

Université Pierre et Marie Curie
Sorbonne Universités

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

**VALIDATION D'UNE METHODE QUANTITATIVE
DE PORTEE B**

**DOSAGE DE L'ALDOSTERONE EN CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE COUPLÉE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE**

Tarek CHAABOUNI

2018

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

Tarek CHAABOUNI

Pharmacien Biologiste

U.F de BIOCHIMIE

Pôle BioPhaRe

Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine

Hôpital BICHAT-CLAUDE BERNARD

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Nathalie Seta pour m'avoir donné l'opportunité de suivre la formation du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale ».

Je remercie vivement la technicienne du secteur spectrométrie de masse Anne Barnier qui a participé activement à ce travail.

Je remercie aussi Arnaud Bruneel le biologiste coresponsable du secteur spectrométrie de masse pour ses avis et conseils.

Enfin et surtout, un grand merci à tous les techniciens du laboratoire et à mes collègues biologistes.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	1
INTRODUCTION	2
1. Présentation de la structure	3
1.1. Présentation du groupe hospitalier HUPNVS.....	3
1.2. Présentation des laboratoires des HUPNVS.....	4
1.3. Présentation de l'UF de Biochimie du site BCH	4
1.4. Management de la qualité au niveau du GH	5
1.4.1. Politique qualité du Laboratoire	5
1.4.2. Accréditation en 2018.....	6
2. Validation d'une méthode quantitative de portée B	6
2.1. Information normative	6
2.2. Justification du choix de la portée.....	7
3. Méthodologie	7
3.1. Contexte de la méthode	7
3.1.1. Intérêt clinique	7
3.1.2. Recommandations préanalytiques	8
3.1.3. Matériel.....	9
3.1.4. Méthode de dosage.....	9
3.2. Protocole de validation de méthode	11
3.2.1 Maîtrise des risques	11
3.2.2 Evaluation de la performance et choix des critères d'acceptabilité	12
4. Analyse des résultats et interprétation	12
4.1. Maîtrise des risques	12
4.2. Evaluation expérimentale des critères de performance	20
4.2.1. Evaluation de la fidélité	20
4.2.1.1. Répétabilité	20
4.2.1.2. Fidélité intermédiaire	21
4.2.2 Variabilité inter-opérateurs.....	21
4.2.3. Justesse.....	21
4.2.4. Exactitude	21
4.2.5. Estimation de l'incertitude de mesure	22
4.2.6. Etendue de mesure	24
4.2.7. Comparaison de méthodes.....	24
4.2.8. Interférences.....	26
4.2.9. Contamination.....	26
4.2.10. Robustesse et stabilité	27
4.2.11. Intervalle de référence.....	27
CONCLUSION	27
BIBLIOGRAPHIE	28
ANNEXES	29

GLOSSAIRE

ACEBM: Accueil central des examens de biologie médicale
ACN: Acétonitrile
AGEPS : Agence Générale des Equipements et Produits de Santé
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APHP : Assistance publique Hôpitaux de Paris
BJN : Beaujon
BCH : Bichat
CDT : Carbohydate Deficient Transferrin
CIQ : Contrôle Interne de Qualité
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CV : Coefficient de Variation
DMDIV : Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro
DPC : développement professionnel continu
DU : Diplôme Universitaire
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
ET : Ecart-Type
FAQ : Fiche d'amélioration de la qualité
GH : Groupe Hospitalier
GTA : Guide Technique d'Accréditation
HEGP : Hôpital Européen Georges Pompidou
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
HUPNVS : Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine
ISO : International Organization for Standardization (organisation internationale de normalisation)
LBM : Laboratoire de Biologie Médicale
LC : Chromatographie liquide
LME : Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement
LMR : Louis Mourier
MPL : Manager Production Laboratory (Middleware de Roche)
MS : Spectrométrie de masse
MW : Middleware
ProBioQual : Association pour la Promotion du Contrôle de Qualité en Biologie Médicale
RAQ : Responsable Assurance Qualité
SAV : Service Après-Vente
SMQ : Système de Management de la Qualité
SIL : Système informatique du laboratoire
UF : Unité Fonctionnelle

INTRODUCTION

Selon les exigences réglementaires de l'ordonnance du 13 janvier 2010, la biologie médicale est inscrite dans une démarche qualité. Dans ce contexte, les laboratoires de biologie médicale doivent répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189.2012 afin d'obtenir une accréditation délivrée par un organisme indépendant, le COFRAC.

Dans le cadre de cette démarche qualité, le laboratoire met en œuvre de nombreuses méthodes d'analyse dont les caractéristiques essentielles doivent être connues. Il appartient au biologiste d'acquérir ces connaissances par la bibliographie. Ce travail d'expertise est la base du métier de biologiste médical et doit se faire avant le choix d'une méthode. Le biologiste vérifie ou valide ensuite que la mise en application de la méthode dans son environnement ne modifie pas ses caractéristiques par rapport à des limites qu'il s'est fixé pour répondre aux besoins des prescripteurs et des patients et donner des résultats sûrs et fiables pour les patients.

La vérification/validation d'une technique consiste à évaluer les performances du processus analytique (fidélité, justesse, exactitude, domaine de mesure, sensibilité aux interférences, limite de détection s'il y a lieu), à les quantifier en suivant un protocole opératoire standardisé puis à les juger, par rapport à des critères définis.

La validation préalable à l'utilisation d'une méthode d'analyse fait l'objet d'une exigence de la norme NF EN ISO 15189 (chapitre 5.5.2) « *pour s'assurer qu'elle convient à l'utilisation prévue* » [1].

Deux cas peuvent être facilement distingués :

- le cas où les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) utilisés dans les LBM ont fait l'objet d'un marquage CE garantissant leur conformité aux exigences de la directive européenne 98/79 CE [2].

L'une des exigences de la directive porte sur la vérification des performances annoncées. L'utilisation de tels dispositifs par les LBM apporte donc la garantie que les performances annoncées dans la documentation produite par le fournisseur résultent d'essais préalables. Les résultats de ces évaluations peuvent être réclamés aux fournisseurs par les autorités compétentes en cas d'anomalie constatée. Dans ce cas, l'évaluation au laboratoire se limitera à vérifier que les performances annoncées sont satisfaites dans les conditions réelles d'utilisation ;

- les cas suivants : il n'existe pas de DMDIV ou ils ne sont pas applicables dans le laboratoire où il a été procédé à une modification critique des conditions d'utilisation. Il s'agit alors d'une méthode développée par le laboratoire qui nécessitera une validation des performances plus approfondie.

L'APHP a doté l'ensemble de ses laboratoires d'un logiciel de management de la qualité : Kalilab (société Netika). Ce logiciel permet via différents modules de gérer les documents la qualité, le personnel, les équipements, les projets qualité, la déclaration, le suivi des non-conformités et la validation des méthodes.

Dans le cadre de mon DU « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale », j'ai été missionnée pour assurer la validation d'une méthode quantitative qui consiste à doser l'aldostérone plasmatique en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

1. Présentation de la structure

1.1. Présentation du groupe hospitalier HUPNVS

Le groupe des Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine HUPNVS, constitué le 1er janvier 2011, regroupe cinq hôpitaux avec une orientation médicale, chirurgicale et obstétricale pour trois d'entre eux (Beaujon, Bichat-Claude-Bernard et Louis-Mourier) et gériatrique pour les deux autres (Adélaïde- Hautval et Bretonneau).



Beaujon (BJN)
92110 Clichy



Bichat-Claude Bernard (BCH)
75018 Paris



Louis Mourier (LMR)
92700 Colombes



Bretonneau
75018 Paris



Adélaïde Hautval
95400 Villiers-le-Bel

Les hôpitaux du GH HUPNVS sont reconnus pour leurs activités de référence telles que : la cardiologie médicale et chirurgicale, les transplantations d'organes, les maladies

digestives, l'infectiologie mais également pour être un des plus grands SAU (Service d'Accueil et de traitement des Urgences) parisiens.

1.2. Présentation des laboratoires des HUPNVS

La mise en place des groupes hospitaliers au sein de l'APHP a conduit à la révision de leur organisation en pôles, conformément à la décision prise lors du conseil d'administration de l'AP-HP du 16 décembre 2005. Notre Groupe Hospitalier s'est alors structuré en quinze pôles dont le Pôle BioPhaRe. Le Pôle BioPhaRe étant composé de trois secteurs : le secteur Biologie, le secteur Pharmacie et le secteur Recherche (Voir l'annexe I).

Notre GH regroupe plusieurs laboratoires :

- Au sein du Pôle BioPhaRe :

* les 23 unités fonctionnelles (UF) du secteur Biologie (hors unités d'hygiène) forment le laboratoire unique multi-sites HUPNVS, appelé LBM des HUPNVS.

* Le secteur hygiène de Beaujon constitue le laboratoire de microbiologie de l'environnement, appelé LME des HUPNVS.

- Au sein du Pôle Imagerie : les laboratoires d'anatomie pathologie.

L'ensemble de ces laboratoires ont un SMQ (Système de Management de la Qualité) et un manuel qualité commun.

1.3. Présentation de l'UF de Biochimie du site BCH

L'UF de Biochimie du site BCH, au sein de laquelle je suis biologiste depuis 3 ans, compte 12 biologistes, 1 cadre paramédical supérieur, 1 cadre paramédical, 25 techniciens, 3 agents et 2 secrétaires (Cf. « Organigramme UF BIOCHIMIE BICHAT » Annexe II). En plus d'un secteur de Biochimie générale fonctionnant 24/24h, cette UF comporte un secteur de biochimie spécialisée (Centre de Référence national pour le dépistage des anomalies de la glycosylation des protéines, Centre de Référence au niveau de l'APHP pour le dosage des vitamines, Hormonologie, Electrophorèse des protéines, Hémoglobine et Variant, Spectrométrie de masse).

J'assure les fonctions de responsable du secteur Gaz du sang (Secteur Biochimie 24/24h), du coresponsable du secteur Vitamines (HPLC) et secteur Spectrométrie de masse LC/MS (Aldostérone, Méтанéphrines) avec la validation biologique de la biochimie générale et hormonale.

De point Assurance qualité, je suis le référent qualité du secteur Gaz du sang, le référent qualité en informatique pour AQUIRE de Radiometer® et le référent qualité de la garde de biochimie.

L'UF de Biochimie est une des UF qui a initié pour les HUPNVS la démarche d'accréditation : visite initiale du COFRAC en septembre 2014. Cette démarche concernait également les UF de Virologie et de Biologie de la reproduction du site BCH et l'UF d'Hématologie du site LMR. Aujourd'hui, 95% de l'activité de l'UF de Biochimie du site BCH est accréditée par le jeu des portées flexibles et des ajouts.

1.4. Management de la qualité au niveau du GH

Le secteur Biologie du Pôle BioPhaRe a mis en place, depuis 2010 une organisation qualité transversale au niveau des trois sites et commune aux 3 laboratoires du GH (le LBM des HUPNVS, le LME et les unités d'Anatomie Cytologie Pathologique des 3 sites) en s'appuyant sur un système pyramidal.

Cette organisation qualité a permis l'accréditation d'une partie du LBM et du LME dès 2014, puis de franchir le cap réglementaire des 55% d'activité accréditée pour le LBM au 30 septembre 2017.

1.4.1. Politique qualité du Laboratoire

- Au niveau du GH :

Un Responsable Qualité (RQ) pour le LBM a été nommé au sein de la Direction Qualité du GH. Ce RQ est chargé de piloter et d'accompagner la démarche qualité au sein du Pôle. Il s'appuie sur une cellule opérationnelle composée du chef de Pôle, du cadre paramédical du Pôle, du cadre administratif du Pôle et des Pilotes qualité des 3 sites qui sont 3 biologistes médicaux.

La cellule opérationnelle définit les axes de la démarche qualité du LBM des HUPNVS, fixe les objectifs à atteindre et donne les moyens nécessaires pour y parvenir (formation, outils, constitution de groupes de travail, mise en place d'audit...).

- Au niveau des sites (BCH, BJN et LMR) :

Un comité de pilotage organise la mise en oeuvre de la politique qualité sur chaque site. Le comité de pilotage se réunit tous les 2 mois pour vérifier la mise en oeuvre des objectifs fixés par la Cellule Opérationnelle ainsi que pour valider les procédures transverses. Il est composé du Responsable Qualité, du Pilote du site, des Responsables Assurance Qualité (RAQ) des UF, des Cadres et des Techniciens référents qualité des UF.

- Au niveau des UF :

Une cellule qualité de chaque UF organise la politique qualité de l'UF. La cellule qualité est pilotée par le RAQ et se compose du cadre, des biologistes responsables des différents secteurs de l'UF et des référents qualité de l'UF.

Le système management de la qualité du LBM des HUPNVS repose sur une approche processus. La cartographie décrite dans l'annexe III présente les processus tels que définis au sein du LBM.

1.4.2. Accréditation en 2018

Le Laboratoire a demandé l'extension de son accréditation pour les lignes de portée BB2 (Hémoglobine A1c en HPLC, Anomalie de l'hémoglobine en HPLC et électrophorèse capillaire, Aldostérone plasmatique en LC/MS, Vitamine A et vitamine E en HPLC), BB4 (CDT en électrophorèse capillaire) et BB6 (pH, pO₂, pCO₂, sodium, potassium et lactate en biologie délocalisée sur gaz du sang à la maternité).

En ce qui concerne le dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS, sa validation de méthode a été établie comme un seul processus (choix de la RAQ).

Dans ce mémoire, j'ai décidé de présenter la validation de ce processus en portée B.

2. Validation d'une méthode quantitative de portée B

2.1. Information normative

Les exigences organisationnelles et techniques pour la réalisation d'examens de biologie médicale sont mentionnées dans le document SH REF 02 [3]. Celui-ci précise et complète les dispositions législatives et réglementaires applicables relatives à la qualité des pratiques en biologie médicale ainsi que les exigences normatives du COFRAC.

Les types de portée d'accréditation et leurs modalités d'évaluation par le COFRAC pour les examens de biologie médicale sont présentés dans le document SH REF 08 [4].

Dans la norme NF EN ISO 15189, la validation est abordée aux paragraphes :

- § 5.3.1.2 : « *Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre la performance nécessaire et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés. Cette exigence s'applique au matériel utilisé dans le laboratoire, au matériel prêté ou au matériel utilisé dans des locaux associés ou mobiles par des tiers autorisés par le laboratoire.* »

- § 5.5.1.1 : « *Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue.* »

- § 5.5.1.2 : « *Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement.* » ; « *La vérification indépendante menée par le laboratoire doit confirmer, par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les performances annoncées pour la procédure analytique ont été satisfaites. Les performances annoncées pour la procédure analytique confirmées pendant le processus de vérification doivent être appropriées à l'utilisation prévue des résultats d'examen. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification et enregistrer les résultats obtenus.* »

- § 5.5.1.3 : « *Le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes : a) les méthodes non normalisées ; b) les méthodes conçues ou développées par le laboratoire ; c) les méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application* »

prévu ;d) les méthodes validées, puis modifiées. La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la validation et enregistrer les résultats obtenus. »

2.2. Justification du choix de la portée :

Le guide technique SH GTA 04 [5] explicite les exigences des paragraphes 5.3 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15189 concernant la vérification sur site/validation des méthodes en biologie médicale, en se fondant sur les bonnes pratiques dans ce domaine et les performances communément observées et acceptées.

Afin de réaliser la vérification/validation de ses méthodes, le LBM analyse et définit pour chaque examen la nature des opérations à mettre en œuvre en fonction :

- du type de flexibilité :

* Méthode « fournisseur » (portée flexible standard A), dite adoptée, avec uniquement une vérification de performances sur site,

* Méthode adaptée ou développée en interne (portée flexible étendue B), avec une validation de méthode.

- du type de méthode (quantitatif ou qualitatif).

D'autre part, pour respecter les exigences de la norme NF EN ISO 15189, l'UF de la biochimie a rédigé une procédure de vérification/validation d'une méthode décrivant sa démarche et les données expérimentales établies sur site dans le cas d'une portée de type A et/ou de type B.

Notre travail porte sur une méthode quantitative utilisant un système analytique sans marquage CE, adapté au niveau du laboratoire [6,7] et procédé d'une étape d'extraction manuelle. Il s'agit donc d'une validation de méthode de portée B.

La validation du dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS est réalisée pendant la période allant de septembre 2017 au juin 2018 m'appuyant sur le document SH GTA 04 [5], la procédure du Laboratoire et la fiche-type SH FORM 43 [8].

3. Méthodologie

3.1. Contexte de la méthode

3.1.1. Intérêt clinique

Composante à part entière du système rénine- angiotensine , l'aldostérone est une hormone produite par les glandes surrénales. Son rôle est de réguler l'eau, le sodium et les autres sels minéraux dans l'organisme afin de maintenir la volémie et la tension artérielle dans les limites physiologiques. Son dosage dans le plasma et l'urine est utile pour le bilan étiologique d'une hypertension artérielle.

C'est un dosage indispensable au diagnostic d'un hyperaldostéronisme primaire (adénome surrénalien) ou secondaire (hypertension rénovasculaire ou maligne) ou encore d'une insuffisance surrénalienne.

3.1.2. Recommandations préanalytiques :

Une modification du catalogue des examens sur site Bichat a été faite afin d'introduire toutes les recommandations préanalytiques pour le dosage d'aldostérone, une procédure PN_REC_F_076_01 (Prise en charge de la rénine et d'aldostérone) a été élaborée au niveau du laboratoire pour détailler la conduite à tenir devant la réception d'une demande de dosage d'aldostérone.

Le prélèvement est réalisé sur un tube EDTA et une centrifugation est nécessaire dans la demi-heure, pendant 15 minutes à 3500 tr/min.

- Le dosage de l'aldostérone ne peut se faire qu'au plus tôt quatre semaines après l'injection d'isotopes radioactifs dans le sang du patient.
- 15 jours avant la prise de sang: un arrêt des médicaments antihypertenseurs pouvant affecter le système rénine angiotensine et les concentrations d'aldostérone, en particulier les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les antagonistes de l'angiotensine II, les inhibiteurs de la rénine, les bêtabloquants et les diurétiques épargnant le potassium
- Un traitement par spironolactone doit lui, être stoppé 6 semaines avant le dosage. Un traitement par anticalcique et/ou alpha-bloquants peut être maintenu par contre.
- 5 jours avant la prise de sang: Arrêt des médicaments diurétiques thiazidiques, et des autres médicaments pouvant modifier l'aldostérone comme les laxatifs par exemple et instauration d'un régime normosodé (6-8 g de sel/jour) jusqu'à la prise de sang.
- Patient à jeun au moment de la prise de sang, si possible le matin, entre 8 et 10 heures afin de tenir compte du rythme circadien de la sécrétion de cette hormone.
- La position (couchée ou debout) influence les résultats des dosages. Ceux-ci peuvent donc être effectués chez un sujet dans l'une et/ou l'autre de ces positions, mais doit être précisée.
- Pour un dosage en position couchée, le sujet doit être allongé depuis au moins d'une demi heure (idéalement une heure). Pour un dosage en position debout, il doit avoir marché au moins une demi heure (idéalement pendant une heure), et la prise de sang réalisée immédiatement après cet exercice.

- Le stress de la ponction fait monter la rénine et par conséquent stimule également la sécrétion d'aldostérone.

3.1.3. Matériel

- Réactifs

Eau qualité LC-MS
 Méthanol, solvant qualité LC MS
 Acétonitrile, solvant qualité LC-MS
 Ammoniaque 32%, rectapur flacon 1l
 Acide Phosphorique 85%
 Sulfate de Zinc heptahydraté
 Acide Chlorhydrique 37% 1L
 Sodium Hydroxyde 1kg

- Gamme et Contrôles

[²H8]-Aldostérone
 Aldostérone solution
 Contrôle Serum Niveau 1 panel Steroïdes (5x3ml)
 Contrôle Serum Niveau 2 panel Steroïdes (5x3ml)
 Contrôle Serum Niveau 3 panel Steroïdes (5x3ml)
 6PLUS1.Multilevel serumcalibrator set

- Matériel consommable

Colonned'extraction Oasis MAX 96-well, micro-élution
 96-well sample collection plate 800 µl
 Seal Cap for 96 WP, round wells Bx of 50/50
 Waste collection pate 10mlx 24ml

L'ensemble des réactifs et consommables nécessaire au dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS est détaillé dans l'annexe IV.

3.1.4. Méthode de dosage :

L'aldostérone plasmatique est dosée par chromatographie liquide à ultra pression couplée à la spectrométrie de masse qui consiste à la détection des molécules en fonction de leur masse, et plus précisément du rapport masse/charge après ionisation et, éventuellement, fragmentation de la molécule.

Une étape de préparation des réactifs suivie d'une extraction de l'aldostérone est nécessaire avant la procédure de séparation chromatographique.

- Préparations des réactifs de la LC-MC

Phases mobiles

- ligne **A1** : 100% eau masse
- ligne **B1** : 100% Méthanol
- ligne **A2B2** : Purge ACN/eau (80/20)
- ligne **Wash** : 80/20 Méthanol/eau (wash solvent)
- ligne **Purge** : 40/60 Méthanol/eau (Purge solvent)
- ligne **SW** : 20/80 Méthanol/eau (Seal Wash)

- Réactif 1 :** 50/50 (v/v) Méthanol/0,2 M ZnSO₄
0,2 M ZnSO₄ : 14,4g de ZnSO₄ + 250ml eau + 250ml Méthanol
- Réactif 2 :** acide phosphorique à 0,05% (v/v)
0,25ml d'acide phosphorique à 85% + 500 ml eau
- Réactif 3 :** 0,1% Ammonia dans 10% Méthanol
1,5ml d'Ammonia 32% + 449ml eau + 50ml Méthanol
- Réactif 4 :** 70% de Méthanol
350ml Méthanol +150ml eau

- Préparation du standard interne : Aldosterone D8

1. solution de stockage à 1 g/L : 10 mg qsp 10 mL ACN
2. S0 : solution à 100 µg/L : 100 µL de la solution à 1 g/L qsp 1 ml ACN
3. S1 : solution primaire à 2 µg/L : 20 µL de solution S0 + 980 µL de Méthanol
4. S2 : solution à 100 ng/mL : 200 µL de S1 + 3800 µL de MeOH ► solution de TUNING également
5. S3 : solution de travail à 2 ng/mL : 400 µL de S2 qsp 20 mL 50/50 Méthanol/Eau
► SI=standard interne

- Préparation de la Solution SST : Aldostérone

La solution d'Aldostérone est à 100µg/ml dans de l'acétonitrile : SM0
A partir de la solution de stockage SM0 :

1. SM1 : solution primaire à 2 µg/mL : 20 µL de SM0 + 980 µL de Méthanol ► solution de TUNING
2. SM1 à 10 ng/ml : 10 µL de SM1 dans 1990 µL de Méthanol
3. SST : 15µL de SM1 à 10ng/ml + 985 µL de Méthanol/eau (40/60)

- Phase préparative :

Les prélèvements, les contrôles de qualité et la gamme sont traités dans les mêmes conditions.

- 200 µL échantillons (plasma, gamme et CIQ) dans des Eppendorfs
- 225 µL du mélange : SI (25 µL) + Réactif 1 (200 µL)

Agitation au Vortex pendant 2 minutes exactement

- ajouter 450 µL de Réactif 2 (acide phosphorique)

Agitation au Vortex pendant 1 minute exactement

Centrifuger les prélèvements pendant 10 minutes à 3000tr/min dans la centrifugeuse à Eppendorffs.

- Phase d'extraction – élution

Se munir d'une plaque OASIS MAX

Préparer les colonnes avec 200µL de Méthanol

Installer la plaque sur le MANIFOLD réglé le débit à 3 psi pendant 1 mn

Introduire 200 µL Eau, installer la plaque sur le MANIFOLD à 3 psi pendant 1 mn

Charger 625 µL de surnageant, installer sur le MANIFOLD, passé à 3 psi pendant 10 mns

Vérifier que tous les prélèvements soient passés, sinon mettre à 6 psipdt 2/3 mns
Vider la poubelle pour éviter les éclaboussures

Lavages des colonnes : 200 µL de Réactif 2 (acide Phosphorique) 3 psi pdt 1 mn
200 µL de Réactif 3 (Ammonium) 3 psi pdt 1 mn
200 µL Eau, 3 psipdt 1 mn

Enlever la poubelle et installer une plaque d'analyse

Elution : 25 µL de Réactif 4 (Méthanol/Eau), 1 mn à 3 psi
25 µL de Réactif 4 (Méthanol/Eau), 1 mn à 3 psi puis quelques secondes à
20 psi pour tout récupérer
Ajouter directement dans les puits 40 µL d'eau
Installer le couvercle de plaque
Mettre à agiter sur une plaque pendant 10 minutes
Installation sur la LC/MS

3.2. Protocole de validation de méthode

3.2.1 Maîtrise des risques

La maîtrise des risques est une étape essentielle pour le dosage d'aldostérone en LC/MS puisqu'il s'agit d'une analyse automatisée adaptée et précédée par une étape d'extraction. Le dosage d'aldostérone dépend donc des paramètres extérieurs pouvant avoir un impact plus ou moins critique, notamment au niveau pré-analytique.

La gestion des risques consiste en lister les facteurs d'influence, d'évaluer leur criticité puis de mettre en place des moyens de maîtrise pour chacun de ces risques.

Pour lister les risques, nous avons utilisé le diagramme des 5 M : Matières, Matériel, Main d'œuvre, Milieu, Méthodes. La réalisation du diagramme d'Ishikawa nous a ainsi aidé à identifier les principaux facteurs d'influence susceptibles d'introduire une variation significative sur le résultat (figure 1).

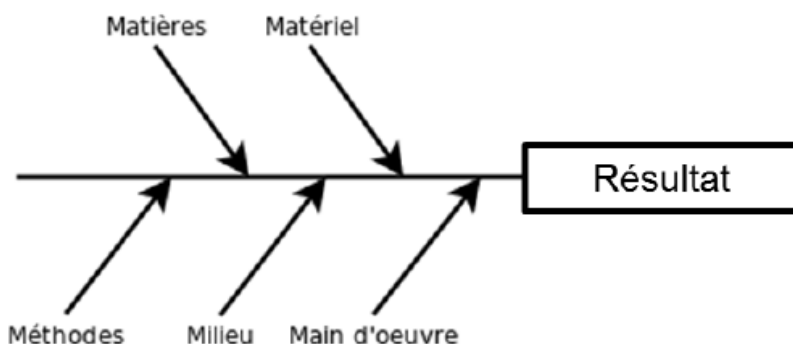


Figure 1 : diagramme d'Ishikawa

3.2.2 Evaluation de la performance et choix des critères d'acceptabilité

Le choix des critères d'acceptabilité associés à une méthode doit se faire préalablement à l'étude de vérification/validation (voir Annexe V). Il doit refléter l'état de l'art et surtout la pertinence clinique.

Il doit aussi s'appuyer sur des recommandations de sociétés savantes ou de groupes de travail, sur des publications scientifiques, sur les résultats des contrôles externes de qualité. Le référentiel retenu dans le cas de l'aldostérone était la table de Ricos et al. (cf. table1) ainsi que les Evaluations Externes de la Qualité (EEQ) de ProBioQual.

Analyte	CVi	CVg	I (%)	B (%)	TE (%)
Aldostérone Plasmatique	29.4	40.1	14.7	12.4	36.7

Table 1 : Objectifs de performance pour l'aldostérone selon la table Ricos et al.

Abbreviations: CVw = within-subject biologic variation ; CVg = between-subject biologic variation ; I = desirable specification for imprecision ; B = desirable specification for inaccuracy ; TE = desirable specification for allowable total error.

4. Analyse des résultats et interprétation

4.1. Maîtrise des risques

5M	POINTS CRITIQUES	ELEMENTS A MAITRISER	MODALITES DE MAITRISE	ECHELLE DE CRITICITE (C= FxG)		
				F	G	C
MATIERE	Identité	Formation du personnel	Procédure d'enregistrement des demandes dans le SIL (PN_PRA_F_006, PN_PRA_F_007, PN_REC_F007, PN_REC_F_095) Habilitation des personnels de l'ACEBM et du poste Réception (PN_GRH_E_029, PN_GRH_E_580) Circuit du tube dans le laboratoire avec différents acteurs	3	3	9
	Contexte	Renseignements cliniques	Bon de demande Appel du prescripteur Accès Médiweb / Orbis	2	1	2

	Prélèvement	Sang veineux Ordre des tubes : héparine avant EDTA (contamination)	Manuel de prélèvement (PN_PLV_Q_001): 1. Ordre de prélèvement des tubes 2. Agitation lente des tubes par retournement 3. Aiguille adaptée 4. A distance d'une perfusion (hémodilution, contamination) 5. Respecter les recommandations préanalytiques 6. Préciser la position / test statique ou dynamique Formation dans les services de soins	3	3	9
	Remplissage	Minimum 5mL				
	Type de tube	Tube EDTA	Evaluation des tubes sur site avant changement de fournisseur Appel d'offre AGEPS (loi des marchés publics)	2	1	2
		Choix du fournisseur	Participation des biologistes aux commissions de choix des fournisseurs à l'AGEPS	2	1	2
	Transport	Délai d'acheminement : inférieur à 4 h (tube EDTA) A température ambiante : 20°C +/- 5°C	Catalogue des examens. Pneumatique / Coursiers Recueil heure de prélèvement / horodatage heure de réception Règles ScanBac définies pour les délais d'acheminement Enregistrement et suivi des non-conformités Contrôle des températures de transport	3	1	3
	Conservation	- Décanter et garder à température ambiante si le dosage est envisagé dans les trois heures qui suivent. - Congeler à -20°C si le dosage est différé - Recongeler le plasma à -20°C en post analytique pendant 3 mois	Prise en charge de la rénine et aldostérone (PN_REC_F_076) Aliquotage des échantillons UF de Biochimie (PN_REC_F_188) Procédure de conservation des prélèvements en post-analytique (PN_PSA_M_003) Logiciel de suivi des températures des enceintes réfrigérées post-analytiques Procédure d'élimination des prélèvements (PN_PSA_F_021)	2	1	2
Rajouts	Délais de rajout et examens rajoutés maîtrisés	Délai de rajouts définis dans le catalogue des examens Procédure de rajout par fax (PN_REC_F_038) Traçabilité dans le SIL Personnel formé et habilité	2	1	2	

MATERIEL	Péremption	<p>Elimination des tubes périmés (services de soins)</p> <p>Elimination des réactifs périmés</p>	<p>Manuel de prélèvement (PN_PLV_Q_001):</p> <p>Spectrométrie de masse : Suivi des lots de solvants et phases mobiles (PN_PREP_E_108)</p> <p>Procédure de suivi des stocks et inventaires des réactifs (PN_GFO_M_004)</p> <p>Suivi mensuel des missions du référent technique (PN_PREP_E_011)</p>	2	2	4
	Disponibilité	<p>Eviter les ruptures de stocks des réactifs</p>	<p>Procédure de suivi de stocks (PN_GFO_M_003)</p> <p>Enregistrement FAQ + indicateur</p> <p>Commandes en urgence par la cadre</p> <p>LC/MS Fiches de stock(PN_GFO_E_087)</p>	3	1	3
	Conservation	<p>Réactifs: entre 15 et 25°C</p> <p>Calibrants et CIQ : -20°C</p> <p>Matériels (colonne, kit d'extraction) : entre 15 et 25°C</p>	<p>Logiciel de suivi des températures SIRIUS :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. pièces techniques, 2. réserves 3. enceintes réfrigérées <p>Cartographie des enceintes par un organisme accrédité</p> <p>Enceintes de secours identifiées</p> <p>Date d'ouverture/reconstitution sur les flacons</p> <p>Péremption des CIQ et calibrants : délai fiches fournisseur</p>	2	1	2
	Informatique	<p>Connexions automate – MW – SIL</p> <p>Intégrité des données maîtrisée entre automate, MW, SIL et Serveurs</p> <p>Maîtrise des pannes</p>	<p>Qualification des connexions par jeux de tests initiaux et réguliers tracés selon plan défini</p> <p>Sauvegarde des données brutes autoanalyseur définie et planification respectée (PN_ARC_F_002)</p> <p>Sauvegarde des serveurs informatiques SIL et MW</p> <p>Spectrométrie de masse : sauvegarde des données brutes (PN_MAI_F_133)</p> <p>Procédure situation dégradée testée (PN_SIL_M_007)</p> <p>Procédure de dépannage en cas de perte de connexion (PN_SIL_F_008)</p>	3	1	3

MATERIEL	Analyseur	Utilisé par du personnel habilité	Documentation fournisseur et interne Formations internes Qualification : - Tutorat (PN_GRH_E_894) - Evaluation des compétences initiale (PN_GRH_E_895) - Evaluation du maintien des compétences (PN_GRH_E_896) Formations fournisseur	5	1	5
		Maintenances : - préventives - curatives	Documentation fournisseur : Manuel d'utilisation de Xevo TQ-S de Waters (PN_TEC_DE_032) Planning des maintenances internes Spectrométrie de masse : maintenance hebdomadaire (PN_MAI_F_133) Planning des maintenances fournisseur (Kalilab) Contrat SAV	4	1	4
	Pipettes	Pipettes pour : - reconstitution des calibrant et des CIQ - étape manuelle d'extraction - préparation des phases mobiles et des réactifs - dilution manuelle	Pipettes critiques identifiées pour chaque poste de travail et par une pastille rouge (PN_MAI_M_009, PN_MAI_F_023, PN_MAI_E_021) Liste des pipettes critiques en spectrométrie de masse (PN_TEC_F_287) Raccordement COFRAC par organisme accrédité tous les ans sur site Jeux de pipettes critiques raccordées COFRAC pour remplacement ponctuel Formation du personnel	5	1	5
	Centrifugeuses	Centrifugeuses : - ROTANTA 460R (X2) - ROTANTA 420R - HERAUS Biofuge Primo 2200 g pendant 15 min	Procédure d'utilisation des centrifugeuses (PN_REC_M_020) → programmes fixes Entretien des centrifugeuses → planning des maintenances (MPL) Contrôle métrologique par le biomédical (périodicité annuelle) Formation du personnel	5	1	5
	Enceintes réfrigérées	Températures, contenus, localisations, enceintes de secours maîtrisés	Logiciel SIRIUS avec localisation, identification et suivi des températures des enceintes Identification des enceintes critiques au poste de travail (pastille rouge) et dans Kalilab (PN_MAI_M_008)	5	1	5

			Contenu affiché sur chaque enceinte (PN_MAI_E_003) Enceintes de secours identifiées Formation du personnel			
METHODE	Documentation	Interne : à jour et suivie Enregistrements : classés et préservés Externes : à jour et suivie → manuel automates, notices fournisseur, nouveautés scientifiques	Procédure de gestion documentaire (PN_DOC_P_002, PN_DOC_M_007, PN_DOC_M_002) Logiciel de gestion documentaire : Kalilab Suivi de la diffusion des documents (attestations de lecture dans Kalilab) Gestion des notices par les techniciens référents Bibliographie, veille scientifique, DPC par les biologistes	3	1	3
	Performances	Conforme aux critères établis par les sociétés savantes avant mise en route puis pour la confirmation en routine	Procédure de validation de méthode (PN_VAM_P_001) Formation du personnel EEQ Probioqual avec suivi des actions correctives (PN_GCQ_F_004) Suivi des CIQ quotidien et mensuel (PN_GCQ_E_03, PN_GCQ_E_467), des EEQ (PN_GCQ_F_004), calcul des incertitudes de mesure Evaluation des fournisseurs (PN_EVF_P_001, PN_EVF_M_001)	4	1	4
	Interférences	Connaissance des alarmes automates	Documentation fournisseur : décontamination du circuit en cas d'interférences. Formation	5	1	5
	CIQ	Règles de passage établies Valeurs cibles et valeurs acceptables établies Règles d'alarmes et de rejets maîtrisées Conduites à tenir définies Analyse d'impact réalisée avec établissement des critères de comparabilité	Procédure de gestion des CIQ au laboratoire (PN_GCQ_M_008) Règles de WG paramétrées dans le MPL Qualification du CIQ sur période probatoire de 30 jours Critères d'acceptabilité définis Formation du personnel technique et biologique et communication des CIQ rejetés Algorithme de conduite à tenir en cas de rejet du CIQ / analyse d'impact (PN_RES_F_005) Non conformités enregistrées et suivies avec rappel du compte rendu / commentaire	5	1	5

		<p>Maitrise des dérives des CIQ</p> <p>Maitrise des dérives automatés</p>	<p>« Annule et remplace »</p> <p>Suivi régulier des Levey-Jennings (PN_GCQ_E_0467)</p> <p>Suivi des maintenances (Kalilab)et des calibrations (MP)</p> <p>Evaluation des fournisseurs (PN_EVF_P_001, PN_EVF_M_001)</p>			
	EEQ	<p>Présence d'EEQ pour chaque méthode (saisie en binômes)</p> <p>Fournisseur d'EEQ accrédité</p> <p>Exploitation et suivi des actions correctives</p>	<p>Procédure EEQ suivi gestion (PN_GCQ_F_004)</p> <p>Suivi des EEQ</p> <p>Enregistrement des EEQ dans le SIL</p> <p>Enregistrement des actions correctives en cas d'EEQ non conforme (FAQ)</p> <p>Evaluation des fournisseurs (PN_EVF_P_001, PN_EVF_M_001)</p> <p>Formation et information du personnel</p>	4	1	4
	Etalons	Ref calibrateur/Notice	<p>Documentation fournisseur</p> <p>Vérification des mises à jour (site fournisseur, mission mensuelle du référent)</p>	3	1	3
	Réactif	Ref réactif/Notice	<p>Documentation fournisseur</p> <p>Vérification des mises à jour (site fournisseur, mission mensuelle du référent)</p> <p>Traçabilité des réactifs(PN_PREP_E_111, PN_PREP_E_108)</p>	3	1	3
	Dilution	Dilution manuelle	<p>Personnel formé et habilité</p> <p>Traçabilité de la dilution manuelle</p> <p>Pipettes dédiées</p>	5	1	5
	Validation	<p>Résultats critiques transmis</p> <p>Homogénéité des interprétations</p>	<p>Modes opératoires de vérification technique et de validation biologique / poste de travail</p> <p>Validation Biologique Rénine et Aldostérone (PN_VAB_F_051)</p> <p>Suivi des séries d'aldostérone(PN_TEC_E_211)</p> <p>Critères de communication des résultats critiques aux biologistes</p> <p>Procédure de communication des résultats au prescripteur (PN_RES_P_002)</p> <p>Traçabilité dans le SIL</p>	5	1	5

MAIN D'ŒUVRE		<p>Traçabilité</p> <p>Évènements tracés sans perte de données</p> <p>Résultats bruts</p> <p>Lots de réactifs utilisés</p> <p>Alerte de réactovigilance</p> <p>Suivi des alertes de réactovigilance</p>	<p>Traçabilité évènements dans logiciel automate (calibration, nouveau lot)</p> <p>Extraction des données automates sur fichier externe</p> <p>Tests de traçabilité pendant audit du poste</p> <p>Procédure d'archivage lors audit de poste de travail</p> <p>Procédure de réactovigilance</p> <p>Biologiste correspondant réactovigilance inscrit sur liste de diffusion ANSM</p>	5	1	5
		<p>Formation</p> <p>Qualification pour la validation de méthodes</p> <p>Nouveaux arrivants au secteur tutorés (technicien et biologiste)</p> <p>Rotation suffisante au poste</p> <p>Retour de congés (maladie, maternité,...)</p>	<p>Validation des méthodes : Habilitation des deux techniciennes et d'un biologiste responsable : Fiche Tutorat Validation de Méthodes (PN_GRH_E_779), Critères de qualification à la Validation de Méthodes (PN_GRH_E_229), Fiche d'évaluation initiale Validation de Méthodes (PN_GRH_E_784)</p> <p>Nouveaux techniciens arrivants : - Tutorat (PN_GRH_E_894) - Evaluation des compétences initiale (PN_GRH_E_895)</p> <p>Nouveaux biologistes arrivants : - Tutorat (PN_GRH_E_898) - Evaluation des compétences initiale (PN_GRH_E_899)</p> <p>Habilitation selon des critères prédéfinis : Personnel non médical (PN_GRH_E_042) – Personnel médical (PN_GRH_E_043)</p> <p>Personnel déjà en poste : Maintien des habilitations tous les 2 ans : Technicien(PN_GRH_E_896) et Biologiste ((PN_GRH_E_897)</p> <p>Plannings personnel médical (PN_RSH_E_025) et Personnel non médical (PN_RSH_E_021, PN_RSH_E_022, PN_RSH_E_023, PN_RSH_E_024)</p> <p>Renouvellement des habilitations</p>	3	1	3
		<p>Interprétations</p> <p>Algorithme décisionnel avec critères de repasse et critères de communication des résultats établis</p> <p>Règles de redondance des examens pour la juste prescription</p>	<p>Mode opératoire de vérification technique et analytique (PN_TEC_M_037)</p> <p>Mode opératoire de validation (PN_VAB_M_003)</p> <p>Règles d'expertise : MPL (documents joints à PN_TEC_M_037)</p>	5	1	5

		Standardisation des commentaires	Validation Biologique Rénine et Aldostérone (PN_VAB_F_051) Suivi des séries d'aldostérone (PN_TEC_E_211) Paramétrage Valab® (PN_VAB_E_003) Règles de comparabilité des résultats Incertitudes de mesure établies annuellement (PN_TEC_F_016) Paramétrage SIL (commentaires codés) et formation personnel			
MILIEU	Température	Plage de température de fonctionnement de l'automate maîtrisée (15 et 25 °C)	Logiciel de suivi des températures des pièces techniques Climatisation Système interne de gestion de la température de l'automate	3	1	3
	Déchets	Risque infectieux	Filière DASRI identifiée Formation Hygiène et Sécurité - Référent Hygiène et Sécurité Document Unique	5	1	5
	Sécurité	Risque AES maîtrisé	Surveillance périodique de la pression des bouteilles de gaz dans la salle de LC/MS Port de gants et blouses +/- lunettes de protection par le personnel en zone technique Utilisation des bouchons pour les tubes.	5	1	5

ECHELLE

Fréquence (F) → 1 : >1/10 ans, 2 : >1/an, 3 : >1/mois, 4 : >1sem, 5 : >1/jour

Gravité(G) → 1 : mineur (sans impact)

3 : majeur (impact sur le résultat réparable)

5 : critique (impact sur le résultat non réparable)

LEGENDE

Criticité (C) = Fréquence (F) x Gravité (G)

VERT : $1 \leq \text{criticité} \leq 5$: risque maîtrisé

ORANGE : $6 \leq \text{criticité} \leq 12$: risque non maîtrisé non prioritaire

ROUGE : $15 \leq \text{criticité} \leq 25$: risque non maîtrisé prioritaire

4.2. Evaluation expérimentale des critères de performance

4.2.1. Evaluation de la fidélité

La fidélité s'évalue par l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité intra-laboratoire. Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre des mesures répétées du même échantillon dans des conditions précisées. Elle est appréciée selon la dispersion des résultats par rapport à la moyenne, représentée par l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) exprimés ici en pourcentage.

4.2.1.1. Répétabilité

Cette évaluation a pour objet de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement du système analytique.

Pour évaluer la répétabilité de la méthode, nous avons choisi 3 niveaux de concentration de Chromsysteme®. Pour chaque niveau, la concentration d'aldostérone a été quantifiée 30 fois dans les mêmes conditions standardisées : même jour, même horaire, même opérateur, même extraction et même lot de réactifs et de calibrants.

Les résultats rangés dans un tableau sur Kalilab ont permis de calculer les moyennes, ET et CV de répétabilité pour les 30 valeurs et de confronter le CV obtenu au CV acceptable défini précédemment.

Les données rapportées ont été obtenues avec les conditions analytiques suivantes : Chromsysteme®. 3514-1(08/2018), le Chromsysteme®. 3514-2(08/2018) et le Chromsysteme®. 3514-3 (08/2018), multi level serum calibrator set lot: 5016 (12/2019) plaque Oasis® MAX (30µm) lot:006435089A, colonne cortecs UPLC C18 1,6µM lot 0128361131

Changement d'unités : ng/dl en pmol/l. Les résultats obtenus ont été multiplié par 27,743.

Echantillons	Nombre de valeurs	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%)RICOS	Conclusion
Niveau Bas Chromsys 3514-1	30	382,866	16,135	4,21	8,2	12,400	Conforme
Niveau Moyen Chromsys 3514-2	30	864,528	23,098	2,67	7,0	12,400	Conforme
Niveau Haut Chromsys 3514-3	30	3978,387	163,303	4,10	3,9	12,400	Conforme

Table 2 : Etude de la répétabilité du dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS

La répétabilité est très satisfaisante par rapport aux spécifications fournisseurs et aux exigences du RICOS, elle répond aux objectifs du laboratoire. Notre méthode est donc répétable.

4.2.1.2. Fidélité intermédiaire

Elle consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes afin de prendre en compte toutes les sources de dispersion aléatoire : cellule de l'extraction, de l'opérateur, température, etc.

La répétabilité a été effectuée sur 3 niveaux de contrôles internes de qualité (CIQ) à savoir le Chromsys 3514-1, le Chromsys 3514-2 et le Chromsys 3514-3.

Les résultats saisis dans un tableau sur Kalilab ont permis de calculer les moyennes, ET et CV de reproductibilité pour 40 valeurs (2 valeurs pour 20 séries).

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) RICOS	Conclusion
Niveau Bas Chromsys 3514-1	40	281,458	32,668	11,61	10,0	14,700	Conforme
Niveau Moyen Chromsys 3514-2	40	682,047	74,026	10,85	10,0	14,700	Conforme
Niveau Haut Chromsys 3514-3	40	2711,182	246,648	9,10	10,0	14,700	Conforme

Table 3 : Etude de la reproductibilité du dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS

Les performances obtenues sont en accord avec les données fournisseur pour le niveau haut. Cependant on constate un CV légèrement supérieur à celui annoncé par le fournisseur pour le niveau bas et moyen.

Par contre, les performances obtenues sont en accord avec les recommandations de RICOS. Notre méthode est jugée reproductible.

4.2.2 Variabilité inter-opérateurs

La variabilité inter-opérateurs n'a pas été évaluée en présence d'une seule technicienne habilitée en spectrométrie de masse au moment de l'évaluation. Une deuxième technicienne a été habilitée au secteur suite à l'augmentation des demandes de dosage d'aldostérone plasmatique.

4.2.3. Justesse

En absence de contrôles internes externalisés, la justesse n'a pas été évaluée pour ce paramètre.

4.2.4. Exactitude

Elle s'établit à partir des résultats d'EEQ (2 EEQ analysés 5 fois par an) en comparant la valeur trouvée à la valeur cible attendue (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs), assimilée à la valeur « vraie » (v) de l'échantillon testé. L'écart observé quantifie l'inexactitude.

Biais (%) = $100 \times (x-v)/v$ vec x = valeur trouvée pour l'EEQ. Ces valeurs permettront un calcul d'une valeur moyenne et de sa dispersion nécessaire pour le calcul d'incertitude.

Les données rapportées sont issues des rapports de la société d'évaluation externe de la qualité ProBioQual établis lors de l'année 2017 et 2018.

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) groupe de pairs	Biais (%) moyenne générale	Biais (%) RICOS	Conclusion
Niveau Bas								
17ME01	1	137,100	144,2	176,2	-4,924	-22,191	36,700	Conforme
17ME03	1	248,900	235,1	198,4	5,870	25,454	36,700	Conforme
17ME05	1	159,400	217,2	189,1	-26,611	-15,706	36,700	Conforme
17ME07	1	372,400	308	329,4	20,909	13,054	36,700	Conforme
17ME08	1	150,200	178,3	174,8	-15,760	-14,073	36,700	Conforme
17ME09	1	308,200	346,2	339,5	-10,976	-9,219	36,700	Conforme
17ME11	1	221,900	256,8	225,3	-13,590	-1,509	36,700	Conforme
17ME12	1	252,600	263,5	228,1	-4,137	10,741	36,700	Conforme
18ME01	1	242,300	308,7	254,1	-21,510	-4,644	36,700	Conforme
18ME02	1	320,300	364,6	347,9	-12,150	-7,933	36,700	Conforme
18ME03	1	418,200	411,1	411,9	1,727	1,529	36,700	Conforme
18ME06	1	149,100	179,8	189,1	-17,075	-21,153	36,700	Conforme
18ME07	1	437,700	433,8	429,6	0,899	1,885	36,700	Conforme
Niveau haut								
17ME02	1	769,900	906,1	955,3	-15,031	-19,408	36,700	Conforme
17ME04	1	915,900	1174,2	1106,4	-21,998	-17,218	36,700	Conforme
17ME06	1	777,700	911,1	892,9	-14,642	-12,902	36,700	Conforme
18ME04	1	867,600	839	835	3,409	3,904	36,700	Conforme
18ME05	1	814,200	817,8	837	-0,440	-2,724	36,700	Conforme
18ME08	1	863,500	892,3	836,1	-3,228	3,277	36,700	Conforme

Table 4 : Etude de l'exactitude du dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS

Les biais obtenus avec les EEQ 2017 et 2018 vis-à-vis du groupe de pairs sont inférieurs à ceux recommandés par RICOS.

L'exactitude évaluée par les EEQ 2017 et 2018 pour le XEVO TQS est acceptable pour le paramètre étudié.

4.2.5. Estimation de l'incertitude de mesure

L'estimation de l'incertitude de mesure sur les résultats est une exigence de la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.5.1.4) :

« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée... » ; « ...doit définir les exigences de performances pour l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure, et régulièrement examiner les

estimations d'incertitude de mesure » ; « Le laboratoire doit tenir compte de l'incertitude de mesure lors de l'interprétation des grandeurs mesurées. »

Cette étape comprend à la fois l'étude de risques (consistant à lister les paramètres d'influence et les moyens de maîtrise associés) et l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses. L'incertitude de mesure de la concentration d'aldostérone en LC/MS peut être calculée par la méthode CIQ/EEQ d'après le document SH GTA 14. Cette méthode exploite et combine les résultats des contrôles internes de qualité et des données d'évaluations externes de la qualité. Il s'agit d'une approche pragmatique ne nécessitant pas de travaux supplémentaires que les CIQ et EEQ déjà réalisés.

L'exploitation des CIQ permet d'évaluer la reproductibilité interne donc de quantifier la composante de fidélité. Il faut idéalement exploiter au moins une trentaine de valeurs par niveau de concentration ($n > 30$) sur une période longue. Dans notre travail nous avons exploité 40 valeurs pour calculer la moyenne et l'écart type des CIQ, on peut donc calculer la fidélité intermédiaire $u(\text{CIQ})$.

L'exploitation des EEQ de ProBioQual nous a permis de quantifier la composante de justesse, c'est-à-dire le biais : différence entre la moyenne des résultats et une valeur de référence pertinente (résultat du groupe de pairs ou de l'ensemble des participants).

Calculer les erreurs de justesse E_i : $E_i = (X_{lab} - X_{ref})_i$

$i = 1 \dots n$, n étant le nombre total de EEQ exploitées

X_{lab} : résultat du laboratoire

X_{ref} : valeur assignée de la comparaison

E : écart entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

Soit n le nombre de comparaisons étudiées, la moyenne de l'écart est :

$$\bar{E} = \frac{\sum (X_{lab} - X_{ref})_i}{n}$$

Avec l'écart-type des écarts :

$$\hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n - 1}}$$

L'incertitude évaluée à partir des évaluations externes est obtenue à partir de la valeur absolue de l'écart moyen associé de la loi de distribution uniforme (on divise la demi-étendue par racine de 3) et de l'écart-type des écarts précédemment calculé. La formule de calcul est la suivante :

$$u(\text{EEQ}) = \sqrt{\left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

On obtient l'incertitude combinée :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

$$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

Avec C : concentration en aldostérone (en pmol/L).

L'incertitude élargie U est obtenue en multipliant u(C) par le coefficient k (k=2).

Les résultats du calcul de l'incertitude sont exprimés de la façon suivante :

C±U (k=2) en pmol/L

	CIQ			EEQ			u ² = uCIQ ² + uEEQ ²	u	U= u*k
	CV (%)	m (pmol/L)	uCIQ ² (CV*M/100) ²	Ē	σ _E	uEEQ ² = Ē ² /3 +σE ²			
Niveau bas	11.61	281.46	1067.80	11.47	8.09	109.33	1177.14	34.31	68.62
Niveau haut	10.85	682.05	5476.31	9.91	7.54	89.56	5565.87	74.60	149.21

Table 5 : Calcul de l'incertitude du dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS

Les incertitudes élargies obtenues à 24,38% et 21,87% respectivement pour le niveau bas et le niveau haut sont inférieurs à 36.70% (Ricos). L'incertitude de mesure est donc conforme.

4.2.6. Etendue de mesure

Il s'agit de déterminer les limites de linéarité qui définissent l'intervalle de mesure à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fiabilité.

On a adopté l'intervalle de mesure proposé par le fournisseur en choisissant la valeur de 39 pmol/L comme limite basse car elle correspondait au point le plus bas de la calibration (Point G1 dilué au 1/2) et la valeur de 4161pmol/L comme limite haute car elle correspondait au point le plus haut de la calibration. Au-delà de 4161 pmol/L, une dilution manuelle est à réaliser.

L'intervalle de mesure indiqué par le fournisseur est adapté à la pratique du laboratoire.

4.2.7. Comparaison de méthodes

La comparaison de méthode nous permet de vérifier la corrélation entre deux méthodes ou deux analyseurs qui rendent des résultats pour un même paramètre (miroir, backup, changement d'automate).

Il faut donc accorder une valeur particulière aux graphiques des différences réalisées après le calcul des différences des couples xi (méthode A) - yi (méthode B) en fonction de xi et celui des rapports yi/xi établi en fonction de xi. Sur ces graphes sont reportées les limites de discordance retenues en valeur absolue ou relative respectivement.

Nous avons comparé la concentration d'aldostérone plasmatique en LC/MS réalisée à Bichat avec la même méthode de dosage à HEGP sur 50 mesures dans un intervalle de 33.7 à 6186.8 pmol/L couvrant l'étendue de mesure pertinente.

L'exploitation des résultats a été réalisée à 2 niveaux :

- Analyse des résultats individuels par le graphe des différences et le graphe des rapports

Figure 2 : Graphe des différences

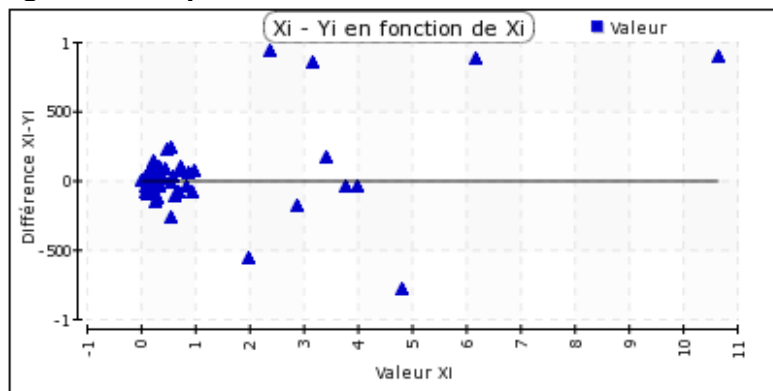
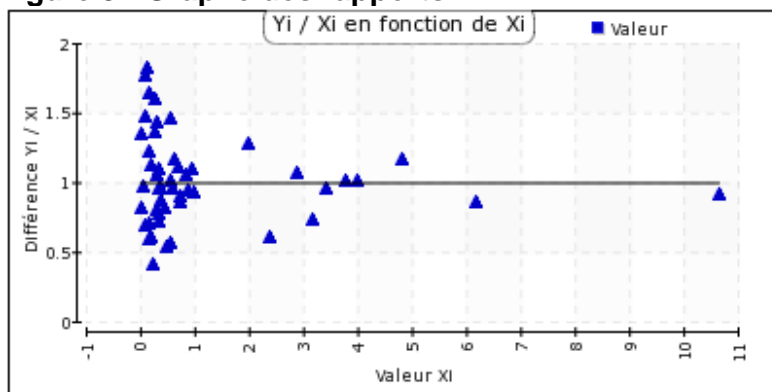
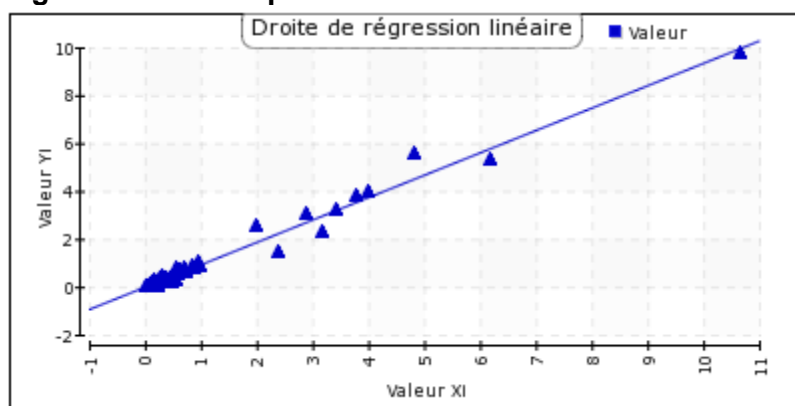


Figure 3 : Graphe des rapports



- Analyse des résultats globaux par régression linéaire (droite des moindres rectangles) avec une équation $y = 0.934x + 31.456$ ($r=0.989$)

Figure 4 : Comparaison Aldostérone en LC/MS Bichat / HEGP



Conclusion : Les graphes des différences et rapports montrent une bonne comparabilité des résultats entre les 2 méthodes. La comparaison de méthode pour le dosage des Aldostérone plasmatiques en spectrométrie de masse faite en parallèle à Bichat / HEGP autorise la réalisation de ce dosage [9, 10].

4.2.8. Interférences

Compte-tenu de la technique basée sur la détection et la quantification de fragments peptidiques selon leur rapport $m(\text{masse})/z(\text{charge})$ extrêmement spécifique des molécules dosées, l'étude des interférences classiquement envisagée avec d'autres techniques (avec composante colorimétrique) n'apparaît pas justifiée.

4.2.9. Contamination

La contamination inter-réactif n'a pas été vérifiée sur site et nous nous sommes basés sur les données fournisseur par contre la contamination inter-échantillon a été vérifiée par passage (n=3) de 2 patients de concentrations différentes.

Les moyennes obtenues en pmol/L des répliques ne sont pas statistiquement différentes.

		Echantillon Haut	Echantillon Bas
Essai 1	1	278.372	6.603
	2	293.382	6.492
	3	294.714	6.742
Essai 2	1	289.276	6.797
	2	294.797	7.296
	3	300.041	6.575

Moyenne B1 :	6.700
Ecart Type B1 :	0.137
Moyenne B3 :	6.659
Ecart Type B3 :	0.118
Moyenne H :	291.764

Test de Normalité :	1.349
Nombre de valeurs :	2
DLL :	1
F de Snedecor:	161.45

Le test de normalité de la distribution est vérifié, le test t de Student peut s'appliquer.

Test t de Student

Moyenne des différences :	0.017
Ecart-type des différences :	0.1296
DDL :	1
Valeur critique du test t :	0.13
t de Student :	12.706

Les moyennes ne sont pas statistiquement différentes. La contamination doit être évaluée en fonction de la bibliographie.

Contamination:	0.01%
----------------	-------

Conclusion : Absence de contamination inter-échantillon

4.2.10. Robustesse et stabilité

- Pour les réactifs liquides prêts à l'emploi, nous nous sommes basés sur les données du fournisseur préconisant une conservation à température ambiante jusqu'à la date de péremption.

- Pour les réactifs lyophilisés, la stabilité a été étudiée sur site pendant la période allant du 08/01/2018 au 11/07/2018.

Deux points de calibrant (Multilevelserumcalibrator set,lot5016) ont été passés en raison de 18 séries à savoir le G1 (valeur théorique à 67 pmol/l) et le G6(valeur théorique à 4161 pmol/l).

Les CV respectifs du G1 et G6 étaient à 5.92 % et 6.36% (CV acceptable par rapport au RICOS <10%).

La stabilité des calibrant est conforme aux exigences de notre laboratoire.

4.2.11. Intervalle de référence

Le laboratoire a choisi d'utiliser les valeurs de référence du laboratoire de Biochimie de l'HEGP qui utilise le même appareil (XevoTQS) et la même technique de dosage. Nous sommes les back up l'un de l'autre. Les intervalles adoptés sont cohérents avec les données de la littérature [11]

- Aldostérone plasmatique :

*position debout : 250 - 1200 pmol/L

* position semi-assise : 150 - 500 pmol/L

* position couchée : 100 - 440 pmol/L

CONCLUSION

Le dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS qui est une méthode quantitative de portée B est validé suite à ce travail élaboré avec la technicienne référent en spectrométrie de masse. Les différentes expérimentations ont permis de conclure que la performance de la méthode est acceptable. Une étude des risques nous a permis d'exposer toutes les erreurs pouvant intervenir et notre façon de les maîtriser. Ce travail a également contribué à former puis à habilitier deux techniciens et deux biologistes dans le secteur LC/MS.

La rédaction de plusieurs documents qualifiés qui aident à maîtriser les aspects préanalytiques, analytiques et post analytiques nous a permis de finaliser le dossier d'accréditation du dosage de l'aldostérone plasmatique en LC/MS et d'inscrire ce processus sur la liste des demandes d'accréditation pour la prochaine visite du COFRAC.

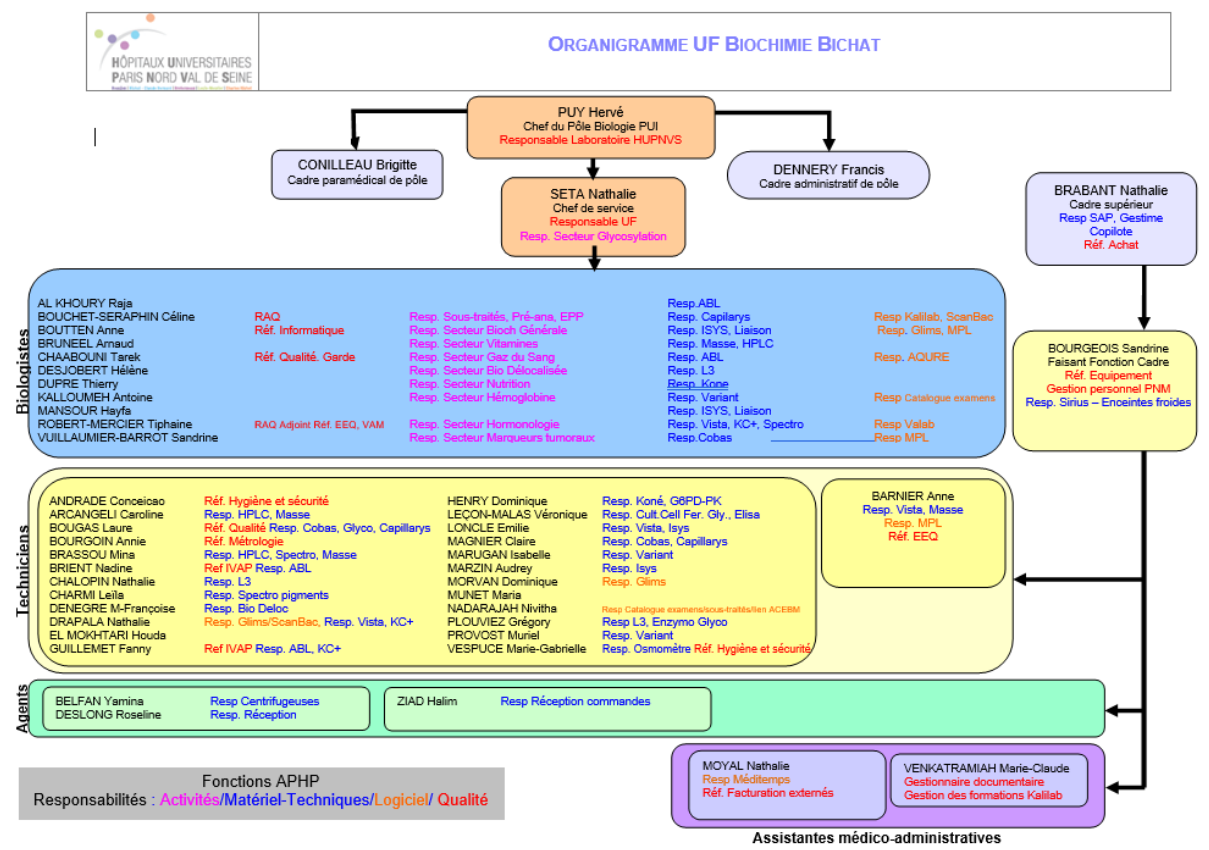
BIBLIOGRAPHIE

1. ISO 15189-2007 standard. Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence. Saint-Denis : AFNOR, 2007 (www.afnor.fr).
2. Directive 98/79 of the European Parliament and of the council of 27 October on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 1998 (Dec 7) ; L 331 : 1-37.7.
3. SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. COFRAC, 2013.
4. SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. COFRAC, 2010.
5. SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. COFRAC, 2011.
- 6 : UPLC-MS/MS Analysis of Aldosterone in plasma for clinical research. Dominic Foley and Lisa Calton, Waters corporation, Wilmslow, UK
7. Quantitation of Aldosterone in Serum or Plasma Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). J. Grace Van Der Gugten and Daniel T. Holmes. Clinical Applications of Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis: Methods and Protocols (pp.37-46)
8. SH FORM 43. Fiche Type Quantitatif. COFRAC, 2011.
9. Analysis of aldosterone in plasma for clinical research using automated extraction Heather Brown, Dominic Foley, Brian Keevil and Lisa Calton. Waters corporation, Stamford Avenue, Wilmslow UK and university hospital of South Manchester, UK. www.watres.com/posters
10. Measurement of Aldosterone in Human Plasma by Semiautomated HPLC–Tandem Mass Spectrometry. Paul J. Taylor,* Donald P. Cooper, Richard D. Gordon, and Michael Stowasser. Clinical Chemistry 55:6 115-1162(2009)
11. Etape de confirmation diagnostique de l'hyperaldostéronisme primaire Confirmatory testing in primary hyperaldosteronism. Yves Reznik, Laurence Amar et Antoine Tabarin. Ann Endocrinol (Paris). 2016 Jul;77(3):202-7.

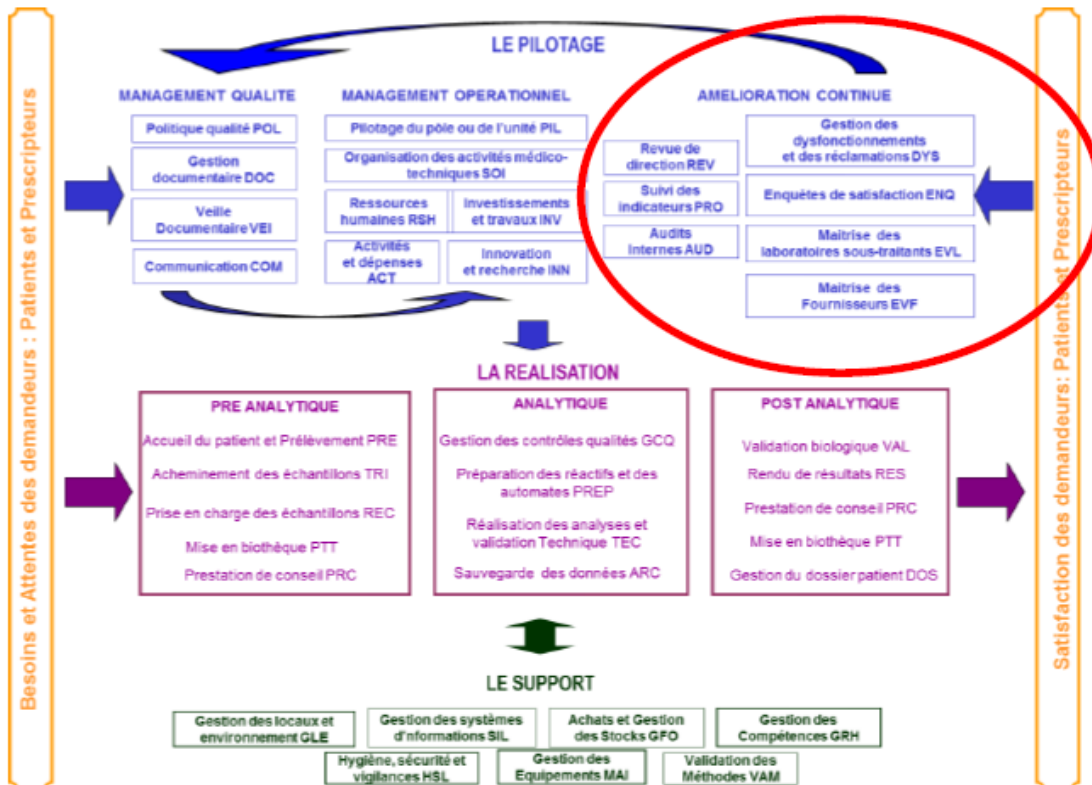
ANNEXES

Annexe I : Organisation générale du Pôle BioPhaRe des HUPNVS	30
Annexe II : Organigramme UF BIOCHIMIE BICHAT	31
Annexe III : Cartographie des processus du LBM des HUPNVS	32
Annexe IV : Réactifs et consommables pour le dosage de l'aldostérone en LC/MS	33
Annexe V : Description du processus et de la méthode	34
Annexe IV : Données de la comparaison de méthode	35

Annexe II : Organigramme UF BIOCHIMIE BICHAT



Annexe III : Cartographie des processus du LBM des HUPNVS



Annexe IV : Réactifs et consommables pour le dosage de l'aldostérone en LC/MS

Produits	Fournisseurs	Référence	Stockage	Pièces
Réactifs				
Eau qualité LC-MS	Carlo Erba	412111	T°ambiante	Armoire 7
Méthanol LC-MS	VWR	1.06035.1000	T°ambiante	Armoire 4
Acétonitrile LC-MS	VWR	1.00029.1000	T°ambiante	Armoire 4
Ammoniaque 32%	VWR	21192.298	T°ambiante	Armoire 4
Acide Phosphorique 85%	Sigma	64957-250ml	T°ambiante	Pièce 124.32
Sulfate de Zinc heptahydraté	Sigma	31665-1KG	T°ambiante	Pièce 124.32
Acide Chlorhydrique 37%	VWR	20.252.294	T°ambiante	Pièce 124.32
Sodium Hydroxide	VWR	28.244.295	T°ambiante	Pièce 124.32
Calibrants et contrôles				
[² H ₈]-Aldostérone	Alsachim	C3357	-20°C	FRI-102
Aldostérone Solution	Sigma	A-096-1ml	-20°C	FRI-102
Contrôle Serum Niveau 1 panel stéroïde	Chromsystems	341	-20°C	FRI-102
Contrôle Serum Niveau 2 panel stéroïde	Chromsystems	342	-20°C	FRI-102
Contrôle Serum Niveau 3 panel stéroïde	Chromsystems	343	-20°C	FRI-102
6PLUS1 Multilevel serum calibrator set	Chromsystems	7203B	-20°C	FRI-102
Matériels				
Colonne Oasis MAX 96-well	Waters	186001829	T°ambiante	Pièce 124.32
96-well sample collection plate	Waters	186002481	T°ambiante	Pièce 124.32
Seal Cap for 96 WP, round wells	Waters	186002483	T°ambiante	Pièce 124.32
Waste collection plate 10mlx24ml	Waters	186005586	T°ambiante	Pièce 124.32

Annexe V : Description du processus et de la méthode

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE	
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) :	
Aldosterone	
Processus simple	

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
1. VM-PNE-BQUANT-15-1 / Aldosterone	Eléments à vérifier	<input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input checked="" type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11.1. Contamination inter-échantillon <input checked="" type="checkbox"/> 11.2. Contamination inter-réactif <input checked="" type="checkbox"/> 12.1. Robustesse <input checked="" type="checkbox"/> 12.2. Stabilité <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalles de référence <input checked="" type="checkbox"/> 14. Discordances

SOUS-PROCESSUS 1 : VM-PNE-BQUANT-15-1	
Portée B	
Il s'agit d'une méthode quantitative utilisant un système analytique sans marquage CE adapté et procédé d'une étape d'extraction manuelle. Il s'agit donc d'une validation de méthode de portée B.	

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande	Détermination de la concentration en Aldostérone dans le plasma
Principe de la méthode	L'aldosterone est quantifiée par une méthode UPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem de type quadripôle (Xevo-TQS Waters) capable de détecter des ions fils ($m/z= 189.2$) issus de la fragmentation d'ions parents ($m/z= 359.2$).
Type d'échantillon primaire	Non spécifiée
Type de récipient, Additifs	tube EDTA
Prétraitement de l'échantillon	centrifugation 15 min à 2000 g
Unités	pmol/L
Critères d'interprétation	Debout : 250 - 1200 pmol/L; Assis : 150 - 500 pmol/L; Couché : 100 - 440 pmol/L
Marquage CE	non
Codage C.N.Q.	
Equipement (instrument, analyseur, etc)	Spectro Masse
Référence du réactif	1.06035.1000 Version notice : Methanol LC/MS 412111 Version notice : H2O LC/MS
Matériau d'étalonnage (références)	Chromsystems 6PLUS1 Multilevel serum Calibrator Ref : 72038 (méthode de référence: IFCC@ 37°C)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	calibration linéaire en 8 points. 1 dosage/niveau
Fichiers joints	-amartin-abc-303571-dosages_des_steroides_par_spectrometrie_de_masse-VpzunH8AAQEAAAeBcg4AAAAC.pdf [434.55 Ko] hypertension endocrine.pdf [404.90 Ko] quantification aldo.pdf [202.78 Ko]
Validé par BARNIER Anne le 03-08-2018	

Annexe VI : Données de la comparaison de méthode

	Méthode testée (X)	Méthode précédente (Y)	x-y	y/x
1	169.2	100.03	69.170	0.591
2	338.5	261.6	76.900	0.773
3	153.9	188.5	-34.600	1.225
4	547.1	311.6	235.500	0.570
5	213.1	130.7	82.400	0.613
6	753.3	650.2	103.100	0.863
7	342.4	246.2	96.200	0.719
8	167.7	119.2	48.500	0.711
9	324.7	261.6	63.100	0.806
10	691.7	769.5	-77.800	1.112
11	3794.1	3839.8	-45.700	1.012
12	289.8	307.8	-18.000	1.062
13	6186.8	5309.6	877.200	0.858
14	568.6	834.8	-266.200	1.468
15	2393.1	1458.2	934.900	0.609
16	494.7	265.4	229.300	0.536
17	100	177.5	-77.500	1.775
18	236.2	96.1	140.100	0.407
19	646.3	753.3	-107.000	1.166
20	999.4	923.4	76.000	0.924
21	253.8	405.2	-151.400	1.597
22	4826.2	5603.2	-777.000	1.161
23	367	352	15.000	0.959
24	3162.3	2315.7	846.600	0.732
25	3985.1	4033.6	-48.500	1.012

26	10649	9754.7	894.300	0.916
27	2006.4	2561.5	-555.100	1.277
28	2894.8	3081.8	-187.000	1.065
29	831	877.2	-46.200	1.056
30	306.2	246.2	60.000	0.804
31	19.7	26.6	-6.900	1.350
32	91.8	135.5	-43.700	1.476
33	61.9	60.4	1.500	0.976
34	163.3	268.1	-104.800	1.642
35	868.9	817.2	51.700	0.940
36	325.9	313	12.900	0.960
37	956.4	1047.1	-90.700	1.095
38	557.7	567.9	-10.200	1.018
39	747.7	675.9	71.800	0.904
40	3418.8	3257.5	161.300	0.953
41	440.2	362.9	77.300	0.824
42	373.4	326.9	46.500	0.875
43	360.5	396.1	-35.600	1.099
44	303.7	434.9	-131.200	1.432
45	125.8	229.9	-104.100	1.828
46	596.8	573.4	23.400	0.961
47	33.7	27.7	6.000	0.822
48	88.5	60.9	27.600	0.688
49	282.2	385	-102.800	1.364
50	215.1	241	-25.900	1.120

RESUME

Le secteur Biologie du Pôle BioPhaRe des HUPNVS a mis en place, depuis 2010 une organisation qualité transversale au niveau des trois sites de Bichat, Beaujon et Louis Mourier. Cette organisation qualité a permis d'accréditer selon la norme internationale NF EN ISO 15189, plusieurs processus dès 2014, puis de franchir le cap réglementaire des 55% d'activité accréditée au 30 septembre 2017.

L'APHP a doté l'ensemble de ses laboratoires d'un logiciel de management de la qualité : Kalilab (société Netika). Ce logiciel permet via différents modules de gérer les documents qualité, le personnel, les équipements, les projets qualité, la déclaration, le suivi des non-conformités et la validation des méthodes.

En tant que pharmacien biologiste coresponsable du secteur LC/MS, j'ai été missionné pour assurer la validation d'une méthode quantitative qui consiste à doser l'aldostérone plasmatique en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Le Laboratoire a donc demandé l'extension de son accréditation pour les lignes de portée BB2. Conformément au document SH GTA 04, nous avons réalisé une maîtrise des risques et déterminé, les critères de performances de la méthode: fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) exactitude ; incertitude de mesure ; comparaison de méthode et étendue de mesure.

Ainsi, il a été conclu que notre méthode est valide pour la mesure de la concentration plasmatique de l'aldostérone en LC/MS. Le dossier d'accréditation est donc finalisé et le processus du dosage de l'aldostérone plasmatique est inscrit sur la liste des demandes d'accréditation pour la prochaine visite du COFRAC.