

**Université Pierre et Marie Curie - Sorbonne Universités**

**MÉMOIRE**

**POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE**

**« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE »**

**Dépôt de dossier pour l'accréditation du  
Génotype de résistance du VIH-1 par  
séquençage dans le plasma selon la norme  
NF ISO 15189**

**Djeneba B. Fofana ep KAMPO  
2017-2018**

## **Note aux lecteurs**

« 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.»

**Dr Djeneba Bocar FOFANA ep KAMPO**

Praticien Attaché Associé/Monitrice d'Etudes Biologiques  
Unité de virologie

Hôpital Saint Antoine

Groupe Hospitalier - Hôpitaux Universitaires Est Parisien

Assistance Publique des Hôpitaux de Paris

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord le Pr Michel Vaubourdolle et le Dr Pascal Pernet de m'avoir accueilli dans ce DU Qualité ainsi que l'ensemble des intervenants pour la qualité des enseignements.

Je remercie ma cheffe de service, la responsable de l'unité de virologie de Saint-Antoine, Pr Laurence Morand-Joubert pour m'avoir permis de suivre cette formation.

Je remercie toutes les personnes impliquées dans l'élaboration du dossier pour l'accréditation du génotypage VIH et son dépôt auprès du COFRAC : Dr Sidonie Lambert (biologiste référente de cette activité), Luis Chan (technicienne au LCBGM), Dr Olivier Lascols (responsable du LCBGM), Sophie Chapelain (cadre du LCBGM) ainsi que notre RAQ Mme Lydie MOUBAMBA pour leurs disponibilités et leurs apports dans ce travail. Je n'oublie pas Mme Zaina Ait ARKOUB pour ces précieux conseils.

Enfin, je veux remercier mon mari, pour son soutien tout au long de ce travail et la relecture de mon mémoire. Gros bisous à mes filles pour la bonne compagnie !!

## GLOSSAIRES

**ANPGM** : Association Nationale des Praticiens de génétique moléculaire

**ANRS** : Agence Nationale de la Recherche sur le VIH/SIDA et les Hépatites virales

**CIQ** : Contrôle de qualité interne

**COFRAC** : Comité Français d'Accréditation

**DU** : Diplôme Universitaire

**EEQ** : Evaluation Externe de la Qualité

**HUEP**: Hôpitaux Universitaires Est Parisien

**ISO** : International Standard Organisation ou Organisation Internationale de normalisation

**LBU** : Laboratoire de Biologie d'Urgence

**LCBGM** : Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires

**MAQ** : Manuel Assurance Qualité

**UCORE** : Unité de Collecte Orientation et Réception des Examens

**SAT** : Hôpital Saint-Antoine

**VHB** : Virus de l'Hépatite B

**VHC** : Virus de l'Hépatite C

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

# SOMMAIRE

1	CONTEXTE/ INTRODUCTION.....	1
1.1	Présentation générale de l'unité de virologie de SAT .....	3
1.2	Organigramme du Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires (LCBGM) 3	
1.3	Mon rôle dans le Laboratoire.....	4
2	INTERET ET OBJECTIFS.....	5
2.1	Norme NF EN ISO 15189.....	5
2.2	Avancement dans l'accréditation du laboratoire .....	5
2.3	Choix du sujet et objectifs .....	6
3	METHODOLOGIE .....	7
3.1	Formation et habilitation du personnel.....	8
3.2	Le système documentaire .....	10
3.3	Elaboration du dossier de validation des méthodes.....	13
4	REALISATIONS / COMMENTAIRES .....	19
4.1	Retour des laboratoires déjà accrédités en génotypage de résistance aux antirétroviraux du VIH .....	19
4.2	Etat d'avancement de l'habilitation du personnel.....	19
4.3	Etat des lieux du système documentaire en rapport avec le sujet.....	20
4.4	Rédaction du SH form 43 sur le dossier de validation des méthodes des techniques de génotypage de résistance aux antirétroviraux du VIH-1 sur le site de Saint-Antoine avec l'analyse de risque et calcul de la criticité.....	21
4.5	Audit interne .....	24
4.6	Difficultés rencontrées/Recommandations .....	24
5	CONCLUSION .....	26
6	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	27
7	ANNEXES.....	28
	RESUME.....	37

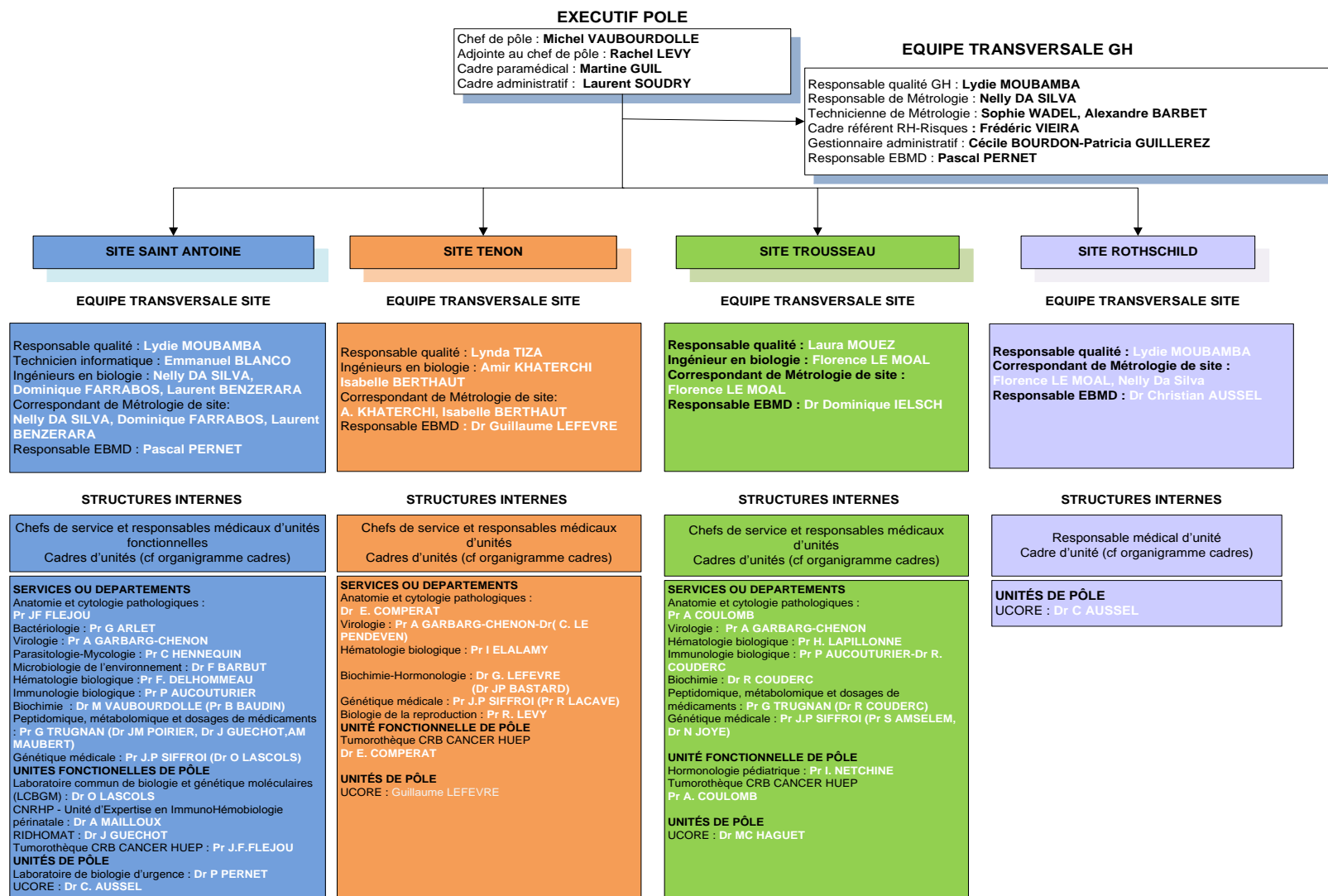
## 1 CONTEXTE/ INTRODUCTION

Depuis 2011, le groupe hospitalier Hôpitaux Universitaires Est Parisien (HUEP) regroupe en son sein 4 hôpitaux Saint-Antoine, Tenon, Rothschild et Trousseau. Ce Groupe Hospitalier (GH) est structuré en 13 pôles d'activités : Pôle Biologie médicale et pathologie, Pôle Digestif, Pôle Imagerie, Pôle Maladies du rein et des voies urinaires, Pôle Odontologie, Pôle Oncologie - Hématologie, Pôle Pathologie de l'enfant et de l'adolescent, Pôle Polyhandicap pédiatrique, Pôle Prévention- Information Médicament - Evaluation, Pôle Spécialités, Pôle Thorax - Voies aériennes - Anesthésie-Réanimation, Pôle Urgences et aval et le Pôle Mère-Enfant.

Le Pôle de Biologie Médicale et Pathologie constitue l'unique laboratoire de biologie médicale (LBM) du groupe HUEP. Ses activités sont réparties sur les 4 hôpitaux. Ce pôle est sous la direction d'un trio composé d'un responsable médical, le Dr Michel Vaubourdolle, d'un cadre coordonnateur paramédical et d'un cadre administratif. Il est organisé à la fois en département, en service et en unités fonctionnelles, qui sont dirigés par des biologistes médicaux chefs de service ou responsables d'unités. Ci-dessous l'organigramme récent de pôle selon le manuel d'assurance qualité (MAQ) du pôle.

Une des missions de ce pôle est de développer un système commun d'assurance qualité selon les normes NF EN ISO 15189, NF EN ISO 22870, NF EN ISO CEI 17025 et NF S 96900 en lien avec la politique de gestion de la qualité et de la maîtrise des risques du GH. Ainsi depuis 2015, le pôle s'est engagé dans une démarche processus conformément à la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189.

# Organigramme pôle biologie médicale et pathologie pour le site Saint-Antoine



## **1.1 Présentation générale de l'unité de virologie de SAT**

L'unité de virologie de Saint-Antoine est une structure interne du pôle de biologie médicale et pathologie sous la responsabilité du Pr Laurence Morand-Joubert. Cette unité est responsable des analyses de virologie en particulier les tests de sérologies virales et de certaines sérologies bactériennes. Elle est en charge également des protocoles de recherches cliniques sur ce site. C'est une unité constituée pour le personnel médical à temps plein d'1 PU-PH, 2 MCU-PH, 2 PA, 1 PAA et 1 PAA/MEB ; pour le personnel non médical de 6 techniciens, un cadre et une secrétaire à temps partiel. Cette unité comme tous les services du pôle s'est inscrite dans la mission d'une amélioration de la qualité pour atteindre les objectifs du pôle.

Pour les analyses de virologie faisant appel à des techniques de biologie moléculaire, elles sont réalisées au sein du Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires (LCBGM) se trouvant dans le même bâtiment que cette l'unité. C'est sur cette plateforme commune qu'est effectué le génotypage du VIH notre sujet d'intérêt dans ce travail de mémoire. Cette plateforme dispose d'un personnel dédié pour ses activités.

## **1.2 Organigramme du Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires (LCBGM)**

Le LCBGM est sous la responsabilité du Dr Olivier Lascol. Comme son nom l'indique, ce laboratoire met en commun les moyens pour plusieurs services ou départements comme l'anatomie et cytologie pathologiques, la bactériologie, la biochimie, l'immunologie, l'hématologie, la parasitologie, la virologie et la génétique de maladies rares du métabolisme sur un seul plateau technique.

Le LCBGM a pour vocation de développer des examens biologiques utilisant les outils de biologie moléculaire pour le diagnostic, le pronostic et la surveillance thérapeutique des maladies qui constituent les pôles forts de l'hôpital. Il est amené à participer à des projets de recherches cliniques pour l'investigation de nouveaux marqueurs moléculaires en collaboration avec les services cliniques intéressés.

Dans ce but, il doit assurer un haut niveau de qualité dans un délai de réponse optimal pour le bénéfice de l'ensemble des patients des services cliniques de l'hôpital et des

prescripteurs externes. Le LCBGM dispose d'un pool paramédical ainsi que d'une cadre et 2 secrétaires. Les activités de biologie moléculaire de l'unité de virologie y sont effectuées par les techniciens du LCBGM mais validées par les virologues de l'unité de virologie.

### ***1.3 Mon rôle dans le Laboratoire***

Je suis pharmacienne de formation, détentrice d'un doctorat de science en virologie et monitrice d'étude biologique de l'agence nationale de la recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales (ANRS). A ce titre, j'occupe un poste de praticien attaché associé au sein de l'unité de virologie de Saint-Antoine. Le monde de la recherche n'échappe pas aux questions d'assurance qualité puisque les analyses de biologie médicale pour le suivi des patients inclus dans les différents protocoles de recherche clinique s'effectuent dans les LBM. C'est dans ce cadre et pour développer des compétences en assurance qualité que je me suis inscrite à ce DU. Cependant, mon rôle est volontaire dans l'accompagnement du déploiement des processus qualité au sein du service.

Aussi dans le cadre de ce travail de dépôt de dossier, je suis chargée d'effectuer l'analyse de risque au niveau des 3 sous-processus.

## 2 INTERET ET OBJECTIFS

### 2.1 Norme NF EN ISO 15189

La législation relative à la biologie médicale impose depuis janvier 2010 via l'ordonnance n°2010-49, la mise en place de l'accréditation de tous les laboratoires de biologie médicale en France. Cette accréditation est basée sur la norme NF EN ISO 15189, complétée pour les examens de biologie délocalisés par la norme NF EN ISO 22870. Elle porte sur les phases analytique, pré-analytique (prélèvement et transports jusqu'au lieu de l'analyse) et post-analytique (validation du résultat, interprétation biologique, archivage), visant à garantir leur compétence et la qualité des prestations fournies. Ainsi, tous les LBM, publics et privés doivent être accrédités sur la totalité de leur activité au plus tard le 1<sup>er</sup> novembre 2020.

### 2.2 Avancement dans l'accréditation du laboratoire

Le pôle de Biologie Médicale et Pathologie du GH de l'Est Parisien en tant que laboratoire publique est soumis aux exigences de la norme d'accréditation NF EN ISO 15189.

Il est accrédité COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 et la norme NF EN 22870 sur les 4 sites Son accréditation est disponible sur le site du cofrac, [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr). La Responsable Qualité du pôle est Mme Lydie MOUBAMBA et le SMQ est porté par un logiciel qualité « *Kalilab* ». Un référant qualité par unités ou département assure la gestion documentaire notamment.

Comme la plupart des LBM, le LCBGM s'est inscrit dans la démarche qualité, en actualisant régulièrement les procédures générales et spécifiques techniques, en traçant les dysfonctionnements internes et externes au laboratoire, en validant les méthodes d'analyses, en habilitant son personnel technique et biologique, en organisant des réunions de travail interne sur la qualité.

En ce qui concerne la virologie, une première portée d'accréditation concernant les quantifications virales automatisées VIH, VHB et VHC a été soumise en 2015. Ces techniques ont été accréditées. Ainsi, dans le cadre de l'extension de l'accréditation de ces activités, l'unité de virologie a souhaité effectuer une demande d'accréditation du génotypage du VIH dans le plasma en extension sous la responsabilité du Dr Sidonie

Lambert (MCU-PH) assistée par une technicienne du LCBGM et moi-même. La première étape de ce processus est le dépôt du dossier auprès de l'organisme d'accréditation Français, le COFRAC. Le but de ce mémoire est donc de faire un rapport du travail effectué en amont de ce dépôt de dossier.

### ***2.3 Choix du sujet et objectifs***

Le génotypage du VIH ou « test génotypique du VIH » est une technique très importante permettant d'identifier les mutations de résistance associées aux antirétroviraux (anti-VIH) présentes dans les gènes du VIH, en particulier la transcriptase inverse (TI), la protéase, l'intégrase et la boucle V3 de la gp120. Il permet ainsi d'obtenir des informations sur la susceptibilité du VIH à ces antirétroviraux afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique du patient qu'il soit ou non sous traitement antirétroviral. Cette analyse fait partie des activités de routine au LCBGM pour le compte de l'unité de virologie de Saint-Antoine. Ainsi, pour respecter la législation relative à la biologie médicale via l'ordonnance n°2010-49 de janvier 2010, le laboratoire va déposer un dossier auprès du COFRAC pour l'accréditation en portée B de son activité de génotypage VIH sur plasma par deux techniques.

### 3 METHODOLOGIE

Dans le cadre des démarches pour le dépôt de dossier de cette demande d'accréditation, la biologiste responsable du génotypage VIH-1 au sein de l'unité a organisé plusieurs réunions sur le sujet afin de recueillir les expériences de personnes ayant déjà participé aux démarches d'accréditation de façon générale au sein de notre service et/ou pôle. Nous avons également participé à des réunions « grand-public » avec des retours d'expériences des laboratoires déjà accrédités pour le génotypage de résistance du VIH-1. Nous avons également rencontré notre responsable qualité pour valider notre démarche. Ces différentes réunions nous ont permis d'adopter une conduite à tenir dans la réalisation de nos différentes actions à mener pour la constitution du dossier à déposer.

Nous avons dégagé trois grands axes de travail en vue du dépôt du dossier de demande d'accréditation du génotypage VIH-1. Il s'agit de :

- la formation et l'habilitation du personnel
- le système documentaire
- le dossier de vérification des méthodes avec la maîtrise des phases pré, per et post-analytiques ainsi que la gestion des contrôles (CIQ et EEQ).

Pour travailler sur ces trois axes, nous nous sommes servis de l'outil de qualité PDCA (Plan ou planifier, DO ou faire, Check ou vérifier et Act ou agir) au niveau chaque axe comme suit :

**Plan :** Nous avons planifié les différentes actions à mener : qui fait quoi, quand et comment....

**Do :** Il s'agissait d'identifier les manipulations à réaliser et surtout de s'organiser avec la cadre du LCBGM afin de libérer la technicienne qui était chargée de la réalisation de certaines techniques /manipulations pour notre validation de méthode.

**Check :** Il s'agissait de faire un état de lieux dans notre logiciel de qualité « kalilab » sur la gestion des ressources humaines (habilitation, gestion des compétences...), sur le système documentaire (les procédures disponibles ou manquantes, les non conformités, documents nécessitant des mises à jour....) et aussi de vérifier que les différentes actions critiques ont été prise en compte dans en amont pour la validation de méthode.

**Act :** Cet outil nous a permis à travers les actions à réaliser, d'élaborer une analyse de risque en tenant compte de toutes les procédures du pré, au post analytique en passant

par les processus analytiques. Cette analyse de risque avait pour but de permettre à chaque étape (de la réception des prélèvements au laboratoire, au rendu des résultats du génotype de résistance aux cliniciens) d'identifier les risques qui peuvent interférer sur le bon déroulement de l'analyse et de proposer des moyens de leur maîtrise.

### **3.1 Formation et habilitation du personnel**

Selon la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.1- Personnel), les Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) sont tenus de s'assurer que l'ensemble du personnel est formé et habilité aux tâches exercées selon des dispositions pré-établies et des critères objectifs, et que cette habilitation soit périodiquement revue.

Dans le cadre de ce travail, les personnes concernées par cette formation/habilitation sont les techniciens du LCBGM (personnel de la paillasse génotypage, gestionnaire du séquenceur), la cadre paramédical de pôle, les biologistes du secteur et toutes les personnes pouvant être impliquées dans le secteur du génotypage de résistance aux antirétroviraux du VIH.

Selon le processus d'habilitation du manuel d'assurance qualité du pôle, cette habilitation se fait en deux phases (habilitation initiale et habilitation continue) et sa gestion s'effectue dans le logiciel qualité Kalilab selon un mode opératoire établi. Les différentes étapes d'intégration d'un biologiste, d'un technicien ou d'un agent à sa prise de poste et les modalités de maintien des compétences des personnels sont décrits dans un document dénommé gestion de l'habilitation du personnel accessible dans le logiciel qualité du pôle (Kalilab) « *EP-HUEP-PLUS-ORP-PT-001* » (Annexe 1).

Au LCBGM, chaque personnel doit avoir été habilité par le responsable médical d'unité pour tenir son poste de travail. Cette habilitation d'une durée de 18 mois est soumise à la révision des compétences périodiquement.

- **Habilitation initiale**

Dans cette première phase, le nouvel arrivant est tout d'abord formé par un tuteur à occuper un poste de travail en respectant les étapes définies dans une grille de formation.

A l'issue de la période de formation dont la durée varie en fonction des postes, la grille de formation est validée par le tuteur, le biologiste responsable d'unité (pour les techniciens et biologistes/ internes) ou par le cadre (pour les agents) et lui-même. La traçabilité des actions réalisées pendant la période de formation est à conserver (exemples : n° de dossiers enregistrés, références des CQ passés...) ainsi que la traçabilité d'occupation des postes en double avec le tuteur avant l'habilitation. La grille de formation est alors scannée et intégrée dans le dossier de l'agent dans Kalilab.

- **Maintien des compétences**

Pour le maintien des compétences, chaque unité définit la périodicité d'occupation d'un poste de travail par un personnel formé ainsi que les critères permettant de valider le maintien des compétences lesquels sont ensuite intégrés dans Kalilab. Les critères de maintien des compétences doivent comprendre obligatoirement la durée d'occupation du poste, pas d'absence > 6 mois et autres critères qualitatifs et quantitatifs jugés obligatoires pour assurer le maintien de l'habilitation. En cas d'absence supérieure à 6 mois, l'habilitation est suspendue et l'agent doit être à nouveau habilité.

## **3.2 Le système documentaire**

Cette partie se confère à la norme NF EN ISO 15189 § 4.2 – Système de management de la qualité et § 4.3 – Maitrise des documents.

Le système documentaire en place au laboratoire LCBGM est géré par le logiciel Kalilab. Dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à la vérification de certains documents clés et spécifiques en rapport avec l'activité à accréditer. Certains documents techniques manquants ont été relus et/ou intégrés dans Kalilab.

### **▪ Documents techniques :**

Selon les procédures générales du système documentaire du pôle, chaque processus du laboratoire doit être décrit par une procédure générale. On trouve dans cette partie de Kalilab :

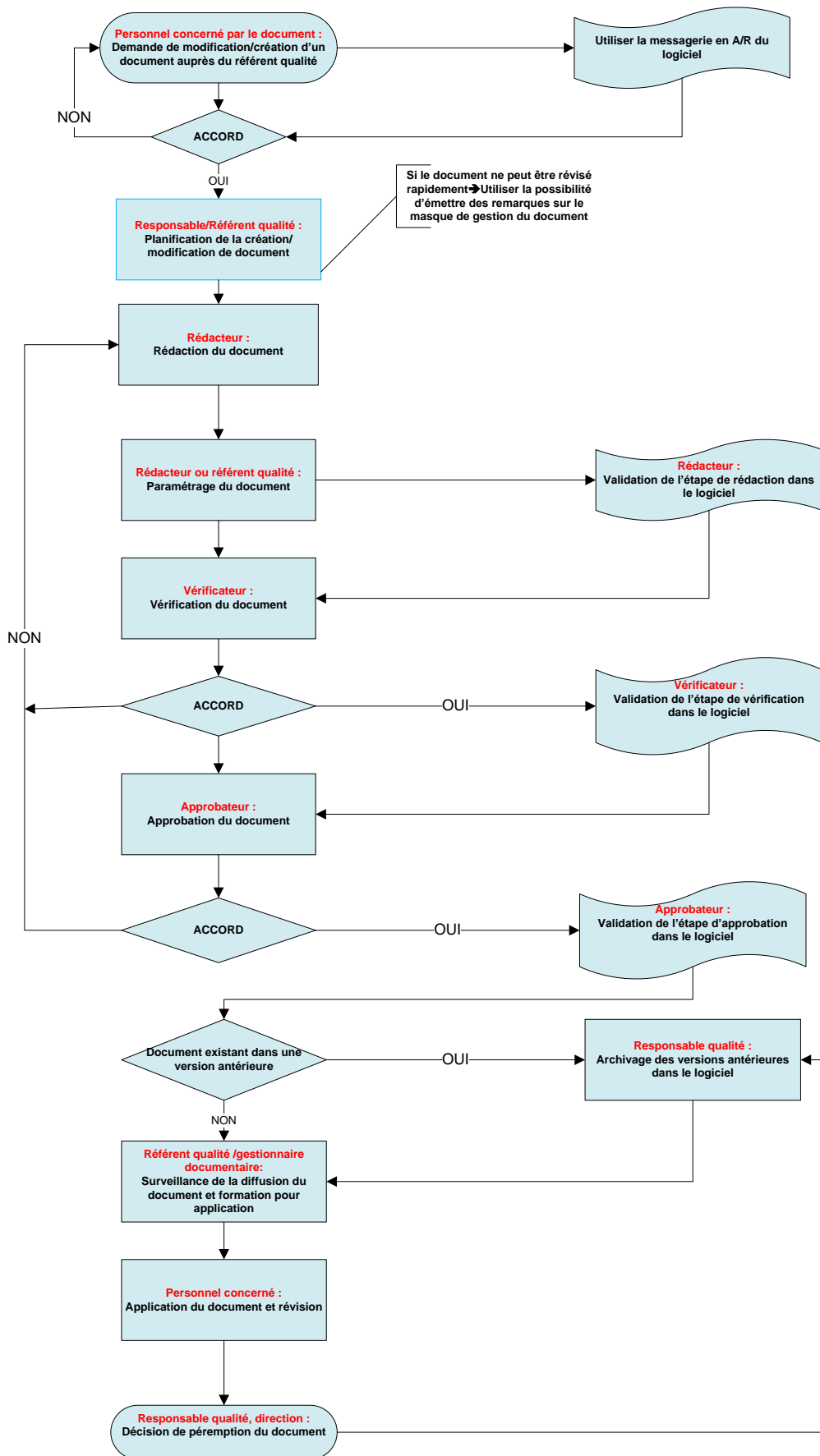
- une procédure expliquant les modalités d'habilitation et de maintien des compétences de l'ensemble du personnel du Laboratoire
- les procédures relatives aux documents techniques pour différentes analyses
- les procédures relatives au dossier de vérification des méthodes traitant des « incertitudes de mesure » et des modalités de « vérification/validation des méthodes »
- les procédures relatives à l'analytique rappellent les principes de « Maintenance », de la « Vérification analytique – Gestion des CQ et des calibrations » et la « Vérification technique ».
- la procédure informatique, « Maitrise du système informatique de Laboratoire »
- la procédure relative à la « Gestion des enregistrements et archivage » .....

### **▪ Responsabilités dans le cycle de vie d'un document dans le système documentaire**

Tous les documents disponibles dans le système documentaire suivent un cycle de vie dans le logiciel Kalilab avec à chaque étape des responsabilités définies pour le personnel impliqué (figure1 : Méthodologie pour gestion du système documentaire).

Les différentes actions et responsabilités sont :

- **Rédaction** : par les personnes ayant l'expérience et les compétences nécessaires dans la réalisation des tâches concernées.
- **Vérification** : par les personnes compétentes et responsables de l'application des documents (exemple : Biologiste responsable s'il s'agit d'un examen ou ensemble d'examens) – correspond à l'acceptation de son contenu par des personnes maîtrisant le sujet concerné.
- **Approbation** : par un responsable ou référent qualité - correspond à vérifier la cohérence du document par rapport à l'organisation documentaire du système qualité, sa conformité aux exigences normatives, son contenu et sa mise en place.
- **Diffusion** : par un responsable/référent qualité ou gestionnaire de documents aux personnes concernées par le document – avant la diffusion d'un document, la date d'application est définie: idéalement celle-ci intervient 15 jours après la diffusion pour une meilleure appropriation.
- **Revue**: La périodicité de revue est de 2 ans avec une alerte dans kalilab à 18 mois. Certains documents peuvent toutefois être revus selon une périodicité < 2 ans selon les dispositions définies dans les unités. Le rédacteur ou le vérificateur est alors en charge de relire le document et de le réviser si besoin.
- **Archivage** : Chaque version retirée est archivée sous format électronique dans Kalilab. Un document archivé n'est plus accessible aux utilisateurs, une fois que la date d'application définie pour la nouvelle version est atteinte. Les versions archivées sont identifiées (titre en gras) et toujours accessibles dans l'administration des documents pour les administrateurs, responsables/référents qualité et gestionnaires de documents.



- **Maitrise du système documentaire :**

Les différentes étapes du cycle de vie d'un document dans le logiciel Kalilab font l'objet d'alertes par messagerie pour les personnes concernées. La proposition de documents par un tiers du service apparaît sur l'écran d'accueil des personnes ayant les droits de gestion documentaire dans Kalilab. Les modifications de documents sont possibles et se font selon le même circuit que la rédaction initiale (rédaction, vérification, approbation, diffusion). Elles peuvent être demandées à tout moment, aux responsables/référents qualité ou aux gestionnaires de documents par toute personne du laboratoire, ou lors des révisions.

### ***3.3 Elaboration du dossier de validation des méthodes***

Afin de respecter, les exigences du ch 5.5.1 des normes NF EN ISO 15189 & 22870 et ch 5.4.1 de la norme NF EN ISO/CEI 17025, les laboratoires doivent rédiger une procédure générale de vérification/validation des méthodes quantitatives et qualitatives précisant leurs démarches et conserver les données expérimentales établies sur site dans le cas d'une portée de type A et/ou de type B.

Dans ce travail, il s'agit du dépôt de dossier pour l'accréditation du génotypage du VIH sur le plasma par 2 techniques différentes (un kit commercial avec marquage CE mais adapté, Kit Viroseq et une technique ANRS dite « maison ») en 3 sous processus (Extraction de l'ARN du VIH1, l'amplification et la réaction de séquence). Il s'agit donc d'une méthode en portée B de type qualitative avec comparaison de méthodes. En effet, le génotypage correspond à la recherche d'une mutation par séquençage selon la méthode de Sanger, laquelle est considérée comme relevant d'une méthode qualitative car il s'agit ici de détecter la présence d'une variation qualitative de séquence nucléotidique par rapport à une séquence de référence.

Le dossier de vérification des méthodes comme recommandé par le COFRAC a été élaboré en remplissant le SH FORM 43 « Fiche type quantitatif : Vérification (portée

A) / Validation (Portée B) d'une méthode de Biologie médicale », en ne tenant compte que de la validation de méthode (portée B).

Pour se faire, nous avons adopté 3 sous processus (extraction de l'ARN, amplification et séquençage) pour la validation de méthode de nos 2 techniques.

Puisque, l'activité était opérationnelle dans le laboratoire depuis longtemps avec des CIQ et des EEQ conformes, il n'y avait pas de décision à prendre quant à la validation opérationnelle de la technique. Cependant, afin de mieux renseigner le SH form 43, nous sommes partis des recommandations de l'ANPGM avec la proposition des points suivants qui devront être renseignés pour une validation optimale des méthodes :

1. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire ; domaine d'application et le but de la validation de méthode pour chaque sous processus
2. Liste des critères de performance à vérifier/évaluer
3. Vérification bibliographique sur les techniques utilisées
4. Analyse de risques avec le calcul de la criticité
5. Plan d'expérience et mise en place des CIQ ainsi que leurs suivis dans le laboratoire
6. Compilation des données obtenues (résultats des CIQ, EEQ à disposition dans le laboratoire)

Par ailleurs, pour évaluer les critères de performance de notre activité à accréditer, nous avons travaillé sur le modèle que notre GH a mis à disposition sur les méthodes qualitatives (voir Tableau 1). En fonction de la nature du sous-processus, du caractère qualitatif de la méthode et du type de portée B, nous avons déterminé avec la biologiste référente du génotypage VIH-1, les critères à évaluer ainsi que leurs modes d'évaluation. Le choix de ces critères était fait sur la base de retours d'expériences d'autres laboratoires accrédités sur le sujet et sur les données bibliographiques en rapport avec la norme NF EN ISO 15189 (ci-dessous le tableau récapitulatif de ces critères selon le manuel qualité de notre pôle).

**Tableau 1. Elaboration de la documentation sur la validation de méthode**

Paramètres	Bibliographie		Tests sur site en portée B
<b>Fidélité :</b>			
<b>Répétabilité</b>	OUI		OUI
<b>Fidélité intermédiaire (Reproductibilité)</b>	OUI		OUI
Approche de la justesse par biais CIQ externalisé et Inexactitude par biais EEQ/CNQ	OUI		OUI
<b>Incertitude de mesure et facteurs de variabilité</b>	OUI – facteurs de variabilité	OUI – Maitrise des facteurs de variabilité	
Corrélation / Comparaison de méthode (appareil en miroir / EBMD...)	OUI si fourni		OUI
<b>Domaine d'analyse / Intervalle de mesure</b>			
<b>Limite de détection</b>	OUI		OUI
<b>Interférences (Ictère, Hémolyse, Lipémie, Autre)</b>	OUI		OUI
Contamination inter échantillons et inter réactifs (s'il y a lieu).	OUI		OUI
<b>Robustesse</b>	OUI		OUI
<b>Stabilité (après ouverture, embarqué) :</b>			
<b>Réactifs</b>	OUI		OUI
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	OUI		OUI
Spécificité/Sensibilité analytique	OUI		OUI
Variabilité inter-opérateur	/		OUI

- **Gestion des contrôles de qualité : CIQ et EEQ**

La gestion de contrôle de qualité dans un processus d'accréditation est très importante. Elle permet une surveillance régulière du fonctionnement des instruments, des réactifs et des systèmes analytiques notamment au travers des CIQ. Par exemple, le passage régulier d'une séquence contrôle ou d'un marqueur de taille peut permettre de contrôler les performances des appareils et de la technique. Ces contrôles sont très importants dans le suivi des performances des processus analytiques lesquelles sont initialement vérifiées/validées avant la mise en service et/ou la mise sous accréditation de l'examen. Par la suite, le laboratoire doit donc réaliser un suivi de ces performances

fondé essentiellement sur les résultats des CIQ, CIQ « externalisés » et EEQ. Les critères de ce suivi sont précisés au niveau de chaque unité ou secteur du laboratoire par des dispositions spécifiques (périodicité, critères de conformité, conclusions, actions correctives, fiche de traçabilité). Ces dispositions dépendent du caractère qualitatif ou quantitatif de l'examen et au type de portée flexible concerné. Les rapports de suivi doivent être visés par les responsables du processus analytique concerné et/ou les biologistes référents.

- **Analyse de risques des 3 processus** (extraction, amplification et séquençage)

Les risques potentiels dans un laboratoire de biologie médicale sont de fournir des résultats erronés, trop tardifs, inexacts ou accompagnés d'une interprétation inappropriée pouvant avoir un impact sur le diagnostic ou le traitement médical. La gestion des risques de chaque processus comporte plusieurs étapes : - l'identification des risques potentiels ; - l'estimation du risque (gravité, fréquence et détectabilité) c'est-à-dire sa criticité et - la maîtrise du risque. La nature des méthodes d'essai qualitatives comme dans notre activité ici présentée, exclue un calcul de l'incertitude de mesure, les principales composantes de l'incertitude doivent donc être identifiées grâce à cette analyse des risques. En effet, il s'agit d'analyser les processus de réalisation de l'examen afin d'identifier les points critiques et de proposer des actions pour les prévenir et/ou de les maîtriser. Ainsi, pour respecter les exigences normatives et en particulier celles du ch.4.14.6 de la norme NF EN ISO 15189, nous avons réalisé cette analyse de risque afin d'identifier les risques potentiels et mettre en place des actions pour réduire et/ou éliminer ces risques.

Le génotypage de résistance aux antirétroviraux du VIH-1 est une technique complexe nécessitant plusieurs étapes successives qui peuvent être manuelles ou automatisées (figure 3).

Pour effectuer notre étude de risque pour les 2 techniques de génotypage du VIH-1, nous avons utilisé la cartographie décrite ci-dessous (figure 2) de notre pôle couplée

aux étapes de réalisation du génotypage (figure 3) pour l'identification et la maîtrise des risques aux différentes étapes. La méthode des 5 M comme outil de qualité a été utilisée au niveau des 3 sous-processus pour l'élaboration de cette analyse de risque. Il s'agissait des modalités de description du processus analytique du prélèvement au compte-rendu des résultats, étape par étape (phase pré-analytique ; les différentes étapes de la méthode : manuelle/automatique, processus simple/complexe ; post-analytique : rendu des résultats et archivages des données).

Figure 2. Cartographie des processus au HUEP

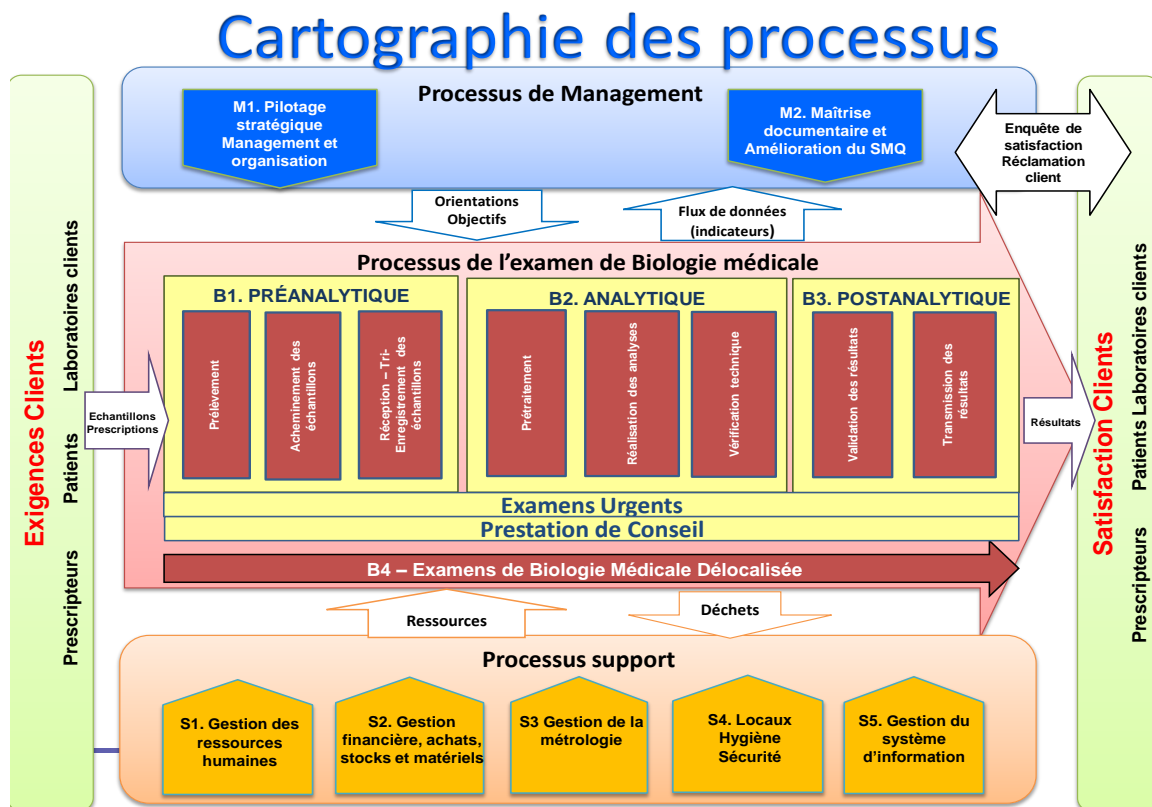
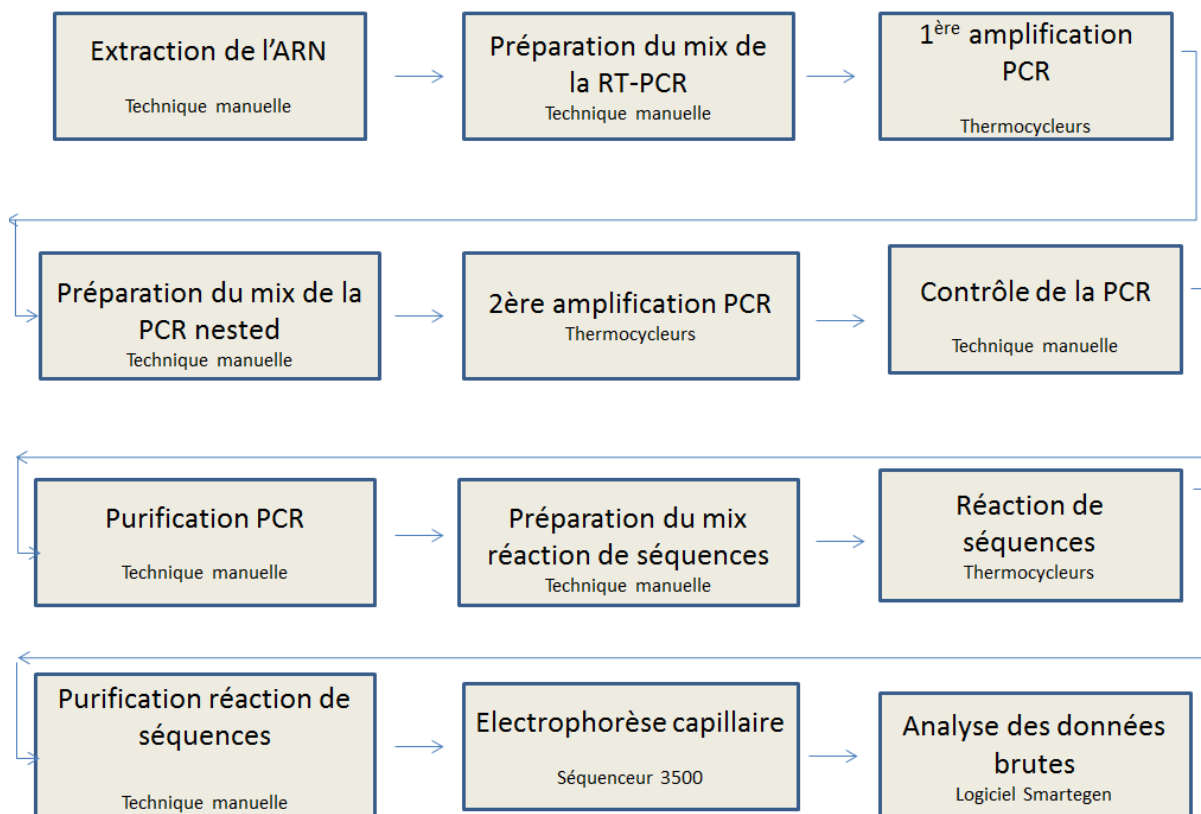


Figure 3. Etapes de la réalisation du génotypage du VIH au LCBGM



## 4 REALISATIONS / COMMENTAIRES

### ***4.1 Retour des laboratoires déjà accrédités en génotypage de résistance aux antirétroviraux du VIH***

La biologiste référente, une technicienne du LCBGM (référente du secteur génotypage de résistance du VIH-1) et moi-même avons participé à 2 réunions de retour d'expériences des laboratoires accrédités pour le génotypage du VIH-1, une sur la technique commerciale (VIROSEQ) et l'autre sur la technique ANRS dite « maison ». La participation de notre laboratoire à ces différentes réunions était importante car nous utilisons simultanément ces 2 techniques. Ces réunions nous ont permis d'identifier les différents points-clés à aborder pour renseigner le dossier SH form 43 et de définir le processus de préparation en vue d'une visite d'évaluation du COFRAC. Ainsi, nous avons planifié très rapidement et sans grande difficulté les manipulations techniques à effectuer pour la validation de méthode pour nos 2 techniques.

Au sortir de ces réunions d'expériences et d'information, nous avons défini 3 axes principaux sur lesquels il fallait travailler pour répondre aux exigences réglementaires. Il s'agissait de l'habilitation du personnel, de la gestion du système documentaire et de l'élaboration du document de validation de méthode proprement dit (ici en portée B). Pour optimiser ce travail, nous avons utilisé l'outil de qualité PDCA décrit plus haut au niveau de chaque axe.

### ***4.2 Etat d'avancement de l'habilitation du personnel***

Il s'agissait de faire un audit sur l'effectivité de cet axe en vérifiant la présence de certains documents (comme les grilles de formation pour les techniciens et les biologistes, les modalités d'habilitation et de maintien des compétences) afin de minimiser les possibles écarts qui pourront nous être reprochés.

Le LCBGM étant découpé en différents secteurs d'activités au sein desquels sont définis un ou plusieurs postes de travail, les techniciens assurent par rotation les différents postes de travail selon un planning établi par le cadre de l'unité et en fonction

de leurs compétences. A ce titre, il existe une procédure d'habilitation générale du personnel technique, commune pour tous les secteurs car partageant les mêmes pièces et les mêmes techniques de la biologie moléculaire. Cependant, il existe des grilles de formation pour certains secteurs spécifiques comme celui du génotypage du VIH en reprenant les items dont la connaissance est indispensable pour assurer cette activité. Cette habilitation est faite de façon échelonnée par niveau jusqu'au niveau référent (annexe 1).

La procédure générale d'habilitation a été mise à jour. Il y a 2 cas possibles :

- Pour les techniciens formés avant la mise en place de ces grilles, la durée de formation en binôme avec le référent peut être retrouvée à l'aide des plannings de paillasse. Dans ce cas, les grilles d'habilitation sont complétées par les techniciens sous forme d'autoévaluation sans mention de tuteur lors des entretiens d'évaluations annuelles, puis validées par le responsable médical d'unité.
- Pour les techniciens formés après la mise en place de ces grilles. ?et donc pour eux ?

L'habilitation est prononcée pour une durée de 18 mois maximum. L'accréditation des quantifications virales pour les virus VIH, VHB et VHC depuis 2015 a permis au LCBGM de rester dans cette logique de suivi des compétences, bien que nous avons pu constater l'absence de certaines mises à jour, dans le suivi des compétences, et d'y remédier.

#### ***4.3 Etat des lieux du système documentaire en rapport avec le sujet***

Le logiciel de gestion documentaire Kalilab a été adopté par le laboratoire depuis quelques années, c'est un outil performant qui nous a permis de faire l'état des lieux des documents en rapport avec l'activité du génotypage du VIH (procédures techniques ou modes opératoires manquants ou incomplètes, les matériels utilisés, les fiches fournisseurs pour réactifs et équipements....). Cependant, il faut reconnaître que la maîtrise de l'utilisation de ce logiciel par les différents acteurs du laboratoire reste un point d'amélioration important. Cela pourrait aussi expliquer la lenteur de la mise à disposition de certains documents dans ce logiciel. Suite à notre vérification

documentaire et surtout notre intervention auprès de certains acteurs, des mises à jour ont pu être effectives et des procédures manquantes sont en cours de rédactions, ce qui permettra une amélioration continue du système de qualité. Cependant, il manque encore des actions d'approbation et de diffusion pour certains documents importants.

#### ***4.4 Rédaction du SH form 43 sur le dossier de validation des méthodes des techniques de génotypage de résistance aux antirétroviraux du VIH-1 sur le site de Saint-Antoine avec l'analyse de risque et calcul de la criticité.***

Ce document pose les principes généraux de validation de la méthode de séquençage, qui s'appuient sur les documents du Cofrac : méthode qualitative à éléments quantifiables. La biologiste référente du secteur avait en charge le renseignement de ce document SH FORM 43 pour la validation/vérification de méthode. Elle a, à chaque fois argumenté le choix des critères pertinents maintenus sur la base d'expérience des laboratoires accrédités et des recommandations de sociétés savantes de la discipline.

Les applications du séquençage étant multiples dans notre laboratoire, pour simplifier le travail de constituer un futur dossier pour une portée flexible, nous avons choisi de réaliser une validation de méthode selon les trois sous-processus qui correspondent aux différentes étapes du séquençage de Sanger. Ces sous-processus comprennent l'extraction des acides nucléiques (comme l'ARN ou ADN), l'amplification (y compris la vérification et la purification des PCR) ainsi que les réactions de séquence (sa purification et son mode d'analyse sur le séquenceur), (annexe 2).

Le sujet de ce mémoire portant sur le dépôt de dossier pour l'accréditation du génotype de résistance du VIH-1 par séquençage de la reverse transcriptase (RT), de la protéase, de l'intégrase et de la gp120 dans le plasma, le SH form 43 a été renseigné pour tous les critères de performances choisis et cela pour chaque sous-processus suivant :

- Sous-processus 1 : Extraction commune de l'ARN du VIH-1 pour les 2 techniques,

- Sous-processus 2 : Amplification des gènes de la RT, de la protéase, de l'intégrase et de la gp120, en utilisant des amorces spécifiques pour chaque technique.
- Sous-processus 3 : Réaction de séquence réalisée avec le kit viroseq marqué CE mais adapté et la technique « maison » ANRS.

Conformément au document SH GTA 04, le dossier contenait les items suivants :

- La mise en œuvre expérimentale dans le laboratoire des différentes manipulations réalisées dans le cadre de la validation de méthode par les techniciens afin d'évaluer nos critères de performances maintenus.
- Vérification bibliographique (pour le kit Viroseq et les réactifs de la technique ANRS dite « maison »)
- Présentation du processus analytique des-sous-processus (méthodes et éléments à vérifier et/ou valider).
- Analyse et maîtrise des risques ont été utilisées pour décrire le critère d'incertitude (ou estimation de risque résiduel)
- Conclusion quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des critères de performances évaluées.

Nous avons évalué les critères de performances analytiques de la méthode en particulier la fidélité intermédiaire, les tests de répétabilité et les tests d'exactitude, la sensibilité/spécificité, la contamination, la robustesse et la comparaison de méthodes. Pour déterminer ces critères de performances de deux techniques, nous avons utilisé 40 types d'échantillons contrôles différents.

Chacun de ces critères a été décrit dans le « SH form 43 rev1 15 Avril 2015 » après une série des résultats de manipulation ainsi que leurs preuves de conformité.

Brièvement pour la fidélité intermédiaire, et la comparaison de méthodes, nous avons utilisé un échantillon positif contrôle CIQ fabriqué dit « maison » (fiche de fabrication disponible).

Pour les tests de répétabilité, nous avons utilisé le contrôle interne du Kit ViroSeq HIV-1 Genotyping System car nous avons besoin d'une grande quantité d'échantillons pour nos tests et le CIQ est passé à chaque série.

Pour les tests d'exactitude, nous nous sommes servis du panel d'évaluation externe de qualité EEQ de l'ANRS sur les 4 dernières années.

Par ailleurs, certains critères de performance n'ont pas été évalués dans la validation de nos méthodes. Nous avons à chaque fois donné l'argument précisant l'absence d' évaluation. Ils s'agissaient de:

- la justesse : en raison de l'absence de CIQ externalisé avec comparaison inter laboratoires et de l'interprétation qualitative des résultats,
- la limite de détection, car pour les méthodes qualitatives, la limite de détection correspond au seuil de positivité. Dans le cas du génotypage VIH, la technique est tentée quelle que soit la charge virale VIH-1 au-dessus du seuil de détection (>20 copies/mL),
- l'interférence : nous n'avons pas réalisé de tests dans notre laboratoire car les autres interférences possibles sont des inhibiteurs de PCR et la présence d'autres virus. Concernant la présence d'autres virus : les notices fournisseurs Viroseq indiquent que la présence de virus apparentés ou non au VIH-1 n'affecte pas la performance du test et n'altère pas la spécificité du kit pour la détection de mutations de résistance du VIH-1 aux antirétroviraux,
- l'intervalle de référence, car elle est non applicable en virologie.

Nous avons réalisé notre étude de risques pour la validation du séquençage par la méthode de Sanger selon la méthode des 5M pour chacun des 3 sous processus (annexe 3). Pour chaque sous-processus, nous avons identifié les points critiques, les éléments à maîtriser et les moyens mis à disposition pour prévenir et ou maîtriser ces risques. Ceci a été répété pour les 5M : la Matière (échantillons), Milieu, Matériels, Méthodes et Main d'œuvre en fonction des spécificités des 3 sous-processus renseignés.

La compilation et le traitement statistique des données obtenues lors de différentes techniques, ont permis de nous fournir une base de preuve pour le bon déroulement et surtout de la validité de nos méthodes évaluées. Cette compilation a notamment concerné les réalisations techniques et la gestion des contrôles (CIQ et EEQ),

lesquelles ont générées beaucoup de données (preuves des photos de gel et séquences issues du logiciel d'alignement, Smartegen®). Nous avons fabriqué et validé notre CIQ maison à partir du plasma EDTA d'un patient en primo-infection VIH (numéro 1704071369). Ainsi, notre CIQ a été extrait 40 fois à 40 dates différentes comme des échantillons et avec cinq opérateurs différents habilités, avec quatre lots différents du Kit ViroSeq HIV-1 Genotyping System et nous avons obtenu à chaque fois la séquence attendue (dans le logiciel smartgene®) quel que soit le critère changeant. Pour le EEQ, le laboratoire est inscrit à un programme national de contrôle qualité auprès de l'ANRS. Dans ce travail, nous avons exploité les résultats des EEQ des quatre dernières années. La lecture, l'interprétation et le rendu à l'ANRS des EEQ ont été vérifiés par deux biologistes habilités.

#### **4.5 *Audit interne***

Afin de vérifier notre processus de préparation pour le dépôt de ce dossier. Notre responsable qualité a planifié un audit interne dans le secteur du génotypage de résistance du VIH-1. Cet audit interne a eu lieu mi-juillet. Il nous a permis de relever des insuffisances qui devront être corrigées avant le passage des évaluateurs du COFRAC.

De cet audit, il est ressorti qu'il manquait des documents référencés dans Kalilab et surtout des manques de traçabilité d'habilitations pour le personnel médical (annexe 4).

#### **4.6 *Difficultés rencontrées/Recommandations***

Les différentes manipulations techniques ont pu être réalisées afin de renseigner le SH form 43 sans grande difficulté grâce aux retours d'expériences des laboratoires déjà accrédités pour l'activité de génotypage de résistance du VIH, aux recommandations sur les dossiers de vérification/validation de méthodes de portée A/B que nous avons consulté et aussi grâce à l'accompagnement de notre responsable qualité. Cependant, les deux autres axes de notre travail c'est-à-dire

l'habilitation du personnel (surtout à formaliser pour le personnel médical) et leur suivi de maintien des compétences (pour le personnel non médical) ainsi que la disponibilité de certains documents clés (certains encore non référencés) dans Kalilab restent des points importants d'amélioration. Le personnel doit également être sensibilisé à l'utilisation du logiciel Kalilab par les personnes référentes car très peu de personnes sont vraiment à l'aise vis-à-vis de ce logiciel et du système documentaire.

## 5 CONCLUSION

L'objectif de ce mémoire était une aide à l'élaboration d'un dossier pour l'accréditation de l'activité de génotypage du VIH-1 dans le laboratoire de virologie à l'hôpital Saint-Antoine et son dépôt auprès du COFRAC afin de satisfaire aux exigences de la norme NF ISO 15189. Le travail a été structuré autour de 3 axes : la formation/habilitation du personnel, la vérification du système documentaire ainsi que l'élaboration du dossier de vérification/validation de méthode en remplissant le SH form 43 du COFRAC. Toutes les exigences techniques pour le renseignement du SH form 43 ont pu être satisfaites et le dossier prêt à être déposé. Cependant, les points relevés lors de l'audit interne notamment sur habilitation du personnel et de certains documents non référencés dans Kalilab doivent être améliorés très rapidement pour parvenir à l'efficacité de nos missions avant le passage des évaluateurs du COFRAC.

Par ailleurs, ce travail m'a permis de mettre en pratique les notions théoriques apprises lors de cette formation de DU d'assurance qualité en laboratoire de biologie médicale. Ainsi, j'ai pu aider à l'élaboration de notre dossier de demande pour l'accréditation de l'activité du génotypage de résistance du VIH-1 à Saint-Antoine. Je compte également m'impliquer dorénavant dans toutes les activités qualité au sein de notre service.

## 6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Norme EN ISO 15189/2012-12, Laboratoires de biologie médicale Exigences concernant la qualité et la compétence, [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).
- Document de référence SH REF 02, Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de Biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189:2012, Révision : #04 - 10/2013, Date de publication : 11/10/2013, [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).
- Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, NOR: MESP9923609A, Version consolidée au 05 mai 2002, <http://www.legifrance.gouv.fr>.
- SH FORM 03, Questionnaire d'auto-évaluation - Préparation de l'évaluation sur site selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012, Révision : #02 - 01/2014, Date de publication : 27/01/2014, [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).
- ANPGM : Association nationale des praticiens de genétique moléculaire

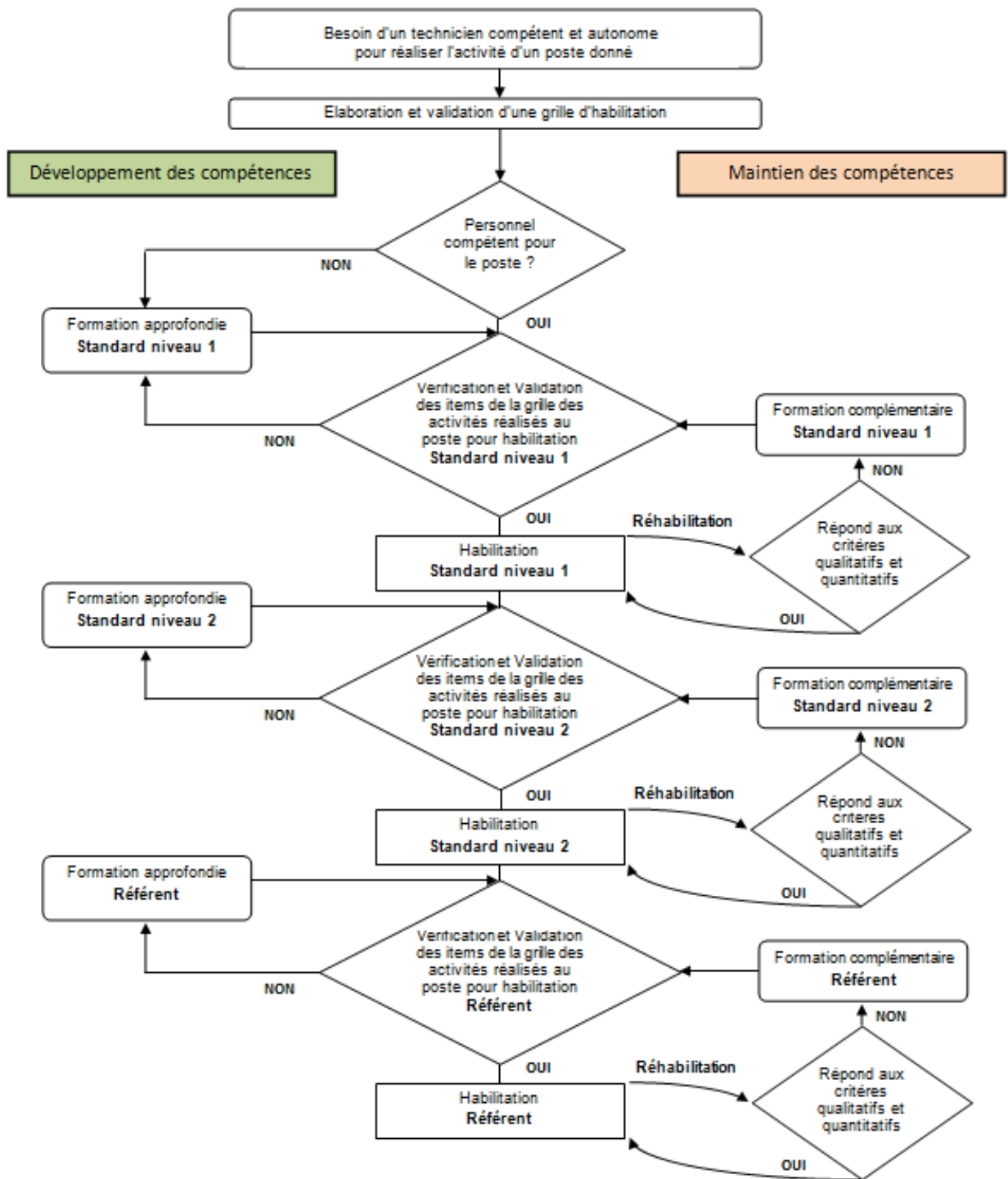
Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations.

- SH FORM 43 [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)
- GTA 04 [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)
- Documentation KaliLab, [www.netika.net//kalilab](http://www.netika.net//kalilab).
- Manuel Qualité du pôle
- Performance of the applied biosystems ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for sequence-based analysis of HIV-1 in pediatric plasma samples. Cunningham S, Ank B, Lewis D et al. *J Clin Microbiol.* 2001 Apr;39(4):1254-7.
- Performance of two commercially available sequence-based HIV-1 genotyping systems for the detection of drug resistance against HIV type 1 group M subtypes. Beddows S1, Galpin S, Kazmi SH et al. *J Med Virol.* 2003 Jul;70(3):337-42.
- Comparison of a Laboratory Developed protocol for HIV Genotyping using SmartGene® HIV-1 Reporting compared to ViroSeq HIV-1. GT Hansen, A. Dahl, T. Gooch, D. Hirigoyen, and J. Trapp. Poster presented at the Annual Meeting of the Association for Molecular Pathology, AMP2016, Charlotte, NC, November 2016.

## 7 ANNEXES

Annexe 1	Logigramme d'habilitation des techniciens au LCBGM	29
Annexe 2	Renseignement du SH form 43 par sous processus	30
Annexe 3	Document analyse de risque	33
Annexe 4	Compte rendu audit interne	35

# Annexe 1 : Logigramme d'habilitation des techniciens au LCBGM



Annexe 2 : Renseignement du SH form 43 par sous processus



## Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

### SOUS-PROCESSUS 1 : Extraction de l'ARN du VIH-1

Portée A  ; Portée B  Technique d'extraction du kit Viroseq HIV-1 Genotyping system adaptée en fonction de la charge virale du prélèvement :  
 -Adaptation du volume de la prise d'essai variant entre 0.5 et 1.5 ml  
 -Adaptation du volume de tampon d'élution variant de 30 à 100µL.



### DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte / Mesurande :	Cf. §G.2.2. du SH GTA 04 <a href="#">Extraction de l'ARN du VIH-1</a>
Principe de la Methode :	Cette information est retrouvée sous le terme de « principe général des techniques » dans le SH INF 50 (colonne « principe de la méthode ») VB1 : Cartographie d'acides nucléiques (séquençage, amplification, hybridation, ...) – Biologie moléculaire Extraction par lyse puis précipitation
Type d'échantillon primaire :	Plasma
Type de récipient, additifs :	Préciser le type de contenant : tube/additif/présence ou non d'un séparateur, flacon/milieus de transport, écouvillon...  NA
Prétraitement de l'échantillon :	Centrifugation de tube EDTA pour récupérer le plasma
Unités :	Mode d'expression du résultat (unités, ratio, ...)  NA
Critères d'interprétation* :	Obtention d'un produit de la taille attendue (1800pb et 1100 pb) et/ou obtention de la séquence attendue
Marquage CE (Oui/Non) :	Marquage CE (Oui mais adapté)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Consulter le site de <a href="#">l'ANSM</a> NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	marque, modèle, référence Centrifugeuse ?
Référence du réactif :	<a href="#">Kit Viroseq HIV-1 genotyping system V2.0 (Abbott)</a> <a href="#">Ref 4J94-94</a>
Matériau d'étalonnage (références) :	Raccordement métrologique Non ?
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Méthode qualitative

### MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Dr Sidonie LAMBERT Dr Djeneba FOFANA Luis Chan
Procédure de validation/mode opératoire :	<a href="#">référence et version de la procédure utilisée</a>
Procédure de gestion de la portée flexible :	<a href="#">référence et version de la procédure utilisée</a>
Période d'étude :	<a href="#">Du 01.08.2017 au 30.06.2018</a>

**SOUS-PROCESSUS 2 : Amplification des gènes de la RT, de la protéase, de l'intégrase et de la gp120**

Portée A  ; Portée B  Kit ViroSeq HIV-1 Genotyping System adapté adapté en fonction de la charge virale du prélèvement :  
Purification des produits de PCR avec plaque MSNU 3050 et non purification enzymatique.  
  
et comparaison de méthode avec la technique maison ANRS

**DESCRIPTION DE LA METHODE**

Analyte / Mesurande :	Cf. §G.2.2. du SH GTA 04  Amplification des gènes codant la RT, la <u>protéase</u> , l'intégrase et de la gp120
Principe de la Méthode :	Cette information est retrouvée sous le terme de « principe général des techniques » dans le SH INF 50 (colonne « principe de la méthode »)  VB1 : Cartographie d'acides nucléiques (séquençage, amplification, hybridation, ...) – Biologie moléculaire  RT –PCR classique et <u>Nested PCR</u> avec détection sur gel d'agarose
Type d'échantillon primaire :	Acides nucléiques
Type de récipient, additifs :	Préciser le type de contenant : tube/additif/présence ou non d'un séparateur, flacon/milieux de transport, écouvillon... NA
Prétraitement de l'échantillon :	Modalités de prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, acidification, alcalinisation, extraction ...) : NA
Unités :	Mode d'expression du résultat (unités, ratio, ...) NA
Critères d'interprétation* :	Intervalles de référence : origine et définition par critères démographiques ; valeurs seuils, ... Obtention d'un produit de la taille attendue (1800pb et 1100pb)
Marquage CE (Oui/Non) :	Marquage CE (Oui mais adapté)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Consulter le site de <u>ANSM</u> NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	marque, modèle, référence <u>Thermocycle</u> , marque et numéro de série (cf ci-dessous la liste dans répétabilité)
Référence du réactif :	Kit <u>Viroseq HIV-1 genotyping system V2.0</u> (Abbott) <u>Ref 4J94-94</u>
Matériau d'étalonnage (références) :	Raccordement métrologique
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Méthode qualitative

**MISE EN ŒUVRE**

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Dr Sidonie LAMBERT Dr Djeneba FOFANA Luis Chan
Procédure de validation/mode opératoire :	<u>référence et version de la procédure utilisée</u>

\* Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



## Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

**SOUS-PROCESSUS 3 : Séquençage des gènes de la RT, de la protéase, de l'intégrase et de la gp 120**

Portée A  ; Portée B  **Réaction de séquence réalisée avec le kit viroseq adapté en fonction de la charge virale.**

**Purification de séquence avec plaque MAHVN 4550 et séphadex au lieu d'une des 3 méthodes préconisées (Ethanol/EDTA ou Ethanol/acétate de sodium ou plaque CENTRI -SEP 96)**

**Utilisation du Gel polymère POP7 (au lieu de Pop6)**

**et comparaison de méthode avec la technique maison ANRS**

### DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte / Mesurande :	Cf. §G.2.2. du SH GTA 04 Séquençage des gènes de la RT, de la protéase, de l'intégrase et de la gp 120
Principe de la Méthode :	VBT : Cartographie d'acides nucléiques (séquençage, amplification, hybridation, ...) – Biologie moléculaire Séquençage par méthode Sanger
Type d'échantillon primaire :	Produit d'amplification par PCR
Type de récipient, additifs :	NA
Prétraitement de l'échantillon :	NA
Unités :	NA
Critères d'interprétation* :	TS, CRL, séquence complète, interprétation ...
Marquage CE (Oui/Non) :	Marquage CE (Oui/ mais adapté)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Voir la liste des thermocycleurs utilisés dans les tests de répétabilité Séquenceur : marque: APPLIED BIOSYSTEMS modèle: 3500xL Dx numero de série: 22406-020
Référence du réactif :	Kit Viroseq HIV-1 genotyping system V2.0 (Abbott) <a href="#">Ref 4J94-94</a>
Matériau d'étalonnage (références) :	Raccordement métrologique
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Méthode qualitative

### MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Dr Sidonie LAMBERT Dr Djeneba FOFANA Luis Chan
Procédure de validation/mode opératoire :	référence et version de la procédure utilisée
Procédure de gestion de la portée flexible :	référence et version de la procédure utilisée
Période d'étude :	Du 01.08.2017 au 30.06.2018

## Annexe 3: Document analyse de risque

### Analyse de risques pour le génotype de résistance du HIV-1 sur plasma à SAT sur 3 sous processus: Extraction, amplification et séquençage

Sous Processus	Type de risque (5M)	Points critiques	Détection - Gravité - Occurrence				Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrises
			D	G	O	C		
Extraction	Matière (échantillons)	Identité du patient (discordance tubes/étiquettes)	1	2	2	4	Formation et information du personnel préleveur sur l'identitovigilance	Procédure d'identitovigilance du service préleveur; Instructions/manuel de prélèvements sur VISKALI
		Identité du patient (mauvais patient non identifié)	2	5	2	20		
		Prélèvements/Conformité à la prescription	2	4	1	8	Contrôle à la réception du type d'échantillon dans des contenants conformes	Procédure de prélèvements connue, diffusée et appliquée (VISKALI à vérifier); Procédure de réception, du tout préanalytique au LCBGM et de gestion des non conformités (ref Kallab)
		Délai d'acheminement avant traitement analytique	1	4	3	12	Contrôle à la réception de la date de prélèvement	
		Prétraitement de l'échantillon	3	4	1	12	Centrifugation et aliquotage	Personnel habilité pour la réception, procédures préanalytique MOI/Logigramme/programme de centrifugation/Métrologie : gestion des enceintes thermiques
		témoins négatifs et positifs (conservation)	1	2	1	2	Température et durée de conservation	CIQ : Gestion des lots, cf procédure de gestion des CIQ/Métrologie : gestion des enceintes thermiques
		gestion des EEQ	1	2	1	2	Enregistrement et traitement correct des EEQ	Procédure de gestion des EEQ (à vérifier pour le géno VIH)
Milieu	Conditions de conservation des échantillons et des réactifs (température)	1	5	1	5	Métrologie/suivi des enceintes/ Organisation des locaux des enceintes (définir les enceintes critiques et les indiquer à Nelly Da Silva)	Instructions de conservation des échantillons et réactifs (selon les recommandations du fournisseur)/ Procédures de gestion de stocks et dates de péremptions/ Enregistrements métrologiques/ Plan des locaux pour les enceintes	
Matériels	Matériels	Lentilles de tube : durée et vitesse préconisée et températures maximum	1	2	1	2	Qualification de l'installation (définir les enceintes critiques et les indiquer à Nelly Da Silva)	Contrat de maintenance/ maintenances régulières recommandées (voir avec S. Chapelain)/suivi de métrologie
		Enceintes réfrigérées pour conservation des échantillons/réactifs avant et après prétraitement éventuel (+4°C ou congélation < -20°C ou < -70°C selon recommandations fournisseurs et durée de conservation)	1	4	1	4		
		PSM pour prétraitement,	1	1	1	1	Protection du personnel	Habilitation du personnel/maintenance des PSM (cf S. Chapelain)
Méthode	Extraction manuelle	3	5	1	15	Qualification des techniciens	Habilitation et maintien des compétences des techniciens (EP-SA-BM-LCBGM-ORP-DE-007), procédure ou MO de la technique (EP-SA-BM-LCBGM-ANA-MT-007, EP-SA-BM-LCBGM-ANA-MT-009, EP-SA-BM-LCBGM-ANA-MT-008)	
Main d'œuvre (Personnel)	Main d'œuvre (Personnel)	Identification des tubes/échantillons	2	5	2	20	Identification des tubes lors de l'extraction manuelle	Habilitation des techniciens et sensibilisation à l'identitovigilance
		Identification des prélèvements et sécurité lors de la décantation	2	5	2	20	Enregistrement des demandes/identification du tube secondaire	Formation/Habilitation/Enregistrements des compétences du personnel/Traçabilité de l'occupation des postes de travail/Fiche de poste

Amplification	Matière (échantillons)	Extraits d'ARN des échantillons patients et CQ, issus de l'extraction	1	1	1	1	Qualification des techniciens	Habilitation et maintien des compétences des techniciens	
		EEQ	1	2	1	2	Gestion des EEQ	EEQ, attestation de participation et le rapport	
	Milieu	Organisation des locaux	1	2	2	4	Respect de la marche en avant en biologie moléculaire, le circuit BM (pré PCR vers Post PCR)	Habilitation du personnel/Procédure de la marche en avant/Plan des locaux	
	Matériels (équipements et réactifs)	Matériels (équipements et réactifs)	Enceintes réfrigérées pour conservation des ARN ou A	1	2	1	2	Dysfonctionnement des appareils critiques: qualité et/ou de la quantité de l'amplification	Maintenances préventives programmées, Raccordement COFRAC, contrat (Nelly Da Silva)
			Thermocycleurs	1	2	1	2		Métrologie (cartographie)des thermocycleurs, contrat; suivi des CIQ à différents endroit sur le thermocycleurs
		Gestion des stocks des réactifs et consommables et des contrôles	1	2	1	2	Respect du mode opératoire de la reconstitution (Stabilité des réactifs)/ Gestion des stocks (rupture, insuffisance et péremption)	Biologie des pipettes (EP-HUEP-METRO-ANA-PT-002), contrat (Nelly Da Silva)	
		Conservation et conditions d'utilisation des réactif	1	2	1	2		Instructions de reconstitution , Traçabilité des lots utilisés/Procédure de gestion des stocks du service/alertes de réactivo-vigilance/évaluation des fournisseurs/Fiches fournisseurs	
	Méthodes	Méthodes	Alimentation électrique	1	2	1	2	Absence de coupure électrique	Alimentation protégée par courant ondulé
			Contamination	1	4	2	8	Contaminations inter-échantillons ou inter-réactifs	Formation et habilitation du personnel/Dossier de validation de méthode/fiche technique/Respect de la marche en avant et des règles de manipulation/Procédure de décontamination et gestion des déchets/Procédure de nettoyage/Suivi des contrôles EEQ, CIQ
	Main d'œuvre (Personnel)	Main d'œuvre (Personnel)	Identification des extraits ARN	2	5	2	20	Identito-vigilance lors des dépôts manuels	Habilitation des techniciens et sensibilisation à l'identitovigilance
Maintien des compétences techniques			1	1	1	1	Qualification, compétence et habilitation du personnel	Fiches d'habilitation et maintien des compétences du personnel, Fiche de poste Formation/maintien de compétence, passage des CIQ et vérification des génotypes antérieurs/ réunion TECHNICIEN/BIO pour le retour des résultats CIQ EEQ ou présentation en revue de direction	

<b>Séquençage</b>	<b>Matière (échantillons)</b>	Produits PCR : patients et CQ	1	4	2	8	Amplification correcte	Dépôt sur gel des amplicons (cf procédure technique) signalisation de la zone des produits tératogènes (BET) (cf procédure technique)
		Réactifs, consommables					Qualité et bonne conservation des réactifs	Procédure de gestion des réactifs et fiche de stress fournisseurs
		Conservation des échantillons ou des acides nucléiques extraits après analyse : Température et durée	1	2	1	2	Surveillance métrologique des températures	Notices réactifs/Procédure spécifique de conservation et de destruction des échantillons
		Elimination des déchets	1	1	1	1	Gestion des déchets	Procédure de gestion des déchets, Procédure hygiène et sécurité
	<b>Milieu</b>	Contamination de l'environnement; Local (Température et alimentation électrique)	1	4	2	8	Sectorisation et marche en avant du circuit des échantillons	Habilitation du personnel/Sectorisation adaptée; respect du circuit "marche en avant" pour le personnel, les déchets et les échantillons; Procédure de décontamination/Procédure de nettoyage des paillasse
	<b>Matériels</b>	Thermocycleurs (Altération qualité/quantité des produits de PCR)	1	2	1	2	Qualification des appareils/Cartographie des appareils	Qualification des installations/riches techniques des appareils/Cahier de vie des automates/Suivi métrologique des pipettes critiques et des thermocycleurs/Contrats, Suivis contrôlés (CIQ et EEQ)/Maintenance préventives programmées/Maintenance annuelle/suivi des recommandations fournisseurs pour maintenance habdo.
		Centrifugeuse de plaques (Perte/Purification des produits de PCR)						
		Séquenceur (mauvaise migration des échantillons)	1	4	1	4		
	<b>Méthode</b>	Contamination de l'environnement; Local (Température et alimentation électrique)	1	4	1	4	Respect de la marche en avant en biologie moléculaire	Procédure de nettoyage; précautions post-PCR; Gestion des déchets; contrôle périodique de la non contamination (cf procédure de décontamination). Procédure hygiène et sécurité
		Purification des produits de séquences	2	5	2	20	Dépôt manuel avec risque d'erreur de positionnement sur la colonne	Formation et habilitation du personnel,
		Validation technique et biologique des résultats	1	5	1	5	Formation/Habilitation des technicien et des biologistes	Habilitation/ maintien des compétences/ Procédure de validation biologique du génotypage VIH/Confrontation clinico-biologique
		Transmission des résultats	1	3	2	6	Délai de transmission des résultats aux cliniciens	Qualification de la connexion SIL-ORBIS
		Archivage des résultats	1	5	1	5	Qualification informatique (SIL/Logiciel/liaison)	Procédures de sauvegarde et archivage/Document en lien avec la déclaration concernant la validation du logiciel SmartGene et de ses services/ vérification de la sécurité des fichiers avec mot de passe / vérification régulière des fichiers avec calcul en lecture seule/ Signature des autorisation avec la CNIL/ Evaluation de la sécurité des sauvegarde des archives résultats et des connexions.
	<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Identification des produits de PCR	2	5	2	20	Identito-vigilance lors des dépôts manuels	Habilitation des techniciens et sensibilisation à l'identitovigilance
		L'analyse technique (Capacité d'analyse des électrophorégrammes et savoir estimer la qualité des séquences)	1	4	2	8	Qualification, compétence et habilitation du personnel	Habilitation/maintien des compétences du personnel, tracés avec QCM ou autre(techniciens et biologistes)/Fiche de poste
		Validation biologique	1	4	1	4	Capacité d'interprétation des résultats	Formation/ réunion régulière d'information technicien/biologiste/Habilitation et maintien des résultats/Fiches d'habilitation du personnel

## Annexe 4 : Compte rendu audit interne

<b>Modalités de l'audit</b>	
<b>1. Famille(s) Concernée(s) :</b>	<b>VIROH</b>
<b>2. Portée(s) concernée(s) :</b>	<b>VB1 (B)</b>
<b>3. Examen(s) concerné(s) :</b>	Génotypage HIV
<b>4. Activités auditées :</b>	Processus RH, Pré analytique, post analytique
<b>5. Objectif de l'audit :</b>	Evaluer la conformité des pratiques avec les exigences (Plan qualité, procédures, modes opératoires) de la norme en vigueur
<b>6. Référentiels de l'audit :</b>	Norme NF EN ISO 15189 – V. 2012 Référentiel Cofrac - SH REF 02 – Rév. 04 Référentiel Cofrac - SH REF 08 – Rév. 01
<b>7. Date et durée :</b>	12/07/2018 de.....9h00- 12h30.....
<b>8. Date de la diffusion du rapport :</b>	...13/07/2018.....

### **Points forts :**

- ✓ Réactivité et disponibilité du personnel
- ✓ Compétence et motivation du personnel
- ✓ Bonne épreuve de traçabilité

### **Points faibles :**

Cf. tableau de synthèse des écarts

### **Menaces /risques**

### **Axes d'amélioration :**

-Augmenter la fréquence du suivi d'occupation des postes afin d'éviter une occupation insuffisante pour assurer le maintien des compétences.

-Harmoniser les pratiques avec le service de virologie de Tenon (dossier de vérification : validation de méthodes)

-Non conformités dans Kalilab : vérifier avant clôture que la NC est correctement enregistrée et que tous les items sont bien complétés (type, processus, conclusion...)



## TABLEAU DE SYNTHÈSE DES FICHES D'ECARTS

N° fiche	Paragraphe Référentiel Concerné	Ecart	Preuves d'audit	Action envisagée	Date butoir	Responsables
1.	5.1	Absence d'habilitation ou de maintien des compétences du personnel non médical	Pas d'habilitation de X Dates de maintien des compétences dépassées.			
2.	5.1	Absence d'habilitation ou de maintien des compétences du personnel médical	Pas d'habilitation de Y			
3.	5.4.2	Discordance entre les délais de conservation indiqués dans le manuel de prélèvement et les critères d'acceptation des échantillons.	Manuel de prélèvement : délai maxi 4h. Pas de délai d'acceptation dans la procédure des non conformités de réception.			
4.	4.3	Documents non référencés dans kalilab Revue de certains documents non faite dans les délais	-Documentation technique du séquenceur 3500 xLDx non référencée -EP-SA-BM-LCBGM-PRE-PT-001 revue en attente depuis le 28/11/2016			
5.	5.9.3	Absence de dispositions en cas de modification de compte rendu				
6.	5.10	Vérification de la transmission informatique non réalisée (fait pour les charges virales) ainsi que le suivi de la pérennité des données				

## RESUME

L'objectif de ce mémoire était une aide à l'élaboration d'un dossier pour l'accréditation de l'activité de génotypage du VIH-1 dans le laboratoire de virologie à l'hôpital Saint-Antoine et son dépôt auprès du COFRAC afin de satisfaire aux exigences de la norme NF ISO 15189. Pour se faire, nous avons participé à des réunions de retours d'expériences de laboratoires accrédités pour la même activité et les mêmes techniques utilisées dans notre laboratoire afin de mieux appréhender le sujet. Le travail a été structuré autour de 3 axes : la formation/habilitation du personnel, la vérification du système documentaire ainsi que l'élaboration du dossier de vérification/validation de méthode en remplissant le SH form 43 du COFRAC. Pour l'élaboration de ce dossier, nous avons évalué les différents critères de performances indispensables à la validation d'une méthode qualitative en portée B en trois sous processus (extraction de l'ARN du VIH-1, l'amplification et la réaction de séquences). Nous avons également effectué une étude de risque sur chacun des trois sous-processus présenté dans le SH form 43. Toutes les exigences techniques pour le renseignement du SH form 43 ont pu être satisfaites et le dossier prêt à être déposé. Cependant, les points relevés lors de l'audit interne notamment sur habilitation du personnel et de certains documents non référencés dans Kalilab doivent être améliorés très rapidement pour parvenir à l'efficacité de nos missions avant le passage des évaluateurs du COFRAC.