

VERIFICATION/VALIDATION DE MÉTHODES EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Joly Isabelle

Technicienne de laboratoire médical
Service de Parasitologie – Mycologie
Pôle de biologie médicale et pathologie
Groupe Hospitalier Pitié - Salpêtrière Charles Foix

Université Pierre et Marie Curie-
Sorbonne Universités

DU Assurance Qualité au LBM

Session 2015-2016

Le laboratoire de Parasitologie et Mycologie

- Pôle de biologie médicale et pathologie du GHU PSL – CFX
- Différents secteurs d'activité (sérologie, direct, Biologie Moléculaire)
- 16 techniciens(15,6 ETP) et 6 Biologistes(MCU-PH et PH)
- Activité 2015 : 75118 actes dont 7518 pour le secteur de biologie moléculaire (9%) correspondant à 7 973 595 (B + BHN).
- Accrédité depuis le 1er novembre 2015
 - ✓ Sous famille sérologie infectieuse :
 - ✓ sérologie toxoplasmose IgG et IgM (Elisa, IFI, agglutination)
 - ✓ Sous famille Parasitologie Mycologie :
 - ✓ recherche de Plasmodium sur frottis mince et goutte épaisse.

Objectifs et étapes du projet

Objectif 1 :

Constitution de deux dossiers de vérification/validation de méthode de PCR selon la norme ISO 15189

Objectif 2 :

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

Etapes prévues :

- Choix des méthodes à vérifier /valider
- Choix du processus et de la portée
- Maitrise des risques pour les deux méthodes
- Revue des documents associés.
- Détermination des paramètres à évaluer
- 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

Choix des méthodes à vérifier /valider

Stratégie :

- Satisfaire au quota de 50% du nombres d'actes accrédités en 2017
- Choisir les PCR les plus réalisées dans le service pour chaque ligne de portée : PM6 (ADN parasitaire) et PM8 (ADN fongique)
- Aborder les aspects et les problématiques de la majorité des méthodes réalisées dans le secteur Biologie Moléculaire (BM)
 - méthodes d'extraction manuelle et automatisée
 - méthodes de PCR quantitative et qualitative



PCR *Toxoplasma gondii*

PCR *Aspergillus fumigatus*

Choix du processus et de la portée

Processus complexe comprenant deux sous processus :

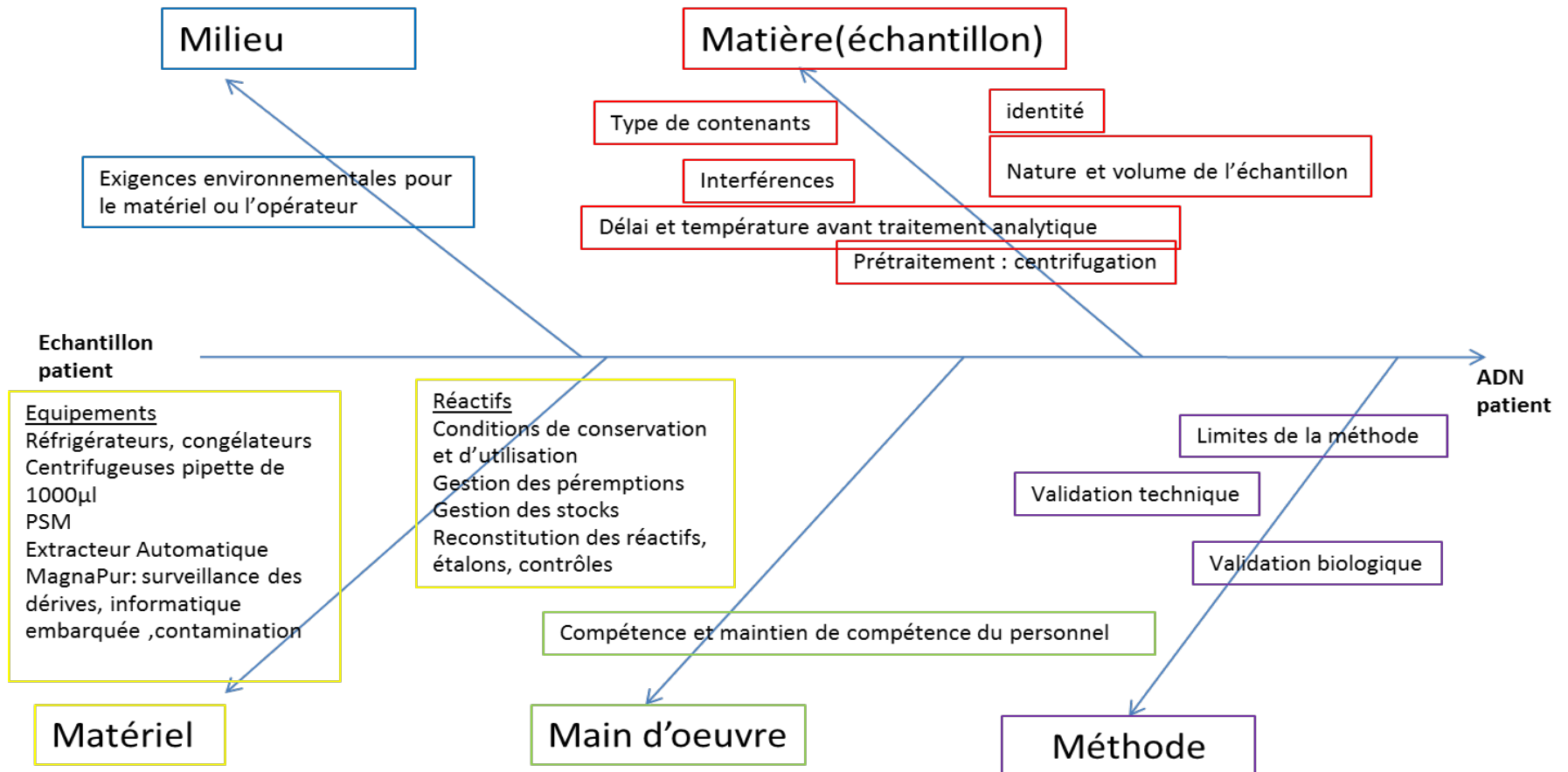
✓ **Un 1^{er} sous processus « Extraction »**

- ✓ Méthode et non prétraitement car impact ++ sur le résultat final.
- ✓ DM-DIV commercialisés, marquage CE ➡ Portée A

✓ **Un 2^{ème} sous processus « Amplification »**

- ✓ PCR en temps réel « maison » ➡ Portée B
- ✓ Technologie Taqman sur automate 7500 Fast System Real Time (Applied BioSystems).
- ✓ Nombreux articles publiés mais certains paramètres non testés.

Maîtrise des risques: 5M diagramme d'Ishikawa (exemple sous processus extraction automatisée)



MAITRISE DES RISQUES

SM	Points critiques	C ¹	Éléments à maîtriser	Moyens de maitrise
Matière (échantillons)	Identité		Formation et information du personnel	Catalogue des examens Instructions de prélèvement dans le manuel de prélèvement
	Type de contenants		Tube sec	Catalogue des examens Vérification à la réception PXM-MO-006
	Nature et volume de l'échantillon		Minimum 1 ml avec une tolérance pour les enfants	
	Délai et température avant traitement analytique		Délai d'acheminement < 48h à température ambiante Délai avant extraction <72 h entre 2 et 8°C	Traitement des non conformités d'échantillons à réception PXM-MO-011 Habilitation au pré analytique PXM-EN-006
	Prétraitement : Centrifugation non critique Aliquotage manuel		identification des aliquots	La centrifugation n'est pas une étape critique, l'objectif étant d'obtenir du sérum (vérification visuelle), néanmoins, les conditions de centrifugation préconisées par BD sont respectées et les maintenances des centrifugeuses réalisées Code à barres avec identité patient sur chaque prélèvement et vérification à la paillasse de la concordance par le technicien et habilité à cette tâche
	Interférences		Mise en évidence de la présence d'inhibiteurs	Utilisation d'un témoin inhibition lors de l'amplification
	Conditions de conservation des échantillons au laboratoire avant analyse		Délai avant extraction <72 h entre 2 et 8°C L'aliquot du tube primaire à min à 20°C pendant min 1 an	Métrie suivi des enceintes thermostatées par des enregistrements métrologiques (sirius)
	Conditions de conservation des échantillons au laboratoire après analyse		Après extraction l'éluat est conservé min -20°C pendant min 1 an	Formation du personnel à la gestion des alarmes sirius PXM-EN-043

Revue des documents associés

Etape 1 : Etat des lieux documentaire

- manque de traçabilité et d'enregistrement
- manque de formalisation et de mise à jour de procédures, de modes opératoires et d'instructions de travail.

Etape 2 : Correction de la situation

- Mise à jour des documents (5 modes opératoires, 2 Instructions de travail)
- Mise en place de la traçabilité des techniques et réactifs (8 enregistrements)

Détermination des paramètres à évaluer (1)

1) Extraction ADN portée A

- Répétabilité
- Contamination inter échantillons
- Fidélité intermédiaire /variabilité inter opérateurs

Moyen utilisé : ADN Albumine humaine (PCR Albumine)

- Quantité d'échantillon positif nécessaire très importante
- Témoin d'extraction dans la pratique quotidienne

Paramètres évalués	Extraction manuelle Qia Amp DNA Blood mini (Qiagen)		Extraction automatisé MagnaPur Compact (Roche)	
	Mise en œuvre	Résultats/conclusion	Mise en œuvre	Résultats
Répétabilité	<ul style="list-style-type: none"> • Test simultané des 2 paramètres • 10 extractions d'un même échantillon de sang EDTA et 10 extractions d'eau ppi en alternance dans une même série par un même opérateur 	Calcul de la moyenne(M), écart type(ET) et coefficient de Variation(CV) <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % <p style="text-align: center;"><u>Conforme</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Extraction d'un même échantillon de sérum 8 fois par un même opérateur dans une même série. • PCR Albumine 	Calcul de la moyenne(M), écart type(ET) et coefficient de Variation(CV) <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % <p style="text-align: center;"><u>Conforme</u></p>
Contamination inter échantillons	<ul style="list-style-type: none"> • PCR Albumine 	Pas de contamination inter échantillons détectée lors du test <p style="text-align: center;"><u>Conforme</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Extraction 4 fois d'un échantillon positif et extraction 4 fois d'eau échantillon négatif (eppi) en alternance dans une même série. • PCR Albumine 	Pas de contamination inter échantillons détectée lors du test <p style="text-align: center;"><u>Conforme</u></p>
Fidélité intermédiaire Variabilité inter opérateurs	<ul style="list-style-type: none"> • 30 extractions d'un même échantillon de sang EDTA (aliquoté préalablement et conservé à -20°C) à des jours ` par des opérateurs` 	Calcul de la moyenne(M), écart type(ET) et coefficient de Variation(CV) <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % <p style="text-align: center;"><u>Conforme</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • 10 extractions d'un même échantillon de sérum (aliquoté préalablement et conservé à -20°C) à des jours ` par des opérateurs` 	Calcul de la moyenne(M), écart type(ET) et coefficient de Variation(CV) <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % <p style="text-align: center;"><u>Conforme</u></p>

Détermination des paramètres à évaluer (2)

2) Amplification ADN portée B

- Répétabilité
- Contamination inter échantillons
- Spécificité
- Fidélité intermédiaire
- Variabilité inter opérateurs
- Robustesse
- Stabilité des réactifs
- Sensibilité
- Exactitude
- Interférences
- Comparaison de méthodes

Paramètres testés	PCR Toxoplasmosse		PCR Aspergillus	
	Mise en œuvre	Résultats et conclusion	Mise en œuvre	Résultats et conclusion
Répétabilité	<p>sélection des extraits :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 extraits positifs E1 et E2 (2 niveaux différents) • 1 extrait négatif E3 <p>Amplification par PCR Toxoplasmosse de E1, E2 et E3 passage 6 fois</p>	<p>Calcul de la moyenne(M), écart type(ET) et coefficient de Variation(CV)</p> <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % <p><u>Conforme</u></p>	<p>sélection des extraits :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 extraits positifs E1 et E2 (2 niveaux différents) • 1 extrait négatif E3 <p>Amplification par PCR Toxoplasmosse de E1, E2 et E3 passage 6 fois</p>	<p>Calcul de la moyenne(M), écart type(ET) et coefficient de Variation(CV)</p> <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % <p><u>Conforme</u></p>
Contamination inter échantillons	Alternance des positions des extraits positifs et négatifs dans la plaque	Pas de contamination détectée	Alternance des positions des extraits positifs et négatifs dans la plaque	Pas de contamination détectée
Spécificité	Amplification par PCR Toxoplasmosse d'extraits positifs pour des cibles autres que Toxoplasmosse (paludisme, amibes, leishmanie,,)	Résultats négatifs pour les cibles autres que toxoplasmosse	Amplification par PCR Aspergillus d'extraits positifs pour des cibles autres que Aspergillus (pneumocystose, paludisme, amibes, leishmanie,,)	Résultats négatifs pour les cibles autres que Aspergillus
Fidélité intermédiaire	Etude rétrospective des valeurs du CIQ (fidélité intermédiaire)	Calcul de M,ET ,CV <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 % 	Etude rétrospective des valeurs des points de la gamme(fidélité intermédiaire)	Calcul de M,ET ,CV <ul style="list-style-type: none"> • CV limite retenu d 5 % • CV obtenu <5 %
Variabilité inter opérateurs	Opérateur tracé pour chaque run (variabilité inter opérateur)	<u>Conforme</u>	Opérateur tracé pour chaque run (variabilité inter opérateur)	<u>Conforme</u>
Robustesse	Variation de la prise d'essai d'ADN +/- 30 et 50% TP dénaturation/ hybridation +/- 1°C (6 programmes `)	Pas de variation significative	Variation de la prise d'essai d'ADN +/- 30 et 50% TP dénaturation/ hybridation +/- 1°C (6 programmes `)	Pas de variation significative

Paramètres testés	PCR Toxoplasmose		PCR Aspergillus	
Stabilité des réactifs	Définition du niveau de la fluorescence de base de la sonde Suivi par le CIQ Traçabilité de réception reconstitution et dilution de la sonde	Détermination des périodes de conservation et stabilité - Avant ouverture 1 an - Après reconstitution /dilution à -20° C 8 mois à 4° C 1 mois .	Définition du niveau de la fluorescence de base de la sonde Suivi par le CIQ	Détermination des périodes de conservation et stabilité - Avant ouverture 1 an - Après reconstitution : dilution à -20° C 8mois à 4° C 1 mois
Sensibilité	Bibliographie (articles publiés)	0,1 T/ml	Bibliographie (articles publiés)	11 copies/ml
Exactitude	EEQ	CNR TOXOPLASMOSE Résultats de toutes les enquêtes conformes	Absence EEQ et pas de programme de comparaison inter laboratoire mis en place	
Interférences	Utilisation d'un contrôle interne (IPC) pour mettre en évidence une possible inhibition	Si inhibition dilution au 1/10 ou au 1/100 des extraits	idem	Idem
Comparaison de méthodes	Bibliographie (articles publiés)	Pas de méthode antérieure ou a venir	Bibliographie (articles publiés)	Pas de méthode antérieure ou a venir

Conclusion

- facteurs limitant :
 - Rareté des échantillons positifs
 - Coût des réactifs
 - Temps alloué

- Objectif 2 non finalisé (aide à la validation d'une méthode de biologie moléculaire) par manque de temps :
 - Evaluation des performances de 4 méthodes dont 2 en portée B
 - Mise en place de la traçabilité,
 - Recueil des données antérieures
 - Formalisation des DVM
 - En parallèle de mon travail de routine

- Méthodes déclarées conformes aux performances et exigences du service.

- Application du SMQ dans le secteur de BM

- Les méthodes seront auditées par le COFRAC à leur prochaine visite



Merci à tous pour votre attention !