Choix du processus et de la portée	7
C. Maitrise des risques.....	7
D. Revue des documents.....	7
E. Vérification du sous processus « Extraction ».....	9
1. Présentation des méthodes d'extractions	9
2. Les paramètres à tester.....	11
3. La répétabilité et le test de contamination inter échantillon de l'extraction de l'ADN Albumine.....	11
F. Validation du sous processus « Amplification »	14
1. Présentation de la méthode d'amplification.....	14
2. Les paramètres à tester.....	15
3. Répétabilité, contamination inter échantillons et spécificité	15
4. Fidélité intermédiaire et variation inter opérateurs	18
5. Robustesse.....	18
6. Conservation et stabilité des réactifs.....	20
7. Sensibilité	21
8. Exactitude	21
9. Interférences.....	21
10. Comparaison de méthodes	22
G. Résultats et interprétation des performances des méthodes d'extraction et de PCR.....	24
III. CONCLUSION.....	34
Bibliographie.....	35
Annexes.....	36
Résumé	61

Glossaire

Abréviations

ADN = Acide désoxyribo Nucleique

PCR = Polymérase Chain Réaction ou Réaction d'Amplification en Chaîne

Eau ppi = Eau pour préparation injectable

CT = Cycle of Threshold

CE = Certification Européenne

GH = Groupe Hospitalier

Définitions

Méthode reconnue : Méthode utilisant des DM-DIV marqué CE ou publiée dans des livres faisant autorité, des journaux avec comité de lecture, des normes, des instructions de consensus international ou des réglementations. Elle est classée en portée A.

Méthode non reconnue : Méthode développée par le laboratoire. Elle est classée en portée B.

Méthode qualitative : méthode dont les résultats sont issus de données non numériques.

Méthode quantitative : méthode dont les résultats sont issus de données numériques.

CT : intersection entre le signal de fluorescence d'une sonde et le seuil pré défini

Oligonucléotide: petit segment d'ADN (quelques dizaines de nucléotides) simple brin servant soit d'amorce soit de sonde lorsqu'il est marqué, ayant la capacité de s'hybrider spécifiquement à une séquence complémentaire connue.

I. INTRODUCTION

A. Le Groupe Hospitalier-Universitaire Pitié Salpêtrière Charles Foix (GHU PSL-CFX)

Il comprend deux centres hospitaliers, l'hôpital de la Pitié –Salpêtrière situé dans le 13^{ème} arrondissement de Paris et l'Hôpital Charles Foix situé à Ivry sur Seine.

Il est l'un des 12 groupes hospitaliers qui composent l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP).

Sa capacité d'accueil est de 2189 lits, il est le premier groupe hospitalier de France.

Le GH compte 11 pôles cliniques et médico techniques :

- Pôle de chirurgie, comprenant les activités de néphrologie, urologie, gynécologie-obstétrique, néonatalogie, chirurgie gynécologique, orthopédie, chirurgie générale, chirurgie digestive, chirurgie vasculaire, stomatologie et chirurgie maxillo-faciale, odontologie ;
- Pôle PRAGUES comprenant les activités de pneumologie, réanimations, anesthésie, gériatrie, urgences et explorations fonctionnelles respiratoires et explorations du sommeil ;
- Pôle Maladies du Système Nerveux (MSN) comprenant les activités de neurologie, réanimation neurologique, psychiatrie adulte et enfant, soins de suite et réadaptation, soins de longue durée, explorations fonctionnelles neurologiques ;
- Pôle de chirurgie neurosensorielle (CNS) comprenant les activités d'ORL, Ophtalmologie et de neurochirurgie ;
- Pôle coeur-métabolisme comprenant les activités d'endocrinologie, nutrition, cardiologie, chirurgie cardiaque et explorations ;
- Pôle de Biologie Médicale et Pathologie comprenant, outre les activités d'analyse médicale, des activités de consultation hématologique et génétique clinique ;
- Pôle d'infection, Immunité, inflammation (3I) comprenant les activités de rhumatologie, médecine infectieuse et tropicale, hépato gastro-entérologie, médecine interne.

- Pôle d'imagerie comprenant, outre les activités de radiologie diagnostiques et interventionnelles, un service de médecine nucléaire ;
- Pôle de Santé Publique, Evaluation et Produits de Santé (SPEPS) regroupant les deux PUI ;
- Pôle d'oncologie, hématologie, radiothérapie et soins palliatifs (ORPHE) ;
- Pôle de gériatrie du site de Charles Foix comprenant les activités de court séjour, moyen et long séjour de gériatrie.

B. Le pôle de Biologie Médicale et Pathologie

Il a été créé en 2011, il est composé de 12 secteurs d'activités (services) : répartis dans différents bâtiments de l'hôpital Salpêtrière et sur le site de Charles Foix. (Cf le plan en annexe 1)

Ces secteurs d'activités sont :

- Le service de Coprologie fonctionnelle
- Le service biochimie métabolique
- Le service biochimie endocrinienne et oncologique
- Le service d'anatomie et cytologie
- Le service biothérapie
- Le département de génétique
- Le service hématologie biologique
- Le département d'immunologie
- Le service de parasitologie et mycologie
- Le service de virologie
- Le service de bactériologie et hygiène hospitalière
- Le centre de tri des examens

Chaque secteur est sous la responsabilité d'un chef de service et d'un cadre paramédical de santé eux même sous la responsabilité du chef de pôle et du cadre de pôle (Cf l'organigramme du pôle en annexe 2)

En 2014, le pôle a réalisé 6 876 356 actes

C. La démarche qualité au sein du pôle de Biologie Médicale et Pathologie

Afin de satisfaire aux exigences de la norme ISO 15189 le pôle a mis en place un logiciel qualité kalilab qui permet de faciliter la gestion documentaire, la gestion du matériel (criticité et suivi des maintenances) et une organisation portée par :

- la cellule de management de la qualité du pôle composée du chef de pôle et de son adjoint, du cadre paramédical de pôle, de 2 responsables qualité du pôle (principal et adjoint) et du directeur qualité du GH
- la cellule qualité opérationnelle du pôle composée de 2 responsables qualité du pôle (qui sont les pilotes) et des référents qualité de service (1 référent qualité médical et 1 référent qualité non médical) cf organigramme qualité du pôle en annexe 3

Le pôle a défini une politique qualité dont les objectifs prioritaires sont les suivants :

- Répondre aux besoins des patients et des prescripteurs.
- Identifier régulièrement les besoins des prescripteurs, notamment pour prendre en compte les innovations.
- Réaliser des examens de biologie médicale de qualité en adéquation avec les besoins cliniques au bénéfice des patients.
- Piloter un système de management de la qualité commun à l'ensemble des structures internes du pôle.
- Rendre accessibles les résultats des examens selon les normes en vigueur sur serveur informatique consultable par les prescripteurs des hôpitaux Pitié Salpêtrière – Charles Foix et sur papier.
- Assurer des prestations de conseils à la demande des cliniciens ou lors de la transmission des résultats ou au cours de staffs des services cliniques.
- Déployer la démarche d'accréditation sur l'ensemble des examens de Biologie Médicale selon les modalités définies dans la loi du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale

À ce jour, 39% des examens sont accrédités sur le pôle dans les 3 familles : Biochimie- Génétique, Immunologie- Hématologie et Microbiologie

D. Le service de Parasitologie et Mycologie

Le service est situé dans le pavillon Laveran, il est réparti sur 3 étages et organisé en plusieurs secteurs.

Chaque secteur est sous la responsabilité d'un ou de plusieurs biologistes et les techniciens affectés sont en majorité impliqués dans 2 à 3 secteurs (cf l'organigramme du service en annexe 4)

Le 4ème étage héberge la réception des prélèvements et la majorité de l'activité de routine du service :

- Le secteur pré analytique : c'est la réception du service
- Le secteur TO : où sont réalisées les sérologies toxoplasmose
- Le secteur AB : où sont réalisées les sérologies tréponèmes pour le service des maladies infectieuses, amibiase et bilharziose
- Le secteur HE : où sont réalisées les sérologies helminthiases
- Le secteur PA : où sont réalisées les sérologies paludisme, leishmaniose, trypanosomose africaine et américaine.
- Le secteur IM : où sont réalisées les sérologies aspergillose, candidose, histoplasmosse, maladies des éleveurs d'oiseaux et du poumon de fermier.
- Le secteur DI : où sont réalisées les recherches directes de parasites, ex : le diagnostic du paludisme par Frottis Goutte Epaisse (FGE) et les Examens Parasitologiques des Selles (EPS).
- Le secteur MY : où sont réalisées les recherches directes de champignons par des techniques conventionnelles et par protéomique ainsi que le séquençage.

Le 5ème étage héberge le secteur transversal BM (Biologie Moléculaire) où sont réalisées toutes les recherches d'ADN parasitaires et fongiques du service.

Le 1^{er} étage héberge le CNR du Paludisme.

L'activité du service pour l'année 2015 est de 75118 actes dont 7518 pour le secteur de biologie moléculaires (9%) correspondant à 7 973 595 (B + BHN).

Le service est accrédité depuis le 1^{er} novembre 2015 pour :

- La sérologie toxoplasmose IgG et IgM pour les techniques suivantes :
test immuno enzymatique Elisa(ETIMAX), agglutination direct haute sensibilité,
immuno fluorescence indirecte.
- La recherche de Plasmodium sur frottis mince et goutte épaisse.

E. Objectifs

Objectif 1 :

Constitution de deux dossiers de vérification/validation de méthode de PCR

Objectif 2 :

Rédaction d'un document d'aide à la vérification /validation de méthode en biologie moléculaire

F. Etapes du projet

- Choix des méthodes à vérifier /valider
- Choix du type de processus et de la portée
- Maitrise des risques pour les deux méthodes
- Revue des documents associés.
- Détermination des paramètres à tester
- Rédaction du protocole d'essai sur site
- Collecte et analyse des résultats
- Rédaction du SH FORM 43
- Rédaction d'un projet de document d'aide à la validation de méthode en biologie moléculaire

II. VERIFICATION /VALIDATION DE METHODES

A. Choix des méthodes à vérifier/valider

Différentes PCR en temps réel sont réalisées dans le secteur de biologie moléculaire (BM), elles sont soit qualitatives soit quantitatives et permettent de détecter de l'ADN parasitaire et fongique.

L'étape préalable de l'extraction de l'ADN est réalisée soit avec des méthodes manuelles soit avec une méthode automatisée.

Afin de satisfaire au quota de 50% du nombre d'actes accrédités en 2017 dans le pôle, nous avons sélectionné les 2 PCR les plus réalisées dans le secteur, ce qui permet de valider/vérifier 2 méthodes d'extractions différentes (1 méthode manuelle et 1 méthode automatique), 2 types de méthodes de PCR (1 PCR quantitative et 1 PCR qualitative) et 2 types de cibles (1 ADN parasitaire et 1 ADN fongique).

Ce choix permet d'aborder des aspects et des problématiques variés englobant la majorité des méthodes réalisées dans le secteur.

Les 2 méthodes choisies, qui correspondent chacune à une ligne de portée dans une famille, sont :

- La détection de l'ADN de *Toxoplasma gondii* dans les liquides biologiques qui comprend 2 étapes : une extraction de l'ADN parasitaire par une méthode manuelle suivie d'une amplification par une PCR en temps réel de type qualitative.
- La détection d'ADN d'*Aspergillus fumigatus* dans le sérum qui comprend 2 étapes : une extraction de l'ADN fongique par une méthode automatisée suivie d'une amplification par une PCR en temps réel de type quantitative.

B. Choix du processus et de la portée

Compte tenu de l'impact de l'étape d'extraction de l'ADN sur le résultat final, il est important de l'évaluer en tant que méthode à part entière et non comme un simple prétraitement.

C'est pour cette raison que la vérification/validation de chacune des deux méthodes choisies se fera selon un processus complexe comprenant deux sous processus :

- **Un 1^{er} sous processus « Extraction »** en portée A car les réactifs utilisés sont des DM-DIV commercialisés ayant le marquage CE.
- **Un 2^{ème} sous processus « Amplification »** en portée B car la méthode utilisée est « maison » ayant déjà fait l'objet de nombreux articles mais dont certains aspects n'ont pas été testés.

C. Maitrise des risques

La maitrise des risques des 2 sous processus a été réalisée selon la méthode des 5M sous forme du diagramme d'Ishikawa (cf. exemple en annexe 5) qui permet l'identification des points potentiellement critiques, de définir les éléments à maitriser et les moyens de maitrise concernant :

- Le **Milieu** : environnement
- La **Matière** : échantillons
- La **Main d'œuvre** : personnel
- La **Méthode** : la technique
- Le **Matériel** : réactifs, calibrant, contrôles, automates, équipements

D. Revue des documents

L'état des lieux documentaire dans le secteur de biologie moléculaire a mis en évidence un manque important de traçabilité et d'enregistrement ainsi qu'un manque de formalisation et de mise à jour de procédures, de modes opératoires et d'instructions de travail.

Ce constat a permis la rédaction des documents nécessaires ainsi que la mise en place d'une traçabilité indispensable à la validation de méthode.

- Les modes opératoires rédigés ou mis à jour concernent :
 - L'extraction de l'ADN par l'automate MagnaPur Compact.
 - L'extraction de l'ADN à l'aide du kit Qiagen « QIAamp DNA Blood mini »
 - Les maintenances du MagnaPur Compact
 - Les maintenances du 7500 Fast System Real Time
 - L'entretien des centrifugeuses, des PSM, de l'incubateur à sec

- Les instructions de travail rédigées ou mises à jour concernent :
 - Respect des consignes de manipulation en biologie moléculaire.
 - Contrôle de la contamination des paillasse.

- Les traçabilités mises en place concernent :
 - Les maintenances du MagnaPur Compact sous forme d'un formulaire papier à la paillasse
 - Les maintenances du 7500 Fast System Real Time dans Kalilab
 - Les extractions sous forme d'un formulaire papier à la paillasse
 - La réception, reconstitution et dilution des amorces et des sondes sous forme d'un formulaire papier à la paillasse
 - Le contrôle de la contamination des paillasse sous forme d'un formulaire papier à la paillasse
 - La fabrication des CIQ
 - La fabrication des gammes
 - L'entretien hebdomadaire des centrifugeuses, des PSM et de l'incubateur à sec

E. Vérification du sous processus « Extraction »

1. Présentation des méthodes d'extractions

Méthode 1 : Extraction automatisée sur le MagnaPur de Roche.

Principe :

Cette méthode est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide (billes/particules magnétiques) qui ont été recouvertes d'un anticorps liant l'ADN ou d'un groupe fonctionnel qui interagit spécifiquement avec l'ADN.

Après une lyse cellulaire et une digestion enzymatique l'ADN se lie à la surface des billes magnétiques. Sous l'action d'un champ magnétique le complexe ADN- billes magnétiques est séparé des autres composants cellulaires contaminants, lavé et finalement l'ADN purifié est élué (figure 1)

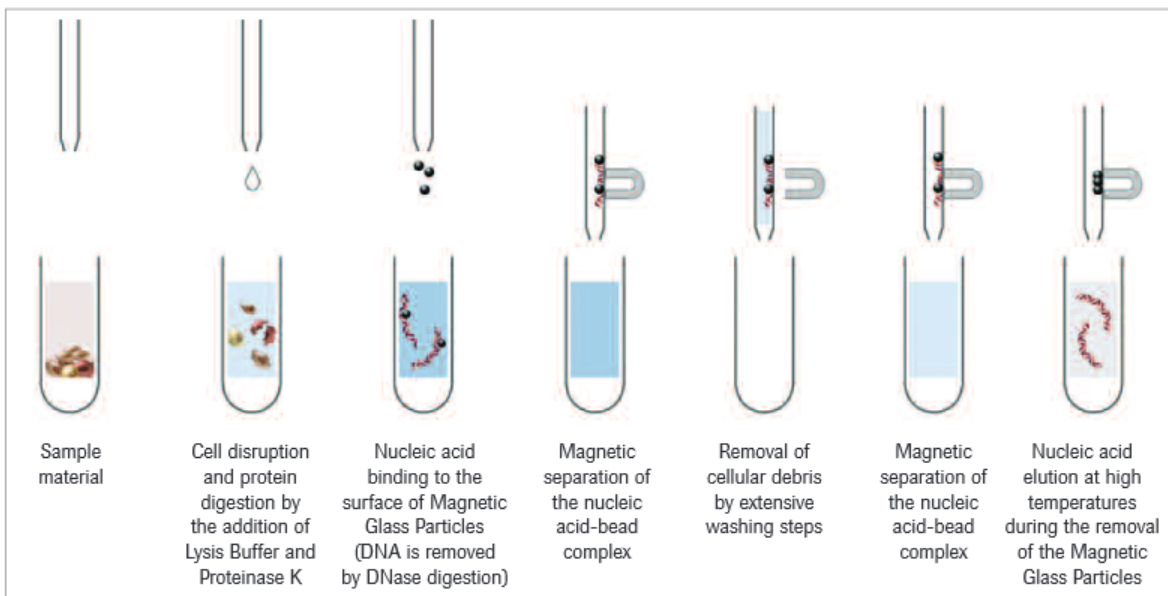


figure 1 : Représentation schématique du principe de l'extraction par MagnaPur compact

Méthode 2 : Extraction manuelle par le kit QIAamp DNA Blood mini (Qiagen)

Principe

Après une lyse cellulaire et une digestion enzymatique l'ADN se fixe sur la membrane de silice contenue dans la colonne, les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. L'ADN est finalement élué dans un tampon d'éluion (figure 2).

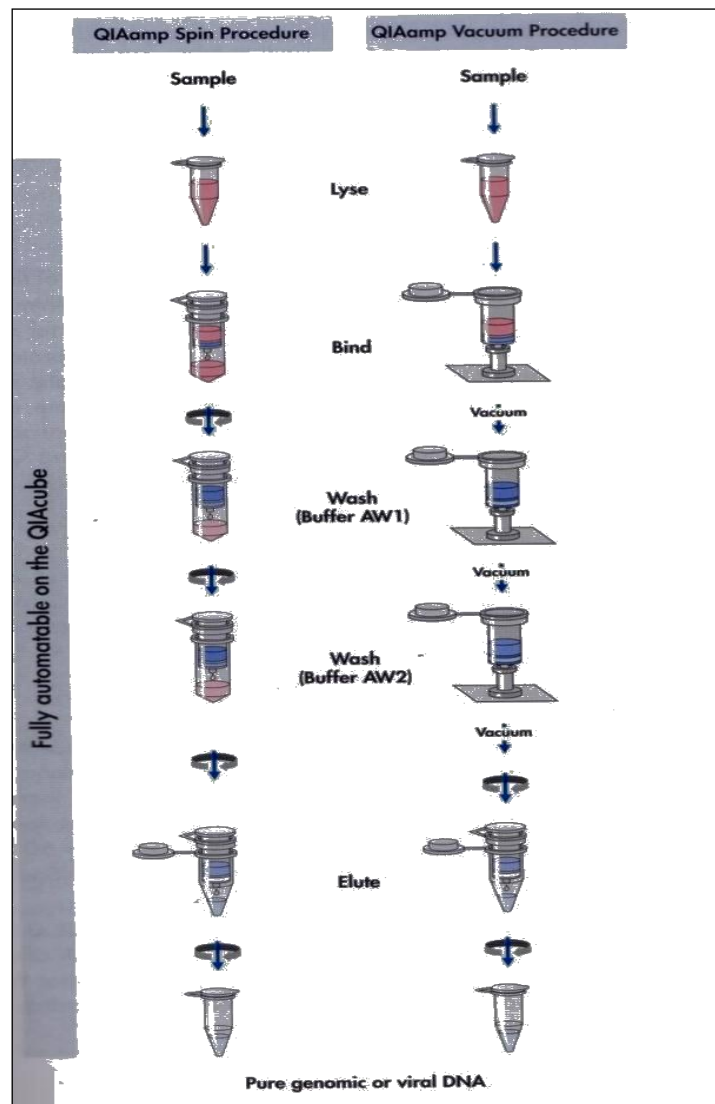


figure 2 Représentation schématisée de l'extraction Qiagen mini

2. Les paramètres à tester

Les 2 méthodes d'extractions sont reconnues et classées en portée A, la vérification sur site comprend l'étude des paramètres à tester suivants :

- ✓ La répétabilité,
- ✓ la contamination inter échantillons
- ✓ la fidélité intermédiaire

L'ensemble des vérifications réalisées utilisent l'ADN Albumine humaine présente dans les échantillons testés. Le choix d'utiliser de l'ADN humain plutôt que parasite ou fongique est lié à la quantité importante d'échantillon positif nécessaire à ces vérifications. De plus, dans notre pratique quotidienne, l'ADN albumine est utilisé comme témoin d'extraction.

3. La répétabilité et le test de contamination inter échantillon de l'extraction de l'ADN Albumine

a. Extraction automatisée de l'ADN Albumine par le MagnaPur

1 La répétabilité

Ce test a été réalisé en déposant 1 ml de sérum d'un même échantillon dans les 8 tubes d'une même série dont le run est lancé par le même opérateur et dans les mêmes conditions.

Les 8 extraits obtenus ont été identifiés comme suit : FMR1 ; FMR2 ; FMR3 ; FMR4 ; FMR5 ; FMR6 ; FMR7 ; FMR8

2 Le test de contamination inter échantillons

Ce test a été réalisé en déposant 4 fois 1 ml d'un échantillon positif en Albumine et 1 ml d'eau (sans albumine) en alternance dans une même série.

Les extraits obtenus ont été identifiés comme suit :

FMR9 FMR10 FMR11 FMR12 pour les extraits correspondant au sérum

EM1 EM2 EM3 EM4 EM5 pour les extraits correspondant à l'eau.

L'amplification des extraits obtenus est réalisée en triplicate par PCR albumine selon le plan de dépôt suivant :

Répétabilité extraction

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FMR1	FMR2	FMR3	FMR4	FMR5	FMR6	FMR7	FMR8		Tmix	Tmix	Tmix
B	FMR1	FMR2	FMR3	FMR4	FMR5	FMR6	FMR7	FMR8				
C	FMR1	FMR2	FMR3	FMR4	FMR5	FMR6	FMR7	FMR8				
D												
E												
F	FMR9	FMR10	FMR11	FMR12					EM1	EM2	EM3	EM4
G	FMR9	FMR10	FMR11	FMR12					EM1	EM2	EM3	EM4
H	FMR9	FMR10	FMR11	FMR12					EM1	EM2	EM3	EM4

Test contamination inter échantillons extraction

Afin de ne pas compromettre l'interprétation des résultats de la contamination inter échantillons de l'extraction, les extraits d'ADN albumine et les extraits d'eau ont été déposés à chaque extrémité de la plaque de PCR pour éviter les contaminations au moment du dépôt. Un témoin du mélange réactionnel (Mix) a été réalisé.

b. Extraction manuelle de l'ADN Albumine par QIAamp blood mini kit

1 La répétabilité et Le test de contamination inter échantillons

Ces 2 tests ont été réalisés simultanément sur une série de 20 extractions :

- 10 extractions à partir de sang prélevé sur EDTA correspondant aux échantillons positifs. Les extraits obtenus ont été identifiés comme suit : FQR1 ; FQR2 ; FQR3 ; FQR4 ; FQR5 ; FQR6 ; FQR7 ; FQR8 ; FQR9 ; FQR10
- 10 extractions à partir d'eau pour préparation injectable (ppi) correspondant aux échantillons négatifs. Les extraits obtenus ont été identifiés comme suit : EQ1 ; EQ2 ; EQ3 ; EQ4 ; EQ5 ; EQ6 ; EQ7 ; EQ8 ; EQ9 ; EQ10

L'amplification des extraits obtenus est réalisée en triplicate par PCR albumine selon le plan de dépôt suivant :

Répétabilité + contamination inter échantillons

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FQR1	FQR2	FQR3	FQR4	FQR5	FQR6	FQR7	FQR8	FQR9	FQR10		
B	FQR1	FQR2	FQR3	FQR4	FQR5	FQR6	FQR7	FQR8	FQR9	FQR10		
C	FQR1	FQR2	FQR3	FQR4	FQR5	FQR6	FQR7	FQR8	FQR9	FQR10		
D												
E												
F	EQ1	EQ2	EQ3	EQ4	EQ5	EQ6	EQ7	EQ8	EQ9	EQ10		Tmix
G	EQ1	EQ2	EQ3	EQ4	EQ5	EQ6	EQ7	EQ8	EQ9	EQ10		Tmix
H	EQ1	EQ2	EQ3	EQ4	EQ5	EQ6	EQ7	EQ8	EQ9	EQ10		Tmix

Comme pour la répétabilité de l'extraction automatique, nous avons éloigné les dépôts des extraits issus de sang prélevé sur EDTA et des extraits issus de l'eau ppi pour ne pas compromettre l'interprétation des résultats de la contamination inter échantillon de l'extraction. Un témoin du mélange réactionnel (Mix) a été réalisé.

2 Fidélité intermédiaire et variation inter opérateur de l'extraction de l'ADN albumine

a.Extraction automatisée de l'ADN Albumine par le MagnaPur

Nous avons réalisé 10 extractions de 1 ml d'un même sérum (sérum préalablement aliquoté et conservé à -20°C) à des jours différents par des opérateurs différents.

Les extraits obtenus ont été identifiés comme suit : FMR13 ; FMR14 ; FMR15 ; FMR16 ; FMR17 ; FMR18 ; FMR19 ; FMR20 ; FMR21 ; FMR22 ; FMR23 ; FMR24

Les extraits ont été amplifiés par une PCR albumine.

b.Extraction manuelle de l'ADN Albumine par QIAamp blood mini kit (Qiagen)

Nous avons réalisé 30 extractions d'un même échantillon de sang prélevé sur EDTA (préalablement aliquoté et conservé à -20°C) à des jours différents par des opérateurs différents.

Les extraits obtenus ont été identifiés comme suit : FQR11 ; FQR12 ; FQR13 ; FQR14 ; FQR15 ; FQR16 ; FQR17 ; FQR18 ; FQR19 ; FQR20 ; FQR21 ; FQR22 ; FQR23 ; FQR24 ; FQR25 ; FQR26 ; FQR27 ; FQR28 ; FQR29 ; FQR30 ; FQR31 ; FQR32 ; FQR33 ; FQR34 ; FQR35 ; FQR36 ; FQR37 ; FQR38 ; FQR39 ; FQR40

Les extraits ont été amplifiés par une PCR albumine .

F. Validation du sous processus « Amplification »

1. Présentation de la méthode d'amplification

Il s'agit d'une méthode non reconnue (portée B) d'amplification par PCR en temps réel utilisant des sondes taqman sur l'automate 7500 Fast System Real Time (Applied).

Principe

La PCR en temps réel dérive de la PCR classique, réaction enzymatique utilisant une ADN polymérase (non dénaturée à la chaleur), elle permet de mesurer en continu le produit d'amplification grâce à un marqueur fluorescent. L'amplification évolue en deux phases, une phase exponentielle et une phase plateau. Durant la phase exponentielle, la quantité de produit mesuré est directement proportionnelle à la quantité de produit initial.

Utilisation des sonde Taq Man.

Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), par exemple FAM, et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, par exemple TAMRA, qui inhibe l'émission du reporter 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. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce (cf annexe 6).

2. Les paramètres à tester

- ✓ La répétabilité
- ✓ La contamination inter échantillons
- ✓ spécificité
- ✓ La fidélité intermédiaire
- ✓ La variabilité inter opérateurs
- ✓ La robustesse
- ✓ La sensibilité
- ✓ L'exactitude
- ✓ Les interférences
- ✓ La comparaison de méthodes

3. Répétabilité, contamination inter échantillons et spécificité

Du fait de la rareté des échantillons positifs et du coût des réactifs, la répétabilité pour chaque extrait est évaluée sur 6 valeurs.

a) PCR *Aspergillus fumigatus*

Les extraits sélectionnés pour la répétabilité et la contamination inter échantillons

- sont :
- Extrait **E1** positif niveau moyen
 - Extrait **E2** positif niveau bas
 - Extrait **E3** négatif

Les extraits sélectionnés pour la spécificité sont :

- Extrait PALU (positif en PCR Paludisme)
- Extrait PJ (positif en PCR Pneumocystis)
- Extrait TO (positif en PCR Toxoplasmosse)
- Extrait Amibe (positif en PCR Amibe)
- Extrait LEISH (positif en PCR Leishmanie)
- Extrait Cruzei (positif en PCR Chagas)

La contamination inter échantillons est testée en alternant les extraits E1, E2 et E3 selon le plan de dépôt ci-dessous.

L'amplification, des extraits, de la gamme et du contrôle du mélange réactionnel (tmix) est réalisée par PCR *Aspergillus fumigatus* selon le plan de dépôt suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E2	E3			PALU	PALU					
B	E2	E3	E1			PJ	PJ					
C	E3	E1	E2			TO	TO					
D	E1	E2	E3			AMIBES	AMIBES				Pt11	Pt11
E	E2	E3	E1			LEISH	LEISH				Pt10	Pt10
F	E3	E1	E2			CRUZI	CRUZI				Pt9	Pt9
G											Pt8	Pt8
H								tmix	tmix	tmix	Pt7	Pt7
Répétabilité et Contamination inter échantillons						Spécificité		Témoin de contamination			Gamme	

b) *PCR Toxoplasma gondii*

Les extraits sélectionnés pour la répétabilité et la contamination inter échantillons sont :

Extrait **E1** positif niveau moyen

Extrait **E2** positif niveau bas

Extrait **E3** négatif

Les extraits sélectionnés pour la spécificité sont :

Extrait PALU (positif en PCR Paludisme)

Extrait PJ (positif en PCR Pneumocystis)

Extrait TO (positif en PCR Toxoplasmose)

Extrait Amibe (positif en PCR Amibe)

Extrait LEISH (positif en PCR Leishmanie)

Extrait Cruzei (positif en PCR Chagas)

La contamination inter échantillons est testée en alternant les extraits E1, E2 et E3 selon le plan de dépôt ci-dessous.

L'amplification, des extraits, de la gamme et du contrôle du mélange réactionnel (t mix) est réalisée par PCR *Toxoplasma gondii* selon le plan de dépôt suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E2	E3			PALU	PALU					
B	E2	E3	E1			PJ	PJ					
C	E3	E1	E2			AFU	AFU					
D	E1	E2	E3			AMIBES	AMIBES					
E	E2	E3	E1			LEISH	LEISH					
F	E3	E1	E2			CRUZI	CRUZI					
G												
H										Tmix	Tmix	tmix
Répétabilité et Contamination inter échantillons						Spécificité		Témoin de contamination				

4. Fidélité intermédiaire et variation inter opérateurs

a) PCR *Aspergillus fumigatus*

Etude rétrospective des valeurs des CT des 5 points de la gamme sur 36 séries (runs) d'amplification de décembre 2015 à mars 2016.

Le nom de l'opérateur étant tracé pour chaque run cela nous a permis de tester en même temps la variation inter opérateurs.

b) PCR *Toxoplasma gondii*

Etude rétrospective des valeurs du CIQ ADN Toxoplasme sur 35 runs d'amplification de décembre 2015 à mars 2016.

Le nom de l'opérateur étant tracé pour chaque run cela nous a permis de tester en même temps la variation inter opérateur.

5. Robustesse

PCR *Aspergillus fumigatus* et PCR *Toxoplasma gondii*

Pour évaluer la robustesse de la méthode, 2 paramètres ont été testés :

- La quantité d'ADN distribué dans le milieu réactionnel
- La variation des températures de dénaturation et d'hybridation

➤ **Quantité d'ADN distribué dans le milieu réactionnel**

Pour évaluer l'impact d'une variation de la quantité d'ADN déposée lors de l'étape d'amplification, 2 extraits d'ADN (niveau haut et moyen) ont été sélectionnés et déposés en 3 fois (triplicate) en faisant varier le volume de la prise d'essai de 30 à 50% par rapport à la prise d'essai de référence soit les volumes suivants : 2.5 µl ; 3.5µl ; 5µl ; 6.5µl ; 7.5µl en utilisant une pipette à volume variable étalonnée par un prestataire certifié Cofrac.

➤ **Variation des températures de dénaturation et d'hybridation**

Pour évaluer l'impact d'une variation des températures dans le bloc chauffant nous avons amplifié un des extraits testés lors de la répétabilité avec 6 programmes d'amplification différents.

Programme de référence utilisé pour les répétabilités :

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25 µl
- Température de dénaturation 95°C
- Température d'hybridation 60°C

Programme 1

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25 µl
- Température de dénaturation 96°C
- Température d'hybridation 60°C

Programme 4

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25 µl
- Température de dénaturation 94°C
- Température d'hybridation 60°C

Programme 2

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25 µl
- Température de dénaturation 95°C
- Température d'hybridation 61°C

Programme 5

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25µl
- Température de dénaturation 95°C
- Température d'hybridation 59°C

Programme 3

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25 µl
- Température de dénaturation 96°C
- Température d'hybridation 61°C

Programme 6

- 45 cycles d'amplification
- Volume 25µl
- Température de dénaturation 94°C
- Température d'hybridation 59°C

6. Conservation et stabilité des réactifs

Les seuls réactifs utilisés n'ayant pas de date de péremption sont les amorces et les sondes pour lesquelles nous ne disposons que de la température de conservation recommandée par le fournisseur.

La durée de stabilité des sondes s'appliquent également aux amorces car les sondes sont des oligonucleotides marqués par un fluorochrome et sont donc plus fragiles que les amorces.

Afin de déterminer la durée de stabilité des sondes nous nous sommes basés sur les critères suivants :

- ***Le niveau de fluorescence de base du fluorochrome émetteur FAM des sondes.***

Pour chaque série la valeur de fluorescence de la sonde doit être comprise dans l'intervalle de référence.

Pour déterminer l'intervalle de référence de la fluorescence de base des sondes nous avons calculé la valeur cible à partir de la moyenne des valeurs de fluorescence obtenues à chaque série sur une période de 3 mois. Chaque série est validée par un CIQ ou une gamme (cf annexe 7).

Les intervalles de références calculés ont servi à vérifier l'intégrité de la sonde et à déterminer les durées de stabilité de chaque sonde.

- ***Les valeurs du CIQ***

Les valeurs du CIQ et de la gamme ont permis de valider les séries qui ont servi à la détermination de la fluorescence de base pendant la période d'évaluation.

- ***La traçabilité de la réception, reconstitution et utilisation des sondes*** (cf annexes 8)

7. Sensibilité

Une étude réalisée dans le service et qui a fait l'objet d'une publication (1) a permis de déterminer la sensibilité de la PCR *Toxoplasma gondii* qui est de 0,1 toxoplasme/ml et celle de la PCR *Aspergillus fumigatus* qui est de 11 copies/ml.

8. Exactitude

Le service participe depuis 2008 à des évaluations externes de qualité (EEQ) de la PCR *Toxoplasma gondii* à raison de 2 campagnes par an comprenant chacune 10 échantillons avec 2 matrices différentes : 5 plasmas et 5 liquides amniotiques.

Les résultats de toutes les enquêtes à ce jour sont conformes.

Il n'existe pas de programme d'EEQ pour la PCR *Aspergillus fumigatus* et des échanges inter laboratoires n'ont pas été mis en place.

9. Interférences

La présence d'inhibiteur potentiel essentiellement lié aux traitements des patients immunodéprimés en hématologie peut être à l'origine d'un résultat faussement négatif. L'utilisation dans chaque puits patient d'un témoin d'inhibition (IPC d'Applied BioSystems) permet de mettre en évidence une possible inhibition.

La présence d'un inhibiteur est levée par la dilution de l'éluât au 1/10^{ème} voir au 100^{ème}.

10. Comparaison de méthodes

a) *Les méthodes d'extraction :*

Plusieurs comparaisons du Qiagen Blood mini kit avec d'autres méthodes ont été réalisées dans le service et ont fait l'objet de publications cf bibliographie (4) (5) (6) (7) qui ont abouti aux conclusions suivantes :

L'utilisation d'un volume plus important (2ml) lors de l'extraction par le kit Qiagen MIDI ne montre pas un bénéfice significatif par rapport à l'utilisation du volume de 200µl par le kit Qiagen blood mini.

La sensibilité du kit d'extraction Qiagen QIAamp DNA blood mini, pour la cible rep 529 utilisée dans le service, est de 93% pour une concentration équivalente à 0.2 toxoplasme par puits et de 84% pour l'équivalent de 0.1 toxoplasme par puits (correspondant à 1 toxoplasme /ml).

Le kit d'extraction Qiagen QIAamp DNA minikit, pour la cible rep 529 utilisée dans le service permet la mise en évidence de l'équivalent de 0.1 toxoplasme par puits (correspondant à 1 toxoplasme /ml).

Le kit d'extraction de QIAGEN présente la meilleure performance parmi les kits d'extraction manuelle. Cependant il est moins performant que les extracteurs automatiques tels que le MagnaPur de Roche.

Conclusion finale :

Les différentes études réalisées dans le service confirment les performances du kit QIAamp blood mini (Qiagen) et celle du MagnaPur (Roche) qui sont satisfaisantes et conformes aux exigences de notre pratique.

b) La méthode d'amplification

1) PCR *Aspergillus fumigatus*

Une comparaison de différentes méthodes diagnostiques de l'aspergillose invasive(AI) a été réalisée dans le service et a fait l'objet d'un article publié (3) :

Cette étude compare les performances de 2 techniques de diagnostic de l'AI :

La PCR *aspergillus* utilisée seule : sensibilité 66.7%, spécificité 98.7% VPN 98 et VPP 75.6%.

L'index de galactomanane utilisée seul : sensibilité 78,4%, spécificité 87.5% VPN 98.6 et VPP 27%

Malgré une faible sensibilité, la PCR a permis de détecter des cas d'aspergillose invasive non détectés par le galactomannane et la culture, ce qui la rend complémentaire. En effet, la combinaison des 2 techniques augmente la sensibilité diagnostique de l'AI : sensibilité 88,2%, spécificité 98.7% VPN 97% et VPP 75.6%

2) PCR *Toxoplasma gondii*

Une étude comparative multicentrique entre notre PCR maison et la PCR commercialisée par Bio-Évolution a été réalisée dans notre service et a fait l'objet d'une publication. Cf. article (2)

Cette étude montre des performances égales du kit de Bio-Evolution comparé à notre PCR maison (sensibilité : 86%, spécificité : 100%). Néanmoins, des problèmes d'approvisionnements et de conditionnement des réactifs ont été dissuasifs pour envisager l'adoption de ce kit commercial.

G. Résultats et interprétation des performances des méthodes d'extraction et de PCR

L'ensemble des tableaux de recueil des données brutes est répertorié en annexe de ce document, (cf annexes 9 ;10 ;11 ;12 ;13 ;14 ;15 ;16 ;17 ;18 ;19 ;20)

Evaluation de la performance de l'extraction manuelle de l'ADN par QIAamp DNA Blood mini (Qiagen)

Les résultats sont obtenus en CT, cycle of threshold correspondant au point d'intersection entre le signal de l'amplification et le seuil prédéfini.

REPETABILITE Date : 22/03/2016							
Echantillons :	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en CT	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ¹
Sang total d'un patient unique							
FQR	30	23.1	0.2	0.9	Non fournis	5%	Conforme

**valeur communément retrouvée dans la validation des kits PCR commerciaux

Conclusion la valeur du CV obtenu est inférieure au CV limite, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

FIDELITE INTERMEDIAIRE Période d'évaluation : 22/03/16 au 10/06/2016							
Echantillons :	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
Sang total d'un patient unique							
FQR	30	23.2	0.6	2.4	Non fournis	5%	Conforme

**valeur communément retrouvé dans la validation des kits PCR commerciaux

Conclusion : la valeur du CV obtenue est inférieure au CV limite, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

¹ Conforme/non conforme

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Période d'évaluation : 22/03/16 au 10/06/2016								
Echantillons Sang total d'un patient unique	Opérateur	Nbre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion ⁵
FQR	BR	7	23.8	0.4	1.8	Non fournis	5%	Conforme
FQR	IJ	12	23	0.4	1.8	Non fournis	5%	Conforme

**valeur communément retrouvée dans la validation des kits PCR commerciaux

Conclusion conforme pour les 2 opérateurs, variabilité inter opérateur très satisfaisante

Evaluation de la performance de l'extraction automatisée de l'ADN par le MagnaPur (Roche)

Les résultats sont obtenus en CT, cycle of threshold correspondant au point d'intersection entre le signal de l'amplification et le seuil déterminé.

REPETABILITE Date : 22/03/16							
Echantillons Sérum d'un patient unique	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en CT	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ²
FMR	24	29,0	0,4	1.3	Non fournis	5%	conforme

**valeur communément retrouvé dans la validation des kits PCR commerciaux

Conclusion : la valeur du CV obtenue est inférieure au CV limite, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Période d'évaluation : 31/03/16 au 04/05/2016							
Echantillons Sérum d'un patient unique	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
FMR	11	27,6	0,4	1	Non fournis	5%	conforme

**valeur communément retrouvé dans la validation des kits PCR commerciaux

Conclusion : la valeur du CV obtenue est inférieure au CV limite, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

² Conforme/non conforme

VARIABILITE INTER-OPERATEURS								
Période d'évaluation : 31/03/16 au 04/05/2016								
Echantillons	Opérateur	Nbre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
Sérum d'un patient unique								
FMR	IJ	3	27.1	0.1	0	Non fournis	5%	conforme
FMR	BR	4	28,0	0,5	2	Non fournis	5%	conforme

**valeur communément retrouvée dans la validation des kits PCR commerciaux

Conclusion : conforme pour les 2 opérateurs, variabilité inter opérateurs très satisfaisante.

Evaluation des performances de la PCR *Toxoplasma gondii*

REPETABILITE							
Date : 24/05/2016							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (CT)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ³
Patient ADN niveau bas	6	35.4	0.3	1	Non fournis	5%	Conforme
Patient ADN niveau haut	6	28	0.1	0.3	Non fournis	5%	Conforme

**CV communément retrouvé dans les kits de PCR commercialisés

Conclusion : Méthode conforme car les CV de répétabilité sont inférieurs à celui retenu par le laboratoire.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Période d'évaluation : 21/12/2015 au 15/03/2016 (données rétrospectives)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (CT)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
CIQ ADN TOXO	35	32	0.6	1.8	Non fournis	5%	Conforme

**CV communément retrouvé dans les kits de PCR commercialisés

Conclusion : Méthode conforme car les CV de répétabilité sont inférieurs à celui retenu par le laboratoire.

³ Conforme/non conforme

VARIABILITE INTER-OPERATEURS							
Période d'évaluation : 21/12/2015 au 15/03/2016							
Echantillons CIQ ADN TOXO	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (CT)	Ecart- type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion ⁵
GLD	30	32,14	0,60	1,9	Non fournis	5%	conforme
IJ	15	31.94	0.42	1.3	Non fournis	5%	conforme

Conclusion : méthode conforme pour les 2 opérateurs, variabilité inter opérateurs très satisfaisante.

Evaluation des performances de la PCR *Aspergillus fumigatus*

REPETABILITE Date : 24/05/2016							
Echantillons ADN	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart- type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire **	Conclusion ⁴
Patient ADN niveau haut	6	29,83	0,20	0,67	Non fournis	5%	conforme
Patient ADN niveau bas	6	35,03	0,40	1,13	Non fournis	5%	conforme

**CV communément retrouvé dans les kits de PCR commercialisés

Conclusion : Méthode conforme aux exigences et aux performances attendues.

⁴ Conforme/non conforme

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Période d'évaluation : 23/12/2015 AU 24/03/2016 (données rétrospectives)							
ADN gamme	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
Point 7 74 fg/µl	72	23,1	0,30	1,28	Non fournis	5%	conforme
Point 8 7,4 fg/µl	72	26.6	0.51	1.9	Non fournis	5%	conforme
Point 9 0,74 fg/µl	72	29.8	0.58	1.9	Non fournis	5%	conforme
Point 10 0,074 fg/µl	72	32.4	0.59	1.82	Non fournis	5%	conforme
Point 11 0,0074 fg/µl	72	35.3	1.79	5.07	Non fournis	5%	conforme

**CV communément retrouvé dans les kits de PCR commercialisés

Conclusion : Méthode conforme aux exigences et aux performances attendues pour les quantités d'ADN < à 34 ct. La variabilité des résultats obtenus au-delà de 34 ct s'explique par la faible quantité d'ADN circulant correspondant à 0.0074 fg/µl. il est admis (cf article dans la lettre de l'infectiologie Tome XX n°3 mai-juin 2005) que la quantité d'ADN fongique est très faible lors des aspergilloses invasives, elles sont de l'ordre de 100fg/ml à 5 ng/ml. La gamme couvre largement l'étendue des mesures retrouvées chez les patients à risque d'aspergillose invasive.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS								
Période d'évaluation : 23/12/2015 AU 24/03/2016 (données rétrospectives)								
Opérateurs	ADN gamme	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
Barbara Ruskul	Point 7 cible : 22-24CT	13	23.3	0.33	1.4	Non fournis	5%	conforme
	Point 8 cible : 25,6-27,6 CT	13	26.6	0.29	1.1	Non fournis	5%	conforme
	Point 9 cible : 38.8-30,8 CT	13	30.2	0.34	1.1	Non fournis	5%	conforme
	Point 10 cible : 31,4-33,4 CT	13	32.5	0.371	1.1	Non fournis	5%	conforme
	Point 11 cible : 34,3-36,3 CT	13	35.9	1.54	4.3	Non fournis	5%	conforme
Opérateurs	ADN gamme	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
Geraldine Loiseau-Dumas	Point 7 cible : 22-24CT	11	23	0.2	0.9	Non fournis	5%	conforme
	Point 8 cible : 25,6-27,6 CT	11	26.4	0.59	2.2	Non fournis	5%	conforme
	Point 9 cible : 38.8-30,8 CT	11	29.7	0.54	1.8	Non fournis	5%	conforme
	Point 10 cible : 31,4-33,4 CT	11	32.3	0.48	1.5	Non fournis	5%	conforme
	Point 11 cible : 34,3-36,3 CT	11	35	1.17	3.4	Non fournis	5%	conforme
Opérateurs	ADN gamme	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire**	Conclusion ⁵
Sylvie Guerrin	Point 7 cible : 22-24CT	6	22.9	0.16	0.7	Non fournis	5%	conforme
	Point 8 cible : 25,6-27,6 CT	6	26.5	0.85	3.2	Non fournis	5%	conforme
	Point 9 cible : 38.8-30,8 CT	6	29.6	0.38	1.3	Non fournis	5%	conforme
	Point 10 cible : 31,4-33,4 CT	6	32.3	0.32	1	Non fournis	5%	conforme
	Point 11 cible : 34,3-36,3 CT	6	34.7	0.49	1.4	Non fournis	5%	conforme

**CV communément retrouvé dans les kits de PCR commercialisés

Conclusion

Méthode reproductible et assez robuste pour les points de gamme 7,9, 10.

Pour le point 11, correspondant à une très faible quantité, il est attendu que les valeurs soient plus variables que les autres points de la gamme. Le point 8 n'est variable que pour une seule technicienne et cette variabilité n'est pas retrouvée pour les autres points dont le point 11.

Le nombre de valeurs analysé étant faible (n=6) une seconde analyse sera réalisée avec plus de valeurs dans le suivi de la méthode.

CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

a) Conservation avant ouverture

Les tests réalisés dans le service permettent de déterminer la durée de conservation et la stabilité des sondes/amorces grâce aux intervalles de références de la fluorescence de base de la sonde toxoplasmose.

Cette valeur a été établie à partir de la moyenne des valeurs de fluorescence de base de la sonde toxoplasmose recueillies sur une période d'1 an pour les runs validés grâce à la conformité du CIQ.

Conclusion : Conservation des sondes avant ouverture à $< -20^{\circ}\text{C}$ pendant 12 mois. L'étude se poursuit pour tester les durées limites de conservation et de stabilité des amorces et sondes.

b) Stabilité des réactifs après ouverture

Les tests réalisés dans le service permettent de déterminer la durée de conservation et la stabilité des sondes/amorces grâce aux intervalles de références de la fluorescence de base de la sonde toxoplasmose.

Cette valeur a été établie à partir de la moyenne des valeurs de fluorescence de base de la sonde toxoplasmose recueillies sur une période d'1 an pour les runs validés grâce à la conformité du CIQ.

Conclusion :

Stabilité des sondes reconstituées à < -20°C pendant minimum 8 mois

Stabilité des sondes reconstituées entre 2 et 8°C pendant minimum 1 mois

L'étude se poursuit pour tester les durées limites de conservation et de stabilité des amorces et sondes.

ROBUSTESSE DE LA METHODE D'AMPLIFICATION PCR

a) Variation de la température de dénaturation et d'hybridation

1) PCR *Toxoplasma gondii*

Des PCR ont été réalisées avec 2 niveaux de concentration d'ADN *Toxoplasma gondii*, en modifiant les températures de dénaturation et/ou d'hybridation de +/- 1 degré Celsius par rapport au programme de référence, selon le mode opératoire ci-dessous :

Test	cycles	volume	T°dénaturation et durée	T° hybridation et durée	Ct niveau bas	Ct niveau haut
référence	45	25µl	95°C 3"	60°C 30"	35*	28*
1	45	25µl	96°C 3"	60°C 30"	35,4	28
2	45	25µl	95°C 3"	61°C 30"	35,3	28
3	45	25µl	96°C 3"et	61°C 30"	35,7	28
4	45	25µl	94°C 3"et	60°C 30"	35,2	29,9
5	45	25µl	95°C 3"et	59°C 30"	35,4	28,2
6	45	25µl	94°C 3"et	59°C 30"	35,4	28,4

*Les valeurs de Ct de référence ont été obtenues après une répétabilité sur 6 valeurs

Les résultats en CT ont été comparés à ceux obtenus avec le programme de référence, aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le niveau de concentration de l'ADN.

La différence de 1 degré en plus ou en moins de la valeur de référence n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR Toxoplasmose.

2) PCR *Aspergillus fumigatus*

Des PCR ont été réalisées avec 1 niveau haut de concentration d'ADN *Aspergillus fumigatus*, en modifiant les températures de dénaturation et/ou d'hybridation de +/- 1 degré Celsius par rapport au programme de référence, selon le mode opératoire ci-dessous :

Test	cycles	volume	T°dénaturation et durée	T° hybridation et durée	Ct niveau haut	
référence	45	25µl	95°C 3"	60°C 30"	29.8*	
1	45	25µl	96°C 3"	60°C 30"	29.7	
2	45	25µl	95°C 3"	61°C 30"	29.7	
3	45	25µl	96°C 3"et	61°C 30"	29.7	
4	45	25µl	94°C 3"et	60°C 30"	29.9	
5	45	25µl	95°C 3"et	59°C 30"	29.8	
6	45	25µl	94°C 3"et	59°C 30"	29.7	

*Les valeurs de Ct de référence ont été obtenues après une répétabilité sur 6 valeurs

Les résultats en CT ont été comparés à ceux obtenus avec le programme de référence, aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le niveau de concentration de l'ADN.

La différence de 1 degré en plus ou en moins de la valeur de référence n'a pas eu d'impact sur le résultat de la PCR *Aspergillus*.

b) Variation de la quantité d'ADN dans la prise d'essai pour les 2 PCR

Des PCR ont été réalisées en utilisant le programme de température de référence mais en variant la prise d'essai de +/- 30% et de +/- 50% par rapport à la prise d'essai de référence de 5 µl pour 2 niveaux de concentration d'ADN.

Les résultats en CT obtenus pour la prise d'essai de référence de 5µl après une répétabilité sur 6 valeurs sont: niveau bas = 32,5 niveau haut= 25.7

Test	Prise d'essai	Ct niveau haut	Ct niveau bas	
référence	5 µl	25.7	32.5	
1	2.5	26.6	33.6	
2	3.5	26.9	32.8	
3	6.5	25.1	32.5	
4	7.5	24.9	31.9	

Les résultats en CT ont été comparés à ceux obtenus avec le programme de référence, aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le niveau de concentration de l'ADN.

La différence de 30 à 50% n'a pas eu d'impact sur le résultat de la PCR Toxoplasmose.

Conclusion :

La performance de la PCR Toxoplasmose n'est pas influencée par des variations de température de +/- 1 °c du bloc chauffant ni par des variations de plus ou moins 30 à 50% de la quantité d'ADN présente dans le mix de réaction, ce qui rend la méthode robuste dans la pratique quotidienne du service et permet de conclure que la température du thermocycleur et les pipettes nécessaires au dépôt ne sont pas critiques dans l'intervalle étudié.

III. CONCLUSION

Les deux méthodes choisies ont été vérifiées/validées et déclarées conformes aux performances et exigences du service. Elles seront présentées au COFRAC pour le prochain audit.

La rareté des échantillons positifs le coût des réactifs ont été des facteurs limitant dans l'évaluation des performances des deux méthodes.

L'aboutissement de ce travail n'a pas été aisé, compte tenu des nombreuses difficultés rencontrées sur le plan technique et personnel.

De plus les contraintes du service ne m'ont pas permis de bénéficier du temps suffisant pour finaliser les objectifs fixés. En effet, l'évaluation des performances des 2 méthodes, la mise en place de la traçabilité, le recueil des données et la formalisation des 2 dossiers de validation/vérification ont nécessité un temps au-delà des horaires du service.

Force est de constater que des progrès restent à faire dans l'octroi de temps et de personnel indispensable à l'avancement de la démarche qualité des services.

Cependant, afin d'atteindre mon 2ème objectif, grâce au travail réalisé et à l'expérience acquise, une aide à la validation d'une technique de biologie moléculaire est en cours d'élaboration afin de faire bénéficier les autres services du pôle de notre expérience. Cette aide sera soumise en cellule qualité pour avis et discussions.

Bibliographie

Publications

- (1) **Characterization and Multicentric Validation of a Common Standard For *Toxoplasma gondii* Detection Using Nucleic Acid Amplification Assays**” E.Varlet-Marie, Y.Sterkers, MP.Brenier-Pinchart,S.Cassaing, F. Dalle ,L.Delhaes, D.Filisetti, H.Pelloux, F.Touafek, H.Yera, P.Bastien.
- (2) **Multicentric Comparative Assesment of the Bio-Evolution *Toxoplasma gondii* Detection Kit with Eight Laboratory – Developed PCR assays for Molecular Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis.** D.Filisetti, Y.Sterker, MP.Brienier-Pinchart, S.Cassaing, F.Dalle, L.Delahaes, H.Pelloux, F.Touafek, E.Varlet-Marie, H.Yera, E.Candolfi, P.Bastien
- (3) **Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients**”. Imbert S, Gauthier L, Joly I, Brossas JY, Uzunov M, Touafek F, Brun S, Mazier D, Datry A, Gay F, Fekkar A. Clin Microbiol Infect. 2016.
- (4) PCR-Based Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Blood and Ocular Samples for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. C. Bourdin, A. Busse, E. Kouamou, F. Touafek, B. Bodaghi,P, Le Hoang, D. Mazier, L. Paris,A, Fekkar. JCM Nov 2014
- (5) Multicentric Comparative Analytical Performance Study for Molecular Detection of Low Amounts of *Toxoplasma gondii* . Y.Sterker, E.Varlet-Marie, S.Cassaing, MP. Brenier-pinchart, S.Brun, F.Dalle, L. Delhaes, D. Filisetti, H.Pelloux, H. Yera, P. Bastien. JCM Sep 2010.
- (6) Characterization and Multicentric Validation of Common Standard for *Toxoplasma gondii* Detcetion Using Nucleic Acid Amplification Assays. . E.Varlet-Marie Y.Sterker, , Brenier-pinchart, S.Cassaing, MP, F.Dalle, L. Delhaes, D. Filisetti, H.Pelloux,F.Touafek, H. Yera, P. Bastien. JCM Nov 2014.
- (7) Multicenter Comparative Evaluation of Five Commercial Methods for *Toxoplasma* DNA Extraction from Amniotic Fluid._H. Yera, D. Filisetti, P. Bastien, T.Ancelle, P.Thulliez, L.Delahas. JCM Dec 2009.

Documents associés

- Norme NF EN ISO 15189, décembre 2012
- SH REF 02, recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médical selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012, octobre 2013, COFRAC, section Santé humaine
- SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes de biologie médicale, avril 2011, COFRAC, section Santé humaine
- SH GTA 06 : Guide technique d'accréditation contrôle de qualité en biologie médicale
- SH INF 50, Portées type d'accréditation, juin 2011, COFRAC, section Santé humaine
- SH GTA 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale, COFRAC, section Santé humain

Annexes

Annexe 1 : Localisation des différents secteurs d'activité du pôle sur le site Pitié Salpêtrière

Annexe 2 : Organigramme du pôle de Biologie Médicale et Pathologie du GHU-PSL-CFX

Annexe 3 : Organisation qualité du pôle de Biologie Médicale et Pathologie

Annexe 4 : Organigramme du service de Parasitologie et Mycologie

Annexe 5 : Identification des points potentiellement critiques du sous processus Extraction automatisée

Annexe 6 : Représentation schématisée du principe des sondes Taqman

Annexe 7 : exemple de relevé de la fluorescence de base (FAM) pour la sonde AFU 28S-PROBE

Annexe 8 : Exemple de traçabilité d'une sonde

Annexe 9 : Extraction MagnaPur : résultats de la répétabilité et de la contamination inter échantillons

Annexe 10 : Extraction MagnaPur : résultats de la fidélité intermédiaire et de la variation inter opérateurs

Annexe 11 : Extraction QIAamp DNA Blood mini (Qiagen) : résultats de la répétabilité et de la contamination inter échantillons

Annexe 12 : Extraction QIAamp DNA Blood mini (Qiagen) : résultats de la fidélité intermédiaire et de la variation inter opérateur

Annexe 13 : PCR Aspergillus : résultats de la répétabilité/contamination inter échantillon / spécificité

Annexe 14 : PCR Aspergillus : résultats de la fidélité intermédiaire et variation inter opérateur

Annexe 15 : PCR Toxoplasmose : Répétabilité/contamination inter échantillon/Spécificité

Annexe 16 : PCR Toxoplasmose : résultats de la fidélité intermédiaire/variation inter opérateur

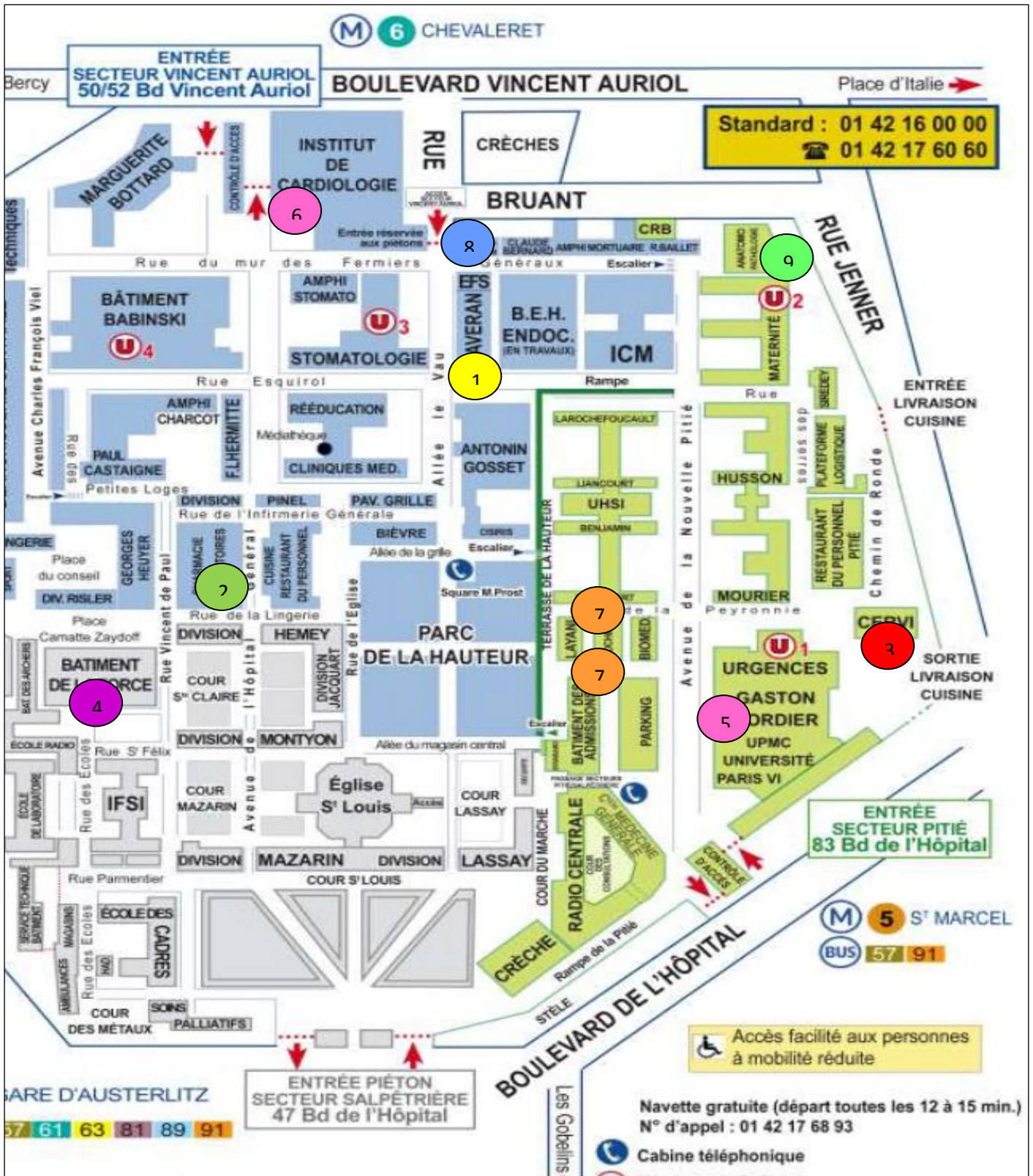
Annexe 17 : PCR Aspergillus : résultats de la robustesse (test de variation des températures)

Annexe 18 : PCR Toxoplasmose : résultats de la robustesse (test de variation des températures)

Annexe 19 : Résultats de la robustesse (test de variation de la prise d'essai d'ADN)

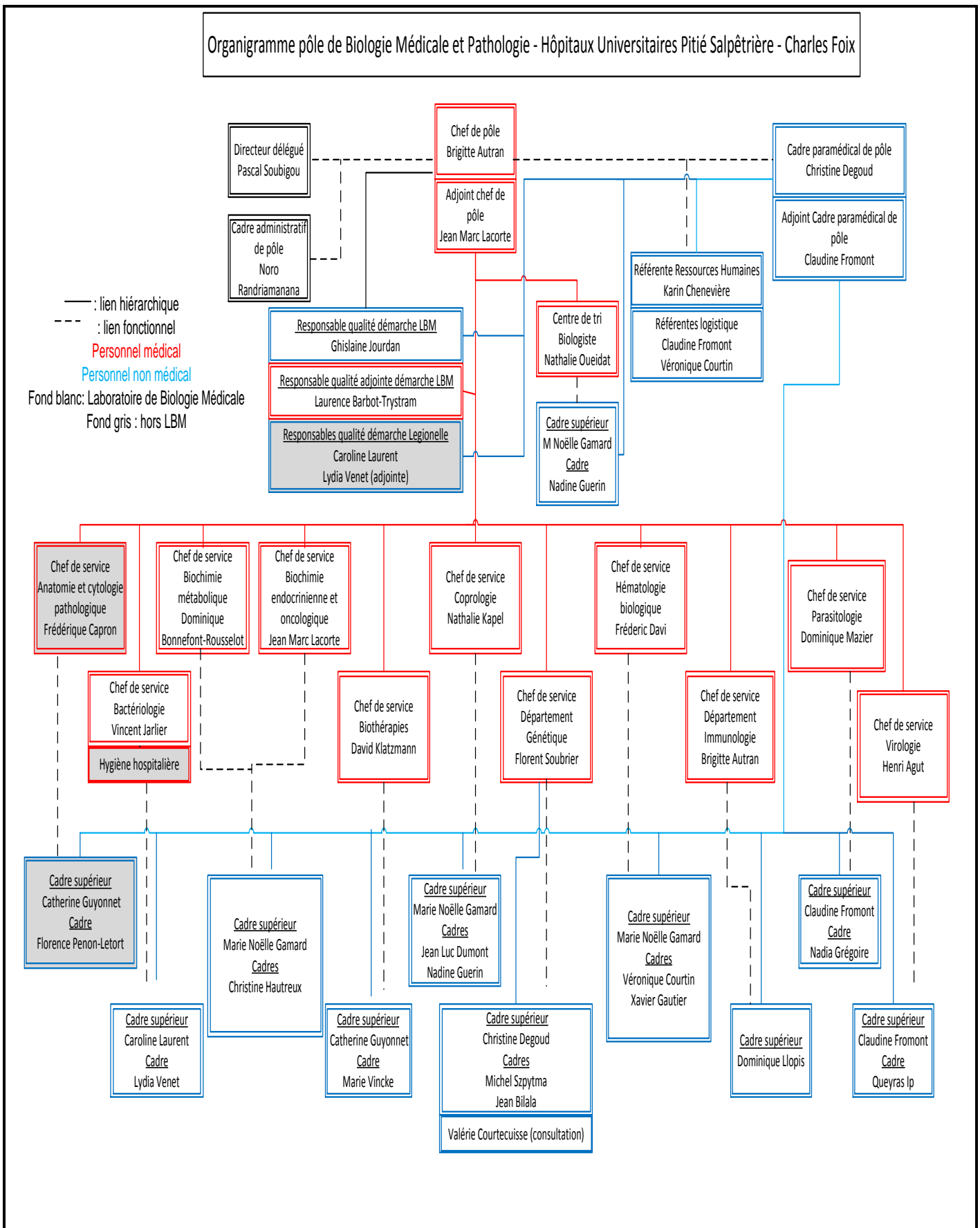
Annexe 20 : PCR Toxoplasmose : relevé des valeurs de fluorescence de base de la sonde

Annexe 1 : Localisation des différents secteurs d'activité du pôle sur le site Pitié Salpêtrière

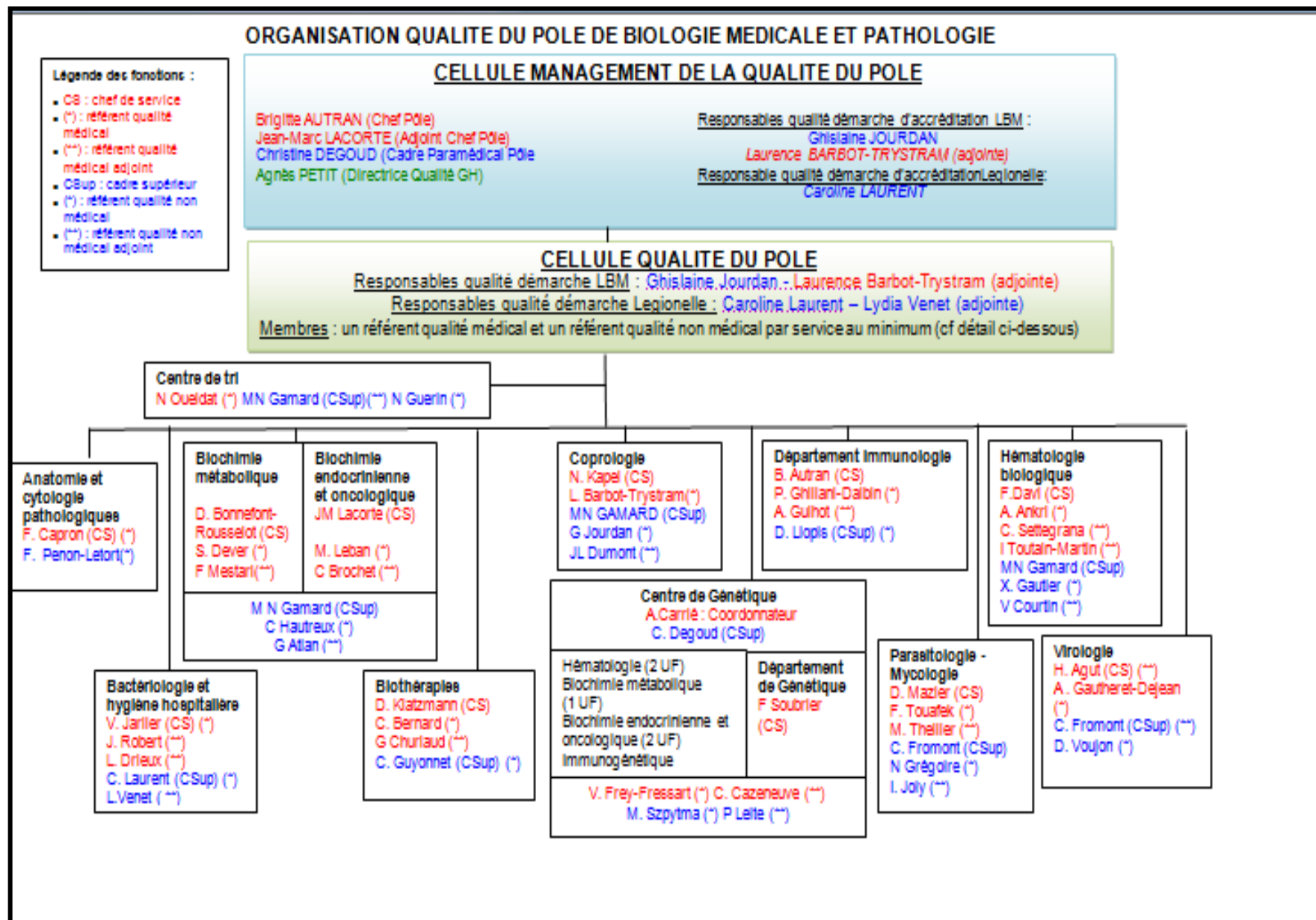


- 1** Parasitologie et Mycologie, Hématologie (biologie moléculaire)
- 2** Bactériologie- Hygiène, Biochimies, Hématologie, Centre de tri des examens
- 3** virologie et département d'Immunologie **8** hématologie (immuno phénotypage)
- 4** Coprologie **7** Département de Génétique
- 5 et 6** Urgences LBU **9** Anatomie et Cytologie

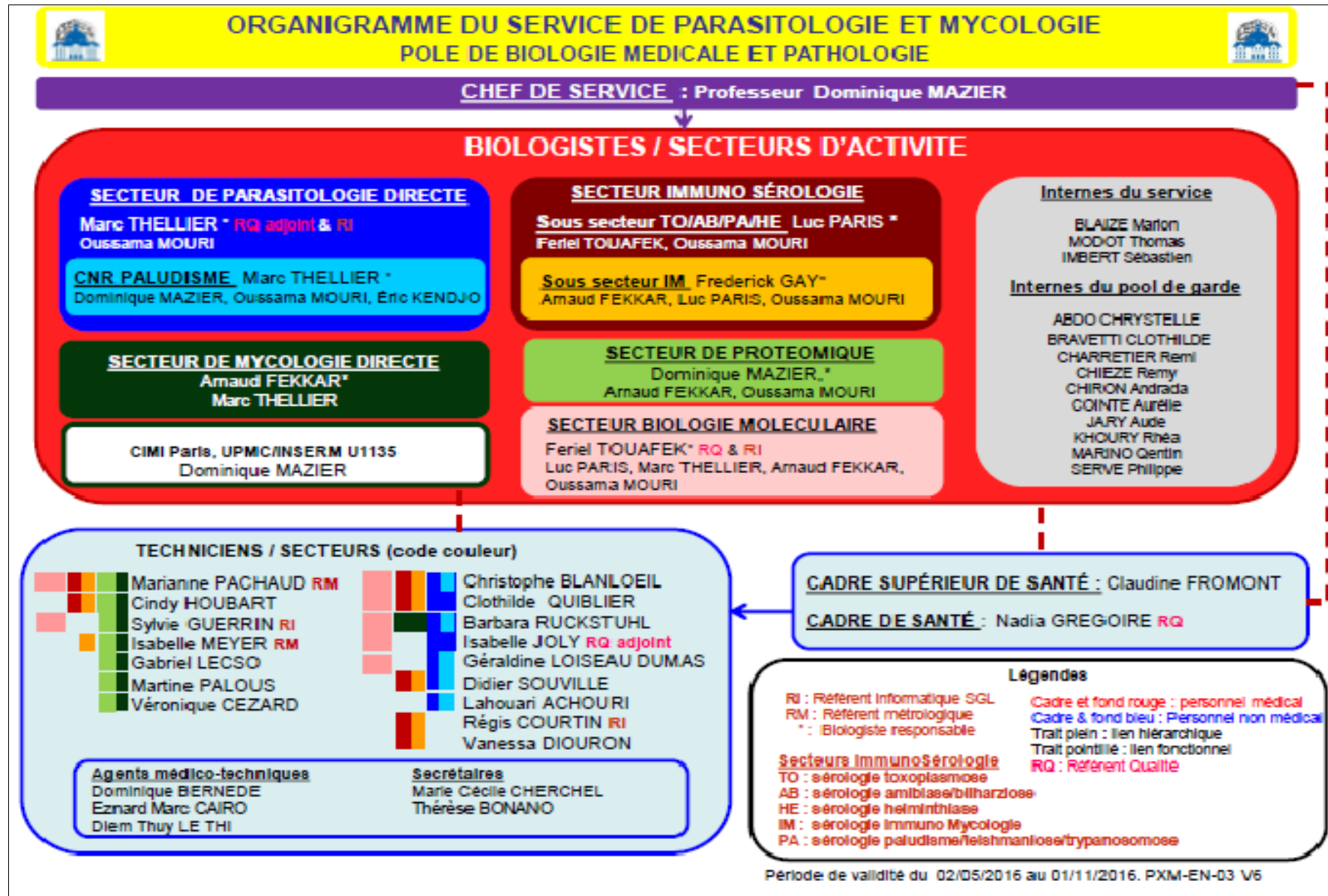
Annexe 2 : Organigramme du pôle de Biologie Médicale et Pathologie du GHU-PSL-CFX



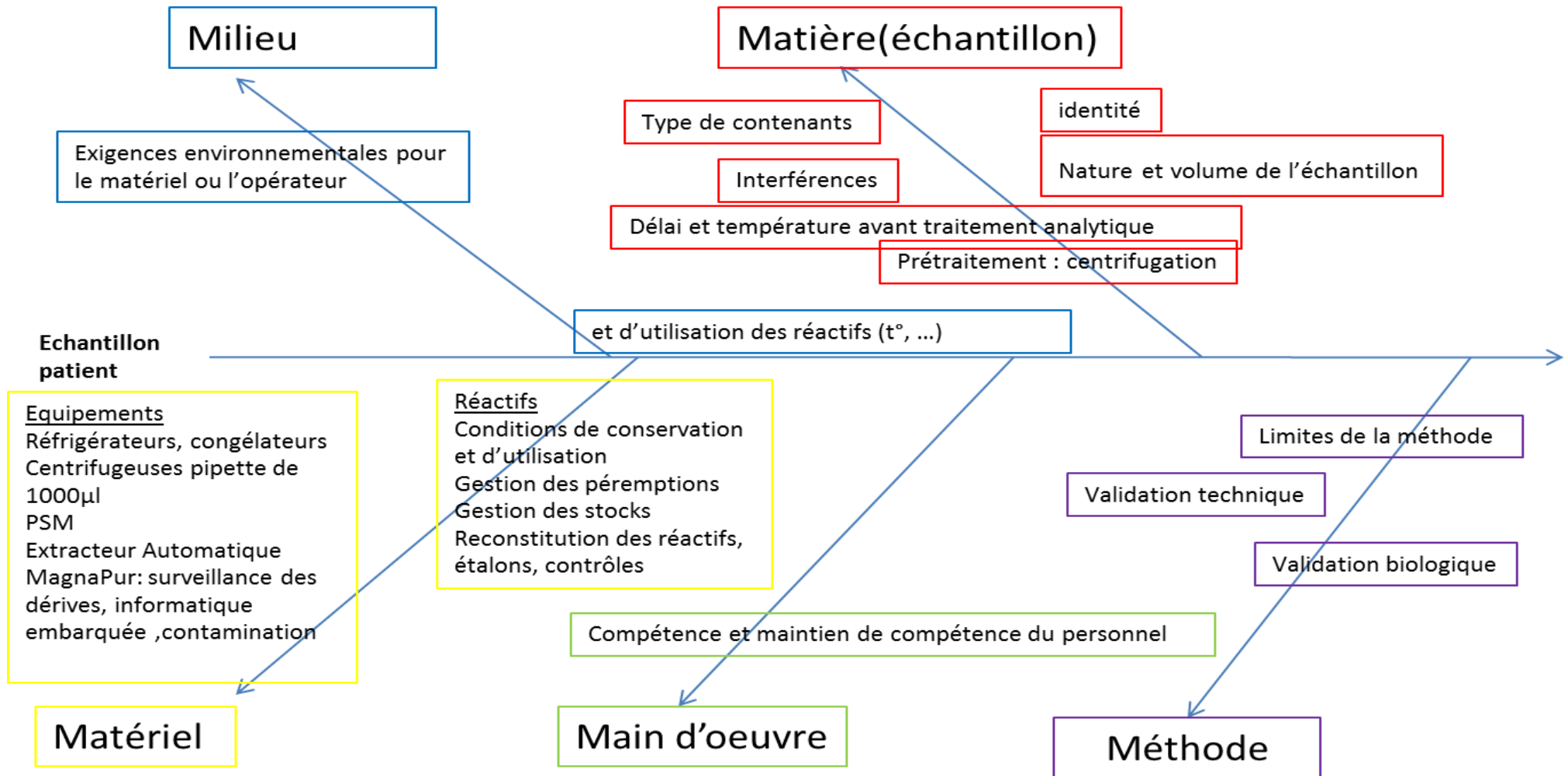
Annexe 3 : Organisation qualité du pôle de Biologie Médicale et Pathologie



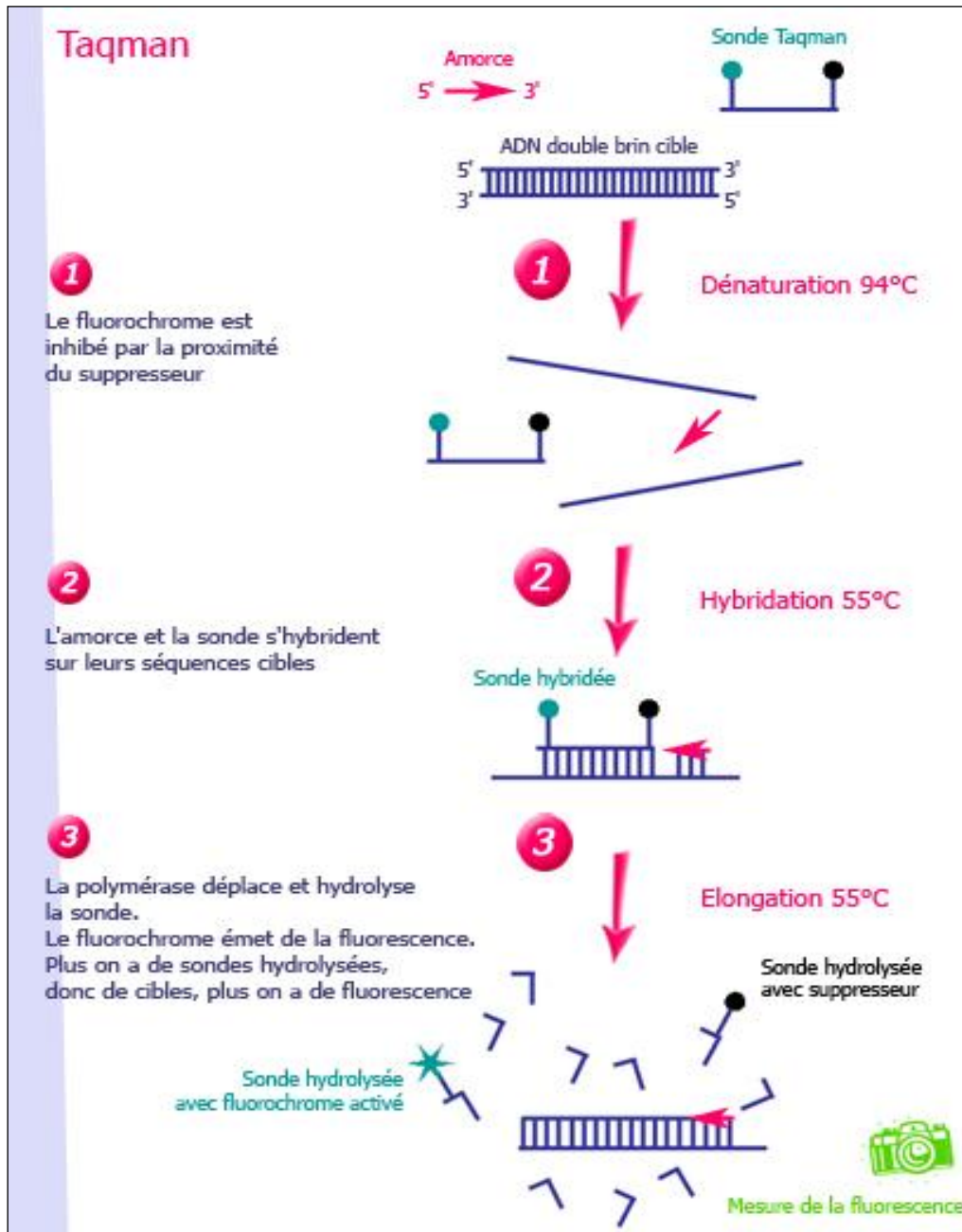
Annexe 4 : Organigramme du service de Parasitologie et Mycologie



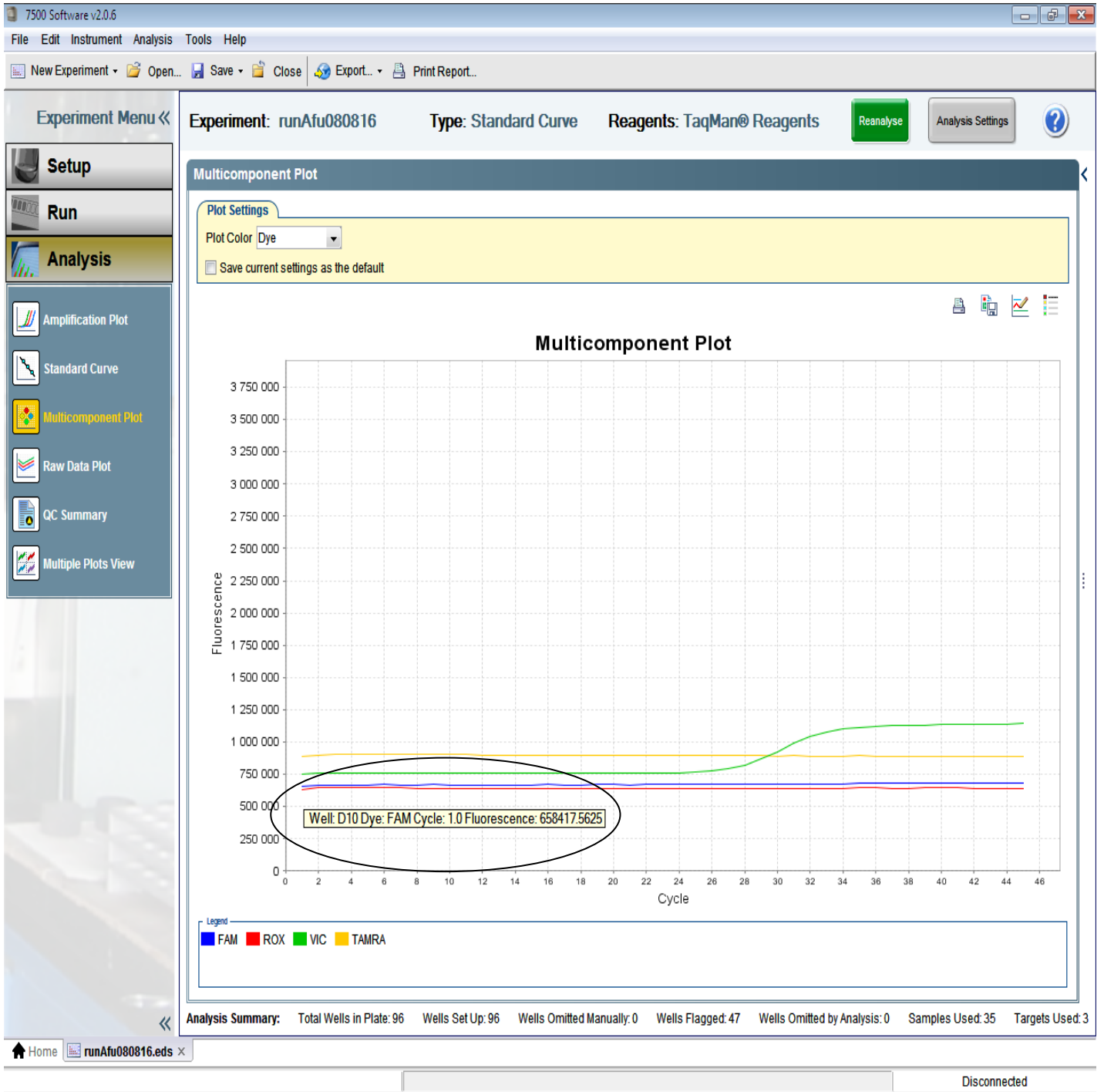
Annexe 5 : Identification des points potentiellement critiques du sous processus Extraction automatisée





Annexe 6 : Représentation schématisée du principe des sondes Taqman



Annexe 7 : exemple de relevé de la fluorescence de base (FAM) pour la sonde AFU 28S-PROBE



Annexe 8 : Exemple de traçabilité d'une sonde

	PSL-PARASITOLOGIE- MYCOLOGIE Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière - Charles Foix	Traçabilité des sondes dans le secteur de biologie moléculaire	Ref : PXM-EN-045 Version : 01 Applicable le : 02-11-2015 
---	--	---	---

PCR TOXOPLASMOSE

SONDE : TOXOREP-310 T

SEQUENCE : 5' (6FAM) TCG TGG TGA TGG CGG AGA GAA TTG A (TAMRA) 3'

I. Réception et Reconstitution de la solution mère à 100µM

		Paraphe opérateur
Date de réception	19/03/15	SG
Volume de reconstitution	259 µl	SG
Vérification de séquence	ok	SG
N° lot (code barre produit)	01930055 8	SG
Date de reconstitution	15/01/16	GLD

II. Préparation de la solution de travail à 5 µM (1)

Faire une dilution au 1/20 de la solution mère

Exemple : 80 µl de solution mère dans 1520 µl d'eau ppi

Obtention de 1600 µl de solution de travail répartis en 8 aliquots de 200 µl

Date de préparation	Calcul effectué si différent de l'exemple	Nombre d'aliquots	N° lot attribué	Paraphe opérateur
15/01/16	idem	8	S 19	GLD
09/03/16	idem	8	20	SG
27/5/16	u	8	21	CB
3/8/16	20 µl dans 380 µl eau ppi	8	22	IJ

(1) Ranger les sondes non reconstituées, reconstituées et les aliquots de solution de travail dans les boîtes dédiées, dans le congélateur à -20°C de la pièce pré PCR

lot 23 à partir du 22/08/16

Annexe 9 : Extraction MagnaPur : résultats de la répétabilité et de la contamination inter échantillons

Répétabilité				Contamination inter échantillons			
date de l'extraction	22/03/2016			date de l'extraction	22/03/2016		
opérateur	IJ			opérateur	IJ		
N° lot du kit	14623500			N° lot du kit	14623500		
date de l'amplification	05/04/2016			date de l'amplification	05/04/2016		
opérateur	IJ			opérateur	IJ		
N° lot plaque	I4265Q712			N° lot plaque	I4265Q712		
N°lot sonde albumine	6			N°lot sonde albumine	6		
N° lot amorce F albumine	6			N° lot amorce F albumine	6		
N° lot amorce R albumine	6			N° lot amorce R albumine	6		
N° lot eau ppi	4401542 expire le 7/2017			N° lot eau ppi	4401542 expire le 7/2017		
N° lot du Master mix	1510204 expire le 25/11/2016			N° lot du Master mix	1510204 expire le 25/11/2016		
Extraits	CT puits 1	CT puits 2	CT puits3	Extraits	CT puits1	CT puits2	CT puits3
FMR1	28,8	28,8	29	FMR9	29,5	29,7	29,6
FMR2	28,9	28,9	29	FMR10	28,6	28,4	28,5
FMR3	28,7	28,7	28,9	FMR11	29,4	29,5	29,6
FMR4	28,6	28,8	28,9	FMR12	31	29,8	29,3
FMR5	29,7	29,6	29,7	EM1	undet	undet	undet
FMR6	28,5	28,5	28,8	EM2	undet	undet	undet
FMR7	28,7	29	29	EM3	undet	undet	undet
FMR8	28,9	29,6	29,8	EM4	undet	undet	undet

Undet : négatif

Annexe 10 : Extraction MagnaPur : résultats de la fidélité intermédiaire et de la variation inter opérateurs

extraits	date de l'extraction	opérateur	N°lot du kit	date de l'amplification	opérateur	N° lot mastermix	N° lot sonde	N° lot amorces F	N° lot amorce R	N°lot plaque	N° lot eau pp	CT puits 1	CT puits 2
FMR13	31/03/2016	IJ	14623500	01/04/2016	GLD	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	27,3	27,4
FMR14	05/04/2016	SG	14623500	07/04/2016	SG	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	27,6	27,6
FMR15	11/04/2016	CQ	14623500	11/04/2016	CQ	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	27,5	27,5
FMR16	14/04/2016	BR	14623500	15/04/2016	CQ	1510205	6	6	6	I4265Q614	4401542	31,4	28,9
FMR17	15/04/2016	CQ	14623500	21/04/2016	BR	1510205	6	6	6	I4265Q614	4401542	27,5	27,3
FMR18	21/04/2016	BR	14623500	22/04/2016	IJ	1510205	6	6	6	I4265Q614	4401542	27,9	27,9
FMR19	22/04/2016	BR	14623500	25/04/2016	CQ	1510204	6	6	6	I4265Q614	4401542	27,6	27,5
FMR20	27/04/2016	BR	14623500	28/04/2016	CQ	1510204	7	7	7	I4265Q614	4401542	27,5	29,7
FMR21	29/04/2016	BR	14623500	02/05/2016	SG	1510204	7	7	7	I4265Q614	4401542	27,7	27,8
FMR22	02/05/2016	SG	14623500	03/05/2016	SG	1510204	8	8	8	I4265Q614	4401542	27,5	27,6
FMR23	03/05/2016	IJ	14623500	06/05/2016	SG	1510206	8	8	8	I4675Q726	4401542	27,1	27,2
FMR24	04/05/2016	IJ	14623500	06/05/2016	SG	1510206	8	8	8	I4675Q726	4401542	27,1	27,1

Annexe 11 : Extraction QIAamp DNA Blood mini (Qiagen) : résultats de la répétabilité et de la contamination inter échantillons

date de l'extraction	22/03/2016				
opérateur	IJ				
N° lot du kit	151052614				
date de l'amplification	24/04/2016				
opérateur	IJ				
N° lot plaque	I1975Q414				
N°lot sonde albumine	5				
N° lot amorce F albumine	5				
N° lot amorce R albumine	5				
N° lot eau ppi	4401542			exp 7/2017	
N° lot du Master mix	1510102			exp 26/11/2016	
EXTRAITS	CT puits 1	CT puits 2	CT puits3		
FQR1	22,7	22,7	22,7		
FQR2	22,9	23	23,1		
FQR3	23,1	23,1	23,1		
FQR4	23,2	23,2	23,3		
FQR5	23,3	23,5	23,5		
FQR6	22,9	22,9	22,9		
FQR7	23,1	23,2	23,2		
FQR8	23,1	23,2	23,3		
FQR9	23,3	23,4	23,4		
FQR10	23,1	23,2	23,2		
EQ1	undet	undet	undet		
EQ2	undet	undet	undet		
EQ3	undet	undet	undet		
EQ4	undet	undet	undet		
EQ5	undet	undet	undet		
EQ6	undet	undet	undet		
EQ7	undet	undet	undet		
EQ8	undet	undet	undet		
EQ9	undet	undet	undet		
EQ10	undet	undet	undet		

Undet : négatif

Annexe 12 : Extraction QIAamp DNA Blood mini (Qiagen) : résultats de la fidélité intermédiaire et de la variation inter opérateur

extraits	date de l'extraction	opérateur	N°lot du kit	date de l'amplification	opérateur	N° lot mastermix	N° lot sonde	N° lot amorce F	N°lot amorce R	N°lot plaque	N° lot eau ppi	CT puits 1	CT puits 2
FQR11	22/03/2016	CB	151052614	22/03/2016	CB	1510203	5	5	5	I1975Q414	4401432	23,4	23,5
FQR12	24/03/2016	IJ	151052614	24/03/2016	IJ	1510203	5	5	5	I1975Q414	4401542	22,9	22,9
FQR13	31/03/2016	IJ	154013996	01/04/2016	IJ	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	23,1	23
FQR14	01/04/2016	GLD	154013996	05/04/2016	SG	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	23,3	23,4
FQR15	05/04/2016	SG	154013996	07/04/2016	SG	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	22,9	22,9
FQR16	07/04/2016	CQ	154013996	08/04/2016	IJ	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	23,9	23,8
FQR17	11/04/2016	IJ	154013996	12/04/2016	CQ	1510204	6	6	6	I4265Q712	4401542	22,9	22,9
FQR18	13/04/2016	BR	154013996	15/04/2016	CQ	1510204	6	6	6	I4265Q614	4401542	24,3	24,4
FQR19	15/04/2016	BR	154013996	18/04/2016	CQ	1510204	7	7	7	I4265Q614	4401542	23,7	23,6
FQR20	20/04/2016	BR	154013996	22/04/2016	BR	1510204	7	7	7	I4265Q614	4401542	23,6	23,6
FQR21	22/04/2016	BR	154013996	26/04/2016	BR	1510204	7	7	7	I4265Q614	4401542	24,2	24,2
FQR22	25/04/2016	BR	154013996	26/04/2016	BR	1510204	7	7	7	I4265Q614	4401542	23	22,9
FQR23	13/06/2016	MPA	154013337	14/06/2016	IJ	1512206	10	10	10	I3375Q323	4401542	22,6	22,6
FQR24	25/04/2016	BR	154013996	14/06/2016	IJ	1512206	10	10	10	I3375Q323	4401542	23,7	23,8
FQR25	29/04/2016	BR	154013996	14/06/2016	IJ	1512206	10	10	10	I3375Q323	4401542	24	24,1
FQR26	02/05/2016	IJ	154013996	03/05/2016	SG	1510204	8	8	8	I4265Q614	4401542	22,6	22,7
FQR27	03/05/2016	IJ	154013337	09/05/2016	CB	1512206	8	8	8	I4675Q726	4401542	22,7	22,8
FQR28	17/05/2016	GLD	154017598	18/05/2016	GLD	1512206	8	8	8	I4675Q726	4401542	23,5	23,6
FQR29	17/05/2016	GLD	154017598	18/05/2016	GLD	1512206	8	8	8	I4675Q726	4401542	23,4	23,3
FQR30	18/05/2016	GLD	154017598	20/05/2016	CB	1512206	8	8	8	I4675Q726	4401542	24,1	24
FQR31	19/05/2016	IJ	154017598	20/05/2016	IJ	1512206	8	8	8	I4675Q726	4401542	22,7	22,8
FQR32	23/05/2016	MPA	154017598	24/05/2016	MPA	1512206	8	8	8	I4675Q726	4401542	22,6	22,4
FQR33	23/05/2016	MPA	154017598	26/05/2016	CB	1512206	9	9	9	I4675Q726	4401542	22,8	22,6
FQR34	27/05/2016	IJ	154017598	27/05/2016	CB	1512206	9	9	9	I4675Q726	4401542	22,8	22,8
FQR35	30/05/2016	IJ	154017598	31/05/2016	CB	1510205	9	9	9	I4675Q726	4401542	23,5	23,7
FQR36	31/05/2016	IJ	154013337	31/05/2016	CB	1510205	9	9	9	I4675Q726	4401542	23,9	24
FQR37	06/06/2016	SG	154013337	07/06/2016	BR	1512206	9	9	9	I3775Q323	4401542	22,8	22,9
FQR38	07/06/2016	IJ	154013337	08/06/2016	SG	1512206	9	9	9	I3775Q323	4401542	22,5	22,3
FQR39	09/06/2016	IJ	154013337	10/06/2016	SG	1512206	9	9	9	I3775Q323	4401542	22,7	22,6
FQR40	10/06/2016	IJ	154013337	13/06/2016	BR	1512206	10	10	10	I3375Q323	4401542	23,3	23,3

Annexe 13 : PCR Aspergillus : résultats de la répétabilité/contamination inter échantillon / spécificité

EXTRAITS	E1	E2	E3	PALU	PJ	TOXO	AMIBES	LEISH	CRUZI
N° sérothèque primaire	218/99	211/57	228/97	225/4	214/96	17/79	206/91	206/86	BM CRUZI 1/64
N° sérothèque secondaire	BM-20/0002/60	BM-20/0001/86		BM-20/0002/88	BM-20/0002/32	BM EX 9/89	BM-20/0001/18	BM-20/0001/48	03/10/2013,
date d'extraction	20/05/16	23/05/16	19/05/16	02/05/16	14/03/16	?	20/05/16	28/05/16	03/10/2013,
opérateur	IJ	IJ	IJ	IJ	BR		IJ	GLD	GLD
N° lot KIT extraction	154017598	15695900	154017598	154013337	151052614		154017598	15409141	?
Dilution	non	non	non	non	non	1/10	non	non	1/10
date d'amplification	24/05/2016								
opérateur	IJ								
N° lot master MIX	1512206 expire le 22/01/2017								
N° lot IPC mix	1507101								
N° lot IPC ADN	1505096								
N° LOT sonde AFU	20								
N° lot amorce AFU F	20								
N° lot amorce AFU R	20								
N° lot plaque	I4675Q726								
N° lot eau ppi	4401542 expire le 7/2017								
CT AFU PUIITS 1	30,1	35,5	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet
CT AFU PUIITS 2	29,9	34,4	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet
CT AFU PUIITS 3	29,6	35	undet						
CT AFU PUIITS 4	29,9	34,9	undet						
CT AFU PUIITS 5	29,6	34,9	undet						
CT AFU PUIITS 6	29,9	35,4	undet						
CT IPC PUIITS 1	30,1	29,4	29,8	30	29,8	29,5	29,7	29,7	29,5
CT IPC PUIITS 2	29,9	29,3	29,7	30	30,1	29,6	29,7	29,7	29,4
CT IPC PUIITS 3	29,5	29,3	29,9						
CT IPC PUIITS 4	29,9	29,3	29,7						
CT IPC PUIITS 5	29,6	29,3	29,8						
CT IPC PUIITS 6	29,9	29,1	30,1						

Undet : négatif

Annexe 14 : PCR Aspergillus : résultats de la fidélité intermédiaire et variation inter opérateur

Date amplification	Opérateur	N°lot Master MIX	N°lot IPC Mix	N°lot IPC ADN	N° lot sonde A	N° lot amore R	N° lot amore F	N° lot plaque	N° lot eau ppi	CT pt 7	CT pt 7	CT pt 8	CT pt 8	CT pt 9	CT pt 9	CT pt 10	CT pt 10	CT p t11	CT pt11
23/12/2015	CB									23,6	23,7	25,5	27	30,9	31	34	33,9	40,9	40,9
28/12/2015	MPA	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,2	23,6	27	26,3	30,9	30,3	33,9	33	38,2	37,7
30/12/2015	CQ	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,2	23	26,7	26,6	30,8	30	33,4	34,1	38,9	36,6
31/12/2015	CQ	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,2	23,2	26,3	26,7	29,8	29,4	32,4	32,6	35,5	34
04/01/2016	BR	1508201	1506100	1505096	17	17	17			22,9	23,4	26,7	26,5	31	30,8	33,6	32,5	38,3	41
06/01/2016	GLD	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,2	23,2	26,6	24,4	30,8	30,6	33,5	33	36,4	37,9
07/01/2016	BR	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,6	23,3	25,9	26,8	30,5	30,4	32,6	32,6	34,2	35,5
11/01/2016	BR	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,6	23,2	26,1	26,3	30	30	32,1	31,7	35,2	34,6
13/01/2016	BR	1508201	1506100	1505096	17	17	17			24,1	23,9	26,5	26,4	30,2		32,4	32,6	34,9	
14/01/2016	GLD	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,4	22,9	25,4	26	29,7	29	32,2		34,4	35,2
18/01/2016	BR	1508201	1506100	1505096	17	17	17			23,5	23,4	26,7	26,5	30,2		32,2	32,1	36,8	
20/01/2016	GLD	1508201	1506100	1505096	17/16	17/16	17/16			22,7	23,1	26,6	26,3	29,5	29,7	31,8	31,9		33,9
21/01/2016	BR	1508201	1506100	1505096	16	16	16			23,5	23,6	27	27,3	29,9	30,4	32,7	33,2	38,6	35,6
25/01/2016	GLD	1508201	1506100	1505096	16/17	16/17	16/17			23	23	26,1	26,3	29		32,1		35,4	36,9
28/01/2016	GLD	1508201	1507101	1507097	17	17	17			23	22,9	26,5	26,3	29,2	29,6	31,8	31,6	34,1	33
29/01/2016	BR	1508202	157101	1507097	17	17	17			23	22,9	26,8	26,3	30,1	29,9	32,6	32,5	36	34,3
01/02/2016	SG	1508202	157101	1507097	17	17	17			22,7	23	24,7	25,4	29,9	29,6	31,8	32,5	34,4	35,5
04/02/2016	GLD	1508202	157101	1507097	17	17	17			22,4	23,5	26,7	26,8	30,3	29,9		32,1	33,9	35,1
08/02/2016	SG	1508202	157101	1507097	17	17	17			22,6	23	26,7	26,9	29,8	30,1	31,9	32,2	34,9	34,2
10/02/2016	BR	1508202	157101	1507097	17	17	17			22,8	22,9	26,9	26,9	30	29,4	32,6	32,3	34,7	35,4
15/02/2016	GLD	1508202	157101	1507097	18	18	18			22,7	22,5	26,2	27	29,5	29,4	32,2	32,6	35,4	34,7
18/02/2016		1508202	157101	1507097	18	18	18			23	22,9	27	26,8	29,3	29,2	32,2	32	33,6	38,3
22/02/2016	IJ	1508202	157101	1507097	18	18	18			22,4	23	26,4	26,9	29	28,7	30,7	31,1	31,6	31,6
24/02/2016	SG	1508202	157101	1507097	18	18	18			22,9	23	27,1	27,1	29,4	29,1	32,9	32,7	34,6	34,7
25/02/2016	IJ	1508202	157101	1507097	18	18	18			22,7	23	27	27	28,4		32,1	31,8	32,9	33,2
29/02/2016	SG	1510203	157101	1507097	18	18	18			22,7	22,8	25,4	26,4	29,1	29	32,4	32,3	34,7	35,9
02/03/2016	BR	1510203	157101	1507097	18	18	18			22,9	23,6	26,7	26,7	29,9	29,7	32,2	31,8	34,7	35,4
03/03/2016	CB	1510203	157101	1507097	18	18	18			23,2	23,1	26,2	26,6	29,8	29,8	32	32,2	35,7	35,7
07/03/2016	CB	1510203	157101	1507097	18	18	18			22,6	22,9	26,6	26,4	29,4	29,1	31,6	31,8	33,2	33,2
09/03/2016	SG	1510203	157101	1507097	18	18	18			22,7	23,3	26,3	26,7	29,2	29,6	31,7	32,2	34,3	33,4
11/03/2016	IJ	1510203	157101	1507097	18	18	18			23	23,1	26,6	27	29,8	29,5	32,1	32,6	33,9	32,5
14/03/2016	GLD	1510203	157101	1507097	18	18	18			23,3	23,1	27,4	27,3	30,1	30	32,3	32,7	34,9	34,4
17/03/2016	MPA	1510203	157101	1507097	18	18	18			23,1	23,5	27,5	27,3	30	29,8	32,2	32,3	34,4	35,2
21/03/2016	BR	1510203	157101	1507097	18	18	18	I4265Q712	4401542	23,2	23,3	26,9	27	30,3	30,2	32,2	32,7	35,9	35,5
22/03/2016	SG	1510203	157101	1507097	18	18	18	I4265Q712	4401542	23,1	23,3	27,4	27,3	29,9	30	32,4	32,6	34,2	35,5
24/03/2016	CB	1510203	157101	1507097	18	18	18	I4265Q712	4401542	23,3	23,5	27,5	27,2	30,3	30,1	32,7	32,5	35,8	35,6

Annexe 15 : PCR Toxoplasmose : Répétabilité/contamination inter échantillon/Spécificité

EXTRAITS	E1	E2	E3	PALU	PJ	AFU	AMIBES	LEISH	CRUZI
N° sérothèque primaire	17/83	19/43	228/87	225/4	214/96	218/99	203/91	206/86	BM CRUZI 1/64
N° sérothèque secondaire	BM EX 9/89	BM-20 0001 72		BM-20 0002 88	BM-20 0002 32	BM-20 0001 18	BM-20 0001 48	BM-20/0001/48	03/10/2013,
date d'extraction	?	18/02/2016	19/05/2016	02/05/2016	14/03/2016	20/05/2016	20/05/2016	28/01/2016	03/10/2013,
opérateur	?	GLD	IJ	IJ	BR	IJ	IJ	GLD	GLD
N° lot KIT extraction	?	151052614	1540175598	154013337	151052614	154017598	154017598	151049141	?
dilution									1/10
date d'amplification	24.05.2016								
opérateur	IJ								
N° lot master MIX	1512206 expire le 22.01.2017								
N° lot IPC mix	1507101								
N° lot IPC ADN	1505096								
N° LOT sonde TOXO	20								
N° lot amorce TOXO F	20								
N° lot amorce TOXO R	20								
N° lot plaque	I4675Q726								
N° lot eau ppi	4401542 expire 7/2017								
CT TOXO PUIITS 1	27,9	35,3	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet
CT TOXO PUIITS 2	28	35,4	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet
CT TOXO PUIITS 3	28,1	35	undet						
CT TOXO PUIITS 4	28	35,2	undet						
CT TOXO PUIITS 5	27,9	35,2	undet						
CT TOXO PUIITS 6	27,9	36	undet						
CT IPC PUIITS 1	32,1	29,8	29,7	30,4	30,3	30	29,9	30,3	29,9
CT IPC PUIITS 2	31,4	30,1	29,6	30,1	30,1	29,7	29,9	29,7	29,4
CT IPC PUIITS 3	30,6	29,9	29,8						
CT IPC PUIITS 4	31,1	29,9	29,6						
CT IPC PUIITS 5	30,9	29,7	29,6						
CT IPC PUIITS 6	31,3	29,9	29,6						

Undet : négatif

Annexe 16 : PCR Toxoplasmose : résultats de la fidélité intermédiaire/variation inter opérateur

Date amplification	Opérateur	N°lot Master MIX	N°lot IPC Mix	N°lot IPC ADN	N°lot sonde Toxo	N° lot amorce F	N° lot amorce R	N° lot plaque	N° lot eau ppi	CT puits 1	CT puits 2
21/12/2015	BR	1508201	1506100	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,3	31,7
22/12/2015	CB	1508201	1506100	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			30,3	30,7
29/12/2015	MPA	1508201	1506100	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			30,7	30,9
30/12/2015	CQ	1508201	1506100	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,5	30,6
31/12/2015 P+T	BR	1508201	1506100	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			32,2	31,9
05/01/2016	GLD	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,9	31,3
08/01/2016 T+A	BR	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,7	31,6
08/01/2016 T+L	BR	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,4	32
12/01/2016	GLD	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,8	31,4
15/01/2016	IJ	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,9	32,3
15/01/2016 T+PJ	IJ	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,9	31,9
19/01/2016	GLD	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			32	31,5
21/01/2016	GLD	1508201	1506099	1505096	lot 18	lot 18	lot 18			31,7	31,9
22/01/2016 T+A	BR	1508201	1506099	1505096	lot 19	lot 19	lot 19			32,1	31,8
26/01/2016	BR	1508201	1506099	1505096	lot 19	lot 19	lot 19			32,6	32,8
29/01/2016	GLD	1508201	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,2	31,2
02/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			31,7	31,6
04/02/2016	SG	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			31,5	31,7
05/02/2016	IJ	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,2	32,6
09/02/2016 T+A	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,6	31,6
09/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,2	32,5
12/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			31,7	32,5
16/02/2016	MPA	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,8	32
16/02/2016 T+L	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,3	33,5
18/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,4	32,5
22/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			31,7	32,4
23/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			33,5	33,3
25/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			31,7	32,3
26/02/2016	GLD	1508202	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,6	32,6
01/03/2016	CB	1510203	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,9	32,6
04/03/2016	CB	1510203	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32	31,4
08/03/2016	MPA	1510203	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			33	32,4
10/03/2016	CB	1510203	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,5	32,6
11/03/2016 T+PJ	BR	1510203	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32	32,1
15/03/2016		1510203	1507101	1507097	lot 19	lot 19	lot 19			32,7	32,2

Annexe 17 : PCR Aspergillus : résultats de la robustesse (test de variation des températures)

extrait				AFU 1
N° sérothèque primaire				218/99
N° sérothèque secondaire				BM-20/0002/60
date de l'extraction				20/05/16
opérateur				IJ
lot Kit d'extraction				154017598
Répétabilité	date de l'amplification	24.05.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	30,1
	lot master mix	1512206	CT puits 2	29,9
	lot IPC mix	1507101	CT puits 3	29,6
	lot IPC DNA	1505096	CT puits 4	29,9
	lot sonde	20	CT puits 5	29,6
	lot amorce F	20	CT puits 6	29,9
	lot amorce R	20	moyenne	29,8
	lot plaque	I4675Q726		
	lot eau ppi	4401542		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µL 95°C 3" et 60°C 30"		
Test 1	date de l'amplification	09.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	29,7
	lot master mix	1603208	CT puits 2	29,7
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	29,8
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,7
	lot sonde	22		
	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 96°C 3" et 60°C 30"		
Test 2	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	29,7
	lot master mix	1603208	CT puits 2	29,8
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	29,7
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,7

	lot sonde	22		
	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 95°C 3"et 61°C 30"		
test 3	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	29,6
	lot master mix	1603208	CT puits 2	29,7
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	29,7
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,7
	lot sonde	22		
	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 96°C 3"et 61°C 30"		
Test 4	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	29,8
	lot master mix	1603208	CT puits 2	30
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	30
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,9
	lot sonde	22		
	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 94°C 3"et 60°C 30"		
Test 5	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	29,7
	lot master mix	1603208	CT puits 2	29,8
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	29,9
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,8
	lot sonde	22		

	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 95°C 3"et 59°C 30"		
Test 6	date de l'amplification	11.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	29,7
	lot master mix	1603208	CT puits 2	29,8
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	29,6
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,7
	lot sonde	22		
	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 94°C 3"et 59°C 30"		

Annexe 18 : PCR Toxoplasmose : résultats de la robustesse (test de variation des températures)

extrait			Toxo 1	toxos 2
N° sérothèque primaire			17/83	19/43
N° sérothèque secondaire			BM EX 9/89	BM-20 0001 72
date de l'extraction			?	18/02/2016
opérateur			?	GLD
lot Kit d'extraction			?	151052614
Répétabilité	date de l'amplification	24.05.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	27,9 35,3
	lot master mix	1512206 expire le 22.01.2017	CT puits 2	28 35,4
	lot IPC mix	1507101	CT puits 3	28,1 35
	lot IPC DNA	1505096	CT puits 4	28 35,2
	lot sonde	20	CT puits 5	27,9 35,2
	lot amorce F	20	CT puits 6	27,9 36
	lot amorce R	20	moyenne	28,0 35,4
	lot plaque	I4675Q726		
	lot eau ppi	4401542 expire 7/2017		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µL 95°C 3" et 60°C 30"		
Test 1	date de l'amplification	09.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	27,9 35,5
	lot master mix	1603208	CT puits 2	28 35,6
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	28 35,1
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	28,0 35,4
	lot sonde	22		
	lot amorce F	22		
	lot amorce R	22		
	lot plaque	I1166Q717		
	lot eau ppi	1507226		
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 96°C 3" et 60°C 30"		
Test 2	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats	
	opérateur	IJ	CT puits 1	28,1 35
	lot master mix	1603208	CT puits 2	28 35,8

	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	27,9	35,2
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	28,0	35,3
	lot sonde	22			
	lot amorce F	22			
	lot amorce R	22			
	lot plaque	I1166Q717			
	lot eau ppi	1507226			
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 95°C 3"et 61°C 30"			
Test 3	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats		
	opérateur	IJ	CT puits 1	28	36,2
	lot master mix	1603208	CT puits 2	28,2	35,6
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	27,9	35,2
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	28,0	35,7
	lot sonde	22			
	lot amorce F	22			
	lot amorce R	22			
	lot plaque	I1166Q717			
	lot eau ppi	1507226			
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 96°C 3"et 61°C 30"			
Test 4	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats		
	opérateur	IJ	CT puits 1	30,2	35,4
	lot master mix	1603208	CT puits 2	29,8	34,8
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	29,7	35,5
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	29,9	35,2
	lot sonde	22			
	lot amorce F	22			
	lot amorce R	22			
	lot plaque	I1166Q717			
	lot eau ppi	1507226			
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 94°C 3"et 60°C 30"			
Test 5	date de l'amplification	10.08.2016	Résultats		
	opérateur	IJ	CT puits 1	28,2	35,1
	lot master mix	1603208	CT puits 2	28,4	35,8
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	28	35,3
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	28,2	35,4
	lot sonde	22			
	lot amorce F	22			
	lot amorce R	22			
	lot plaque	I1166Q717			

	lot eau ppi	1507226			
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 95°C 3"et 59°C 30"			
Test 6	date de l'amplification	11.08.2016	Résultats		
	opérateur	IJ	CT puits 1	28	35,4
	lot master mix	1603208	CT puits 2	28,5	35,4
	lot IPC mix	1601104	CT puits 3	28,7	35,3
	lot IPC DNA	1510098	moyenne	28,4	35,4
	lot sonde	22			
	lot amorce F	22			
	lot amorce R	22			
	lot plaque	I1166Q717			
	lot eau ppi	1507226			
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µl 94°C 3"et 59°C 30"			

Annexe 19 : Résultats de la robustesse (test de variation de la prise d'essai d'ADN)

extrait					Vivax 1	Vivax 2
N° sérothèque primaire					130/67	130/67 au 1/100
N° sérothèque secondaire					BM EX 6/22	BM EX 6/22
date de l'extraction					27/05/2016	27/05/2016
opérateur					IJ	IJ
lot Kit d'extraction					154013337	154013337
Répétabilité	date de l'amplification	27/05/2016	Résultats	CT puits 1	25,8	32,4
	opérateur	IJ		CT puits 2	25,6	32,5
	lot master mix	1512206		CT puits 3	25,7	32,5
	lot IPC mix	15071101		CT puits 4	25,7	32,7
	lot IPC DNA	1505096		CT puits 5	25,6	32,4
	lot sonde	4		CT puits 6	25,5	32,6
	lot amorce F	5		moyenne	25,7	32,5
	lot amorce R	5				
	lot plaque	I4675Q726				
	lot eau ppi	4401542				
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µL 95°C 3" et 60°C 30"				
Test variation prise d'essai	date de l'amplification	19/08/2016	Résultats 2,5µl	CT puits 1	26,7	33,6
	opérateur	IJ		CT puits 2	26,8	33,6
	lot master mix	1603208		CT puits 3	26,6	33,6
	lot IPC mix	1601104				
	lot IPC DNA	1510098	Résultats 3,5µl	CT puits 1	26,1	32,7
	lot sonde	4		CT puits 2	26,1	32,9
	lot amorce F	6		CT puits 3	26,1	32,9
	lot amorce R	6				
	lot plaque	I1166Q717	Résultats 5 µl	CT puits 1	25,5	32,5
	lot eau ppi	1507226		CT puits 2	25,5	32,4
	programme d'amplification	45 cycles volume 25µL 95°C 3" et 60°C 30"		CT puits 3	25,5	32,5
			Résultats 6,5 µl	CT puits 1	25,1	31,8
				CT puits 2	25,2	32,4
				CT puits 3	25,2	32,4
			Résultats 7,5µl	CT puits 1	24,8	31,8
				CT puits 2	24,9	31,8
				CT puits 3	25	32,1

Résumé

Dans le cadre de l'accréditation du service selon la norme ISO 15189 et afin d'atteindre le quota d'examen exigé par le COFRAC, 2 méthodes d'extractions en portée A ont été vérifiées et 2 méthodes d'amplification par PCR en portée B ont été validées selon les critères du SH FORM 43.

Ce mémoire décrit de manière détaillée les différentes étapes nécessaires à la validation/vérification des méthodes choisies : le choix de la portée, du type de processus et des paramètres à évaluer ainsi que la maîtrise des risques, les résultats et l'interprétation de l'évaluation des performances.