

Anne VASSAULT¹ et Francine KAHN²

Validation/vérification de méthodes : bilan d'une année d'audit à blanc - Anomalies observées

I - Introduction

Pour assurer la conformité de leurs pratiques avec l'une des exigences de la norme d'accréditation NF EN ISO 15189 : 2012, les laboratoires de biologie médicale doivent constituer des dossiers de vérification/validation des méthodes, dans le but de prouver, grâce à ce dossier formalisé, la maîtrise des moyens analytiques utilisés pour l'obtention des résultats des examens prescrits.

La justification de cette exigence obéit au souci de n'utiliser une nouvelle méthode que si celle-ci est au préalable évaluée, afin d'autoriser son emploi de façon formelle. L'objectif est donc de procéder à une validation initiale avant que la méthode soit appliquée pour procéder aux examens sur les spécimens des patients.

Les évaluations diffèrent selon qu'il s'agit d'une méthode commercialisée après avoir été validée conformément aux dispositions de la directive européenne 98/79 certifiée par le marquage CE (vérification de méthodes : portée A) ou qu'il s'agit d'une méthode mise au point au laboratoire ou d'une méthode marquée CE utilisée après modification(s) (validation de méthodes : portée B).

L'objectif du présent article, rédigé à la lumière des anomalies le plus souvent observées au cours d'audits à blanc effectués pendant l'année 2014, est d'aider les laboratoires à constituer ces dossiers et à leur permettre, par une meilleure appropriation de l'outil, d'améliorer leurs pratiques.

Cette revue propose d'analyser les différentes anomalies observées dans les dossiers de vérification/validation de méthodes ainsi que leurs conséquences et les risques associés. Seuls les dossiers de vérification des méthodes quantitatives sont traités.

Après avoir défini la méthode d'investigation, les résultats relatifs aux anomalies observées sont détaillés et des solutions proposées. Elles portent principalement sur le formalisme des dossiers, les modalités de réalisation des essais et surtout leur interprétation. Ainsi, la connaissance des performances des méthodes et de leurs limites contribue à la pertinence de la prestation de conseils dispensée par les biologistes médicaux.

II - Méthode

La connaissance des performances des méthodes utilisées fait partie intégrante de la maîtrise du processus de réalisation des examens, conformément aux exigences normatives et réglementaires en vigueur (Cofrac SH REF 02 révision 04).

Au cours d'audits à blanc réalisés dans différents laboratoires en France, en amont des visites d'accréditation par des évaluateurs du Cofrac, un certain nombre d'anomalies récurrentes dans les dossiers de validation/vérification de méthodes examinés ont été constatées.

L'exposé des résultats portera sur les dossiers relatifs aux méthodes quantitatives (vérification de méthodes) en portée A, actuellement les plus souvent présentés.

Les différentes évaluations rapportées sont détaillées par chapitre en suivant l'ordre indiqué dans le modèle récapitulatif proposé par le Cofrac (SH FORM 43) rédigé à partir du guide SH GTA 04 rev 01, 2015.

III - Résultats et discussion

1. Référence du dispositif de diagnostic *in vitro* (réactif prêt à l'emploi, analyseur automatique)

Anomalie constatée : « La référence du réactif utilisé par le laboratoire ne correspond pas à celle qui est mentionnée dans le document de vérification de méthode présenté. La nature de la modification relative au changement de référence n'est pas documentée. »

Conséquence : La méthode utilisée n'a pas été validée/vérifiée préalablement à son utilisation. L'intervalle de référence utilisé ne correspond pas à la référence du réactif utilisé.

¹ Consultante en biologie médicale

² Consultante VISKALI-ACC - 194 rue Garibaldi - 69427 Lyon Cedex 03

Certains dossiers examinés comportaient la référence à un réactif prêt l'emploi (Dispositif Médical de Diagnostic *In Vitro*/DMDIV) qui ne correspond pas à celui qui est utilisé pour la réalisation des examens. Certaines références peuvent changer sans avoir un impact sur la qualité des résultats (exemple : changement de conditionnement). Elles peuvent résulter d'une modification de la présentation par exemple et, dans ce cas, ce changement ne justifie pas une nouvelle évaluation. Cependant, il est important de tracer la nature de la modification opérée pour en apporter la preuve. Toute autre circonstance nécessite une nouvelle évaluation et un nouveau dossier.

2. Etalonnage, traçabilité métrologique

Anomalie constatée : « Absence d'information concernant la traçabilité de l'étalonnage. »

Conséquence : Il y a un risque d'utiliser des intervalles de référence inappropriés par rapport à la méthode utilisée et d'induire une interprétation erronée.

Les DMDIV marqués CE ont fait l'objet, préalablement à leur mise sur le marché européen, d'une certification par le fournisseur garantissant que les étalons ont été titrés par rapport à des préparations définies au niveau international « lorsqu'elles existent ». Le type d'étalonnage proposé dans les trousse de réactifs prêts à l'emploi conditionne la justesse de la méthode et, à ce titre, il est important pour le biologiste médical de connaître la traçabilité métrologique des étalons utilisés. Les intervalles de référence à utiliser sont directement hérités de la nature de la traçabilité des étalons. Lorsqu'il existe des étalons dont la justesse est établie au niveau international, la cohérence entre des résultats provenant de méthodes différentes peut être attendue et faciliter ainsi un éventuel changement de méthodes.

3. Intervalle de référence

Anomalie constatée : « L'intervalle de référence des valeurs en pédiatrie n'est pas fourni, alors que la patientèle régulière est constituée entre autres d'enfants d'âges différents (services de néonatalogie et de pédiatrie). »

Conséquence : L'interprétation des résultats n'est pas pertinente et peut donner lieu à des décisions médicales inappropriées.

Les intervalles de référence peuvent varier, en fonction du mesurande, du sexe, de l'âge, de la nature des étalons utilisés, du milieu biologique utilisé.

Il est souhaitable que le laboratoire soit en mesure, avant de les utiliser, de vérifier par une évaluation simple la concordance des valeurs obtenues lors d'un changement de méthode ou d'une modification de celle-ci, notamment préanalytique. Par exemple, un changement de tubes de prélèvement peut être à l'origine de modifications de l'intervalle de référence (sérum/plasma par exemple). Une vérification simple peut être utile en suivant le protocole recommandé par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC).

Anomalie constatée : « L'intervalle de référence n'a pas été revu à la suite du changement de matériau d'étalonnage. »

Conséquence : L'interprétation des résultats peut être erronée.

La modification du matériau d'étalonnage a entraîné une différence de justesse qui aurait dû faire modifier les intervalles de référence utilisés.

4. Habilitation des opérateurs

Anomalie constatée : « La personne ayant réalisé les essais de vérification comme opérateur n'est pas habilitée à cette tâche. »

Conséquence : Il y a un risque que le soin apporté aux essais ne soit pas aussi rigoureux que nécessaire. L'aspect pédagogique de ces essais a été négligé.

L'évaluation effectuée dans le cadre de la vérification d'une méthode est conduite en suivant une procédure et un protocole opératoire. Les personnes en charge de ces essais doivent donc préalablement avoir été informées et formées à la réalisation des différentes étapes. Ces essais doivent faire partie de leurs attributions et l'aptitude des opérateurs doit faire l'objet d'une évaluation, reportée sur leur fiche d'habilitation, après avoir vérifié l'état de leurs connaissances dans ce domaine.

Anomalie constatée : « La personne dont le nom apparaît comme opérateur ne figure pas sur l'organigramme du laboratoire. »

Conséquence : Il y a un défaut d'implication du personnel du laboratoire dans la connaissance des performances des méthodes utilisées.

Les essais de conformité des performances de la méthode mise en place aux spécifications indiquées par le fournisseur reposent sur la crédibilité des données présentées. L'opérateur doit pouvoir justifier de son expérience à la pratique de la méthode évaluée.

5. Procédure générale de validation/vérification de méthodes/protocole opératoire

Anomalie constatée : « Le protocole opératoire ne correspond pas aux directives de la procédure générale définie par le laboratoire. La procédure stipule que le niveau de concentration des échantillons de contrôle retenus doit être proche de la zone de décision médicale, le protocole opératoire n'en respecte pas les dispositions. Les concentrations retenues pour évaluer la fidélité du dosage de l'HbA1c sont choisies à 2 niveaux, 5 % et 13 %, alors que la zone critique est située entre 7 et 8 % dans le cadre de la surveillance des patients diabétiques. »

Conséquence : L'évaluation des performances effectuées peut ne pas être pertinente.

Anomalie constatée : « Absence de protocole décrivant le type d'échantillons utilisés, le nombre de niveaux de concentration différents, le nombre de mesures pratiquées, les calculs à effectuer, la gestion et la conservation des données associées. »

Conséquence : Cela induit des difficultés pour l'interprétation des résultats et pour le suivi des évaluations effectuées. L'exigence de la norme ISO 15189 relative à la traçabilité n'est pas appliquée : « Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification et enregistrer les résultats obtenus (5.5.1.2.) ».

L'existence d'une procédure générale de vérification/validation des méthodes permet d'opérer les choix préalables (type de portée, méthodes qualitative, quantitative, semi-quantitative) et de décrire les documents de référence à rechercher pour constituer le dossier.

Cette procédure générale permet de rédiger un protocole opératoire adapté aux essais particuliers à conduire en fonction du type d'examen.

« Le personnel habilité ayant l'autorité requise doit examiner les résultats de la vérification et enregistrer la revue (5.5.1.2.) »

6. Maîtrise des risques (5 M)

Matière / Préanalytique

Anomalie constatée : « Le risque majeur d'un défaut dans l'identification des échantillons n'est pas rapporté dans l'analyse des risques présentée. »

Conséquence : L'analyse des risques n'est pas pertinente et sa crédibilité peut être mise en cause.

Méthode / Analytique

Anomalie constatée : Le risque de résultats erronés si le réactif n'a pas été préalablement agité n'est pas rapporté dans l'analyse des risques. Or, c'est une anomalie fréquemment observée.

Conséquence : L'analyse des risques n'est pas pertinente et son utilisation ne s'accorde pas à la réalité des pratiques.

Milieu / Préanalytique

Anomalie constatée : « Le contrôle de la température de transport des échantillons et le délai écoulé entre le moment du prélèvement, notamment dans les établissements extérieurs, et leur réception au laboratoire ne fait pas partie des risques identifiés et ne sont donc pas contrôlés. »

Conséquence : Les conditions préanalytiques ne sont pas garanties, ce qui peut induire des anomalies, non détectables, ayant une incidence sur les résultats des examens.

Main d'œuvre / Préanalytique

Anomalie constatée : « Le risque d'un défaut de recueil des urines des 24 heures n'est pas identifié. De ce fait, la formation des infirmières du centre de prélèvement concernant la définition d'un recueil des urines de 24h n'en fait pas état. »

Conséquence : L'infirmière a communiqué une information erronée à une patiente. Les examens pratiqués avec les urines collectées correspondantes ne seront pas effectués avec une diurèse des 24 heures, sans que le laboratoire puisse détecter cette anomalie. Cette anomalie se traduit par un résultat erroné.

Matériel / Analytique

~~**Anomalie constatée :** « Le risque pris en réduisant le nombre d'actions de la maintenance quotidienne par rapport au nombre recommandé par le manuel du fournisseur sur les conseils de l'ingénieur d'application n'a pas été évalué. L'impact de la non réalisation de cette maintenance n'a pas été évalué. »~~

~~**Conséquence :** Les conditions de fonctionnement de l'analyseur peuvent entraîner des dysfonctionnements et retarder la communication des résultats.~~

Anomalie constatée : « Le risque pris en réduisant le nombre d'actions de la maintenance quotidienne par rapport à celui recommandé dans le manuel du fournisseur, sur les conseils de l'ingénieur d'application, n'a pas été évalué. L'impact de la non réalisation de cette maintenance n'a pas été évalué. »

Conséquence : la modification des conditions de fonctionnement de l'analyseur peut être à l'origine d'anomalies susceptibles de retarder la communication des résultats.

Matière / Analytique

Anomalie constatée : « Le risque engagé en réduisant la fréquence de dosage des échantillons de contrôle interne de qualité (CIQ) à 1/24 heures et le nombre de niveaux de concentration retenus n'a pas fait l'objet d'une analyse. »

Conséquence : Les séries d'examens pratiquées pour les patients peuvent ne pas être correctement définies ni encadrées, des aléas sur les résultats peuvent ne pas être détectés.

Matière / Analytique

Anomalie constatée : « Le risque de défaut de stabilité des échantillons de contrôle n'a pas fait l'objet d'une évaluation. Les échantillons de contrôle sont conservés en aliquotes congelés. La fiche technique du fournisseur ne précise pas ce mode de conservation. Le laboratoire ne peut pas apporter la preuve de la stabilité des aliquotes pendant la période d'utilisation. »

Conséquence : Les résultats des séries d'examens pratiqués pour les patients ne sont pas correctement contrôlés, des aléas sur les résultats peuvent ne pas être détectés ou être détectés à tort et retarder leur diffusion.

Méthode / Postanalytique

Anomalie constatée : « En cas de modification d'un résultat déjà communiqué, le laboratoire ne s'assure pas que les résultats papier sont détruits au laboratoire après avoir tracé la restitution du compte rendu. »

Conséquence : Des comptes rendus erronés peuvent être exploités ce qui peut induire des actes cliniques ou thérapeutiques indus.

Méthode / Postanalytique

~~**Anomalie constatée :** « La procédure de validation biologique stipule qu'en cas de résultats erronés déjà communiqués par voie électronique, les comptes rendus sont modifiés, accompagnés de la mention « annule et remplace » sur le serveur, et les cliniciens avertis. Il n'existe pas de trace des actions effectuées et le serveur n'a pas transmis l'information. »~~

Conséquence : Des comptes rendus erronés peuvent être exploités ce qui peut induire des actes cliniques ou thérapeutiques indus.

L'analyse des risques doit être adaptée à chaque examen ou groupe d'examens et inclure les données pré, per et post-analytiques. Un diagramme des 5M (Moyens, Milieu, Matière,

Main d'œuvre, Méthode) permet de couvrir l'ensemble du domaine concerné.

Cette analyse est parfois, pour certains dossiers, très succincte et mal adaptée à la pratique réelle. Notamment, une analyse globale applicable à tous les examens d'une même famille est insuffisante pour rendre compte de l'ensemble des risques rencontrés pour chaque examen. Une évaluation des risques en fonction de leur fréquence, de leur gravité et de la possibilité de détection est souhaitable pour les risques les plus critiques et permettra ainsi la mise en place d'actions préventives.

7. Evaluation de la fidélité de la méthode et limites acceptables

Anomalie constatée : « Les critères de qualité fournis par les autorités sanitaires (ANSM, HAS) ne sont pas pris en compte, par exemple pour l'hémoglobine A1c. ~~Pour l'HbA1c, le CV de répétabilité doit être inférieur à 3 % et la fidélité intermédiaire inférieure à 4 % au niveau de 7 %.~~ »

Conséquence : Il y a un risque de suivi inapproprié des patients diabétiques si ces critères ne sont pas connus.

OK

D'autres types d'anomalies ont été constatés en matière de fidélité de la méthode :

- Les essais de répétabilité sont le plus souvent effectués avec soin, en incluant un nombre considérable de mesures. Cependant, les valeurs choisies pour ces essais ne correspondent pas toujours à des zones de décision médicale et leur intérêt est alors restreint.

- Les concentrations rapportées sont souvent différentes de celles qui sont rapportées par le fournisseur de DMDIV et, en conséquence, les limites acceptables à utiliser ne sont pas les mêmes. Des conclusions erronées en découlent. Il faut garder à l'esprit que les performances décrites par le fournisseur ont souvent été évaluées dans des conditions particulièrement strictes et rigoureuses, différentes de celles en œuvre dans un laboratoire en pratique courante.

- Certaines performances ne sont pas satisfaisantes par rapport à celles annoncées par le fournisseur. Lorsque les essais sont effectués à des niveaux de concentration différents, les performances des méthodes varient également. Or, on ne peut comparer que des évaluations comparables, notamment effectuées au même niveau de concentration.

- Sur certains dossiers, malgré les résultats des évaluations de la fidélité non conformes aux limites acceptables retenues par le laboratoire, la conclusion est : « tout à fait satisfaisant ».

Au niveau de 7 % d'HbA1c, le coefficient de variation relatif à l'évaluation de la répétabilité devrait être inférieur à 3 %, et celui relatif à la fidélité intermédiaire inférieure à 4 %".

Anomalie constatée : « La procédure de validation biologique stipule qu'en cas de résultats erronés déjà communiqués par voie électronique, les comptes rendus sont modifiés, accompagnés de la mention « annule et remplace » sur le serveur, et les cliniciens avertis. Il n'existe pas de trace des actions effectuées et le serveur n'a pas transmis l'information. »

- Les valeurs indiquées dans les tableaux des dossiers sont parfois reportées sans indiquer l'unité dans laquelle elles sont exprimées. Par exemple, pour le TP, dans le même dossier, certains tableaux sont en pourcentage quand d'autres sont en secondes, sans aucune mention.

- Les laboratoires ont parfois choisi de comparer leurs performances à celles données dans le récapitulatif publié par C. Ricos et calculées par rapport aux variations intra/interindividuelles. Cependant, du fait de l'homéostasie, les variations intra-individuelles sur certains analytes sont tellement étroites qu'aucune des méthodes actuellement disponibles ne peut les évaluer.

- Le calcul de la fidélité de la détermination du pH est généralement erroné. Le calcul doit être effectué après transformation de la valeur du pH en concentration d'ion H⁺ pour le calcul de l'écart-type.

8. Evaluation de la justesse de la méthode et limites acceptables

Anomalie constatée : « L'évaluation de la justesse de la méthode n'est pas documenté dans les dossiers présentés, sous prétexte que le laboratoire ne participe pas à un programme de contrôle interne externalisé (CIQ/CIL= Comparaison inter-laboratoires) ».

Conséquence : Sachant que la détermination de la justesse conditionne le choix des intervalles de référence, ce choix n'est pas justifié. La justesse peut être évaluée à partir des valeurs cibles définies pour les matériaux de référence utilisés (échantillon de contrôle) lorsqu'elles sont disponibles.

La justesse est une des propriétés des méthodes qui présente le plus d'intérêt à connaître puisqu'elle va conditionner le choix des intervalles de référence et permettre des changements de méthodes « indolores ».

La plupart des laboratoires utilisent pour le CIQ des échantillons vendus par le fournisseur de l'analyseur utilisé et, dans ce cas, la fiche technique qui est jointe rapporte des valeurs cibles calculées à partir des résultats obtenus par des utilisateurs du même système analytique. Il est donc possible d'évaluer la justesse en choisissant les valeurs indiquées comme référence de la justesse. Il convient de confronter ces conclusions avec celles des EEQ pratiquées.

9. Evaluation de l'exactitude des résultats et limites acceptables

Anomalie constatée : « Les résultats provenant d'évaluations externes de la qualité (EEQ) présentés dans les dossiers ne sont pas appréciés par rapport aux limites d'exactitude définies par l'organisateur du programme. »

Conséquence : L'évaluation de l'exactitude des résultats dépend des critères définis par l'organisateur et peuvent varier en fonction des niveaux de concentration. Il y a un risque d'interprétation erronée des résultats d'EEQ : alarmer à tort ou ne pas alarmer alors qu'il le faudrait.

Les limites acceptables rapportées sont généralement originaires de données définies par le laboratoire alors qu'il s'agit des limites utilisées par les organisateurs d'évaluations externes de la qualité (EEQ) qu'il convient de rapporter.

Il est pertinent de confronter les données relatives à l'évaluation de la justesse aux données d'exactitude fournies par l'organisme en charge des EEQ.

10. Evaluation de l'incertitude de mesure

Anomalie constatée : « L'évaluation de l'incertitude de mesure a été pratiquée à un niveau de concentration qui ne correspond pas à un niveau de décision clinique. »

Conséquence : L'impact évalué de l'incertitude de mesure sur les décisions cliniques n'est pas pertinent.

La valeur calculée de l'incertitude de mesure est une caractéristique des résultats obtenus (ce n'est pas une caractéristique de la méthode) pour interpréter les résultats des patients avec pertinence. Elle ne s'applique qu'aux méthodes quantitatives qui le permettent.

Ce calcul peut être effectué en utilisant différentes méthodes. Quelle que soit la méthode choisie, la composante principale de l'incertitude est représentée par la fidélité de la méthode utilisée à un niveau de concentration donné, choisi pour correspondre à une valeur proche de la zone de décision médicale. La fidélité est exprimée en terme d'écart-type (ET) ou de coefficient de variation (CV). 95 % des valeurs observées se situent dans l'intervalle +/- 2 ET.

Les calculs sont effectués en utilisant des données relatives à la fidélité dont la conformité est jugée à partir de critères définis et de données de justesse (erreur systématique) qui sont appréciées par rapport à des critères définis (EEQ). La conjugaison de ces 2 éléments est forcément conforme par rapport aux mêmes critères.

La valeur de l'incertitude ne peut donc pas être

inférieure à 2 fois l'écart-type de fidélité calculé pendant une longue période de temps (> 6 mois). Elle est exprimée dans l'unité dans laquelle le résultat est communiqué. Les dossiers ne portent parfois pas le mode de calcul utilisé pour la calculer. Les résultats sont accessibles aux cliniciens sur demande.

Un certain nombre de laboratoires émettent des conclusions sur l'acceptabilité de l'incertitude calculée en confrontant les valeurs obtenues à l'erreur totale définie par différents référentiels (Ricos, SFBC).

Le guide du Cofrac SH GTA 14 (p 24), rappelle que ces critères ne doivent pas être utilisés à cette fin : « *Toutefois, il faut garder à l'esprit que : c'est l'aptitude du laboratoire à évaluer de façon réaliste l'incertitude de mesure des résultats qui sera appréciée. Le résultat de l'incertitude en lui-même n'est pas évalué par rapport à un critère de conformité et ne peut donc pas être comparé aux indicateurs issus de la littérature tels que Ricos, Valtec, ...* »

C'est au clinicien d'évaluer la pertinence des résultats, compte tenu de l'incertitude de mesure, pour prendre des décisions médicales et suggérer le cas échéant des améliorations.

La communication entre cliniciens et biologistes est un atout dans ce domaine. Cet aspect fait réellement partie de la prestation de conseils des biologistes médicaux.

11. Comparaison des résultats de 2 méthodes

Anomalie constatée : « *Absence de comparaison avec la méthode précédemment utilisée.* »

Conséquence : Le suivi des patients, à la suite d'un changement de méthodes, peut être affecté si le laboratoire n'a pas pris la précaution de vérifier la cohérence des résultats.

Si les résultats ne diffèrent pas, les mêmes intervalles de référence peuvent être appliqués. En cas de discordances, des mesures doivent être prises pour en informer les prescripteurs et définir les intervalles de référence correspondants à utiliser.

Anomalies constatées : « *Des différences sont observées (exemple : la pente de la droite de régression traduisant la relation entre les résultats des 2 méthodes est de 1,30) entre les résultats obtenus par comparaison entre la méthode existante et la nouvelle méthode sans donner lieu à aucun commentaire. La conclusion est énoncée en ces termes : les 2 résultats sont comparables.* »

Conséquence : Le suivi clinique des patients sera basé sur des informations erronées pouvant nuire à leur prise en charge.

Si des différences sont observées (par exemple, les graphes des différences montrent une tendance de différence systématique confirmée par l'équation de la droite de régression qui présente une pente de 1,30, sans aucun commentaire) alors les intervalles de référence devraient être revus et les cliniciens consultés avant le changement de méthodes.

Anomalie constatée : « *Absence de suivi des résultats obtenus par 2 analyseurs (en miroir) effectuant les mêmes examens.* »

Conséquence : Le suivi des patients peut ne pas être pertinent si des différences entre les résultats des 2 analyseurs sont interprétées comme étant pathologiques.

Les échantillons provenant du même patient peuvent, de façon aléatoire, être analysés par l'un ou l'autre analyseur. Une vérification périodique permet de s'assurer que les différences entre les 2 ne peuvent pas nuire à l'interprétation des résultats. Une alarme dans le cas où des différences supérieures à 2,8 x ET (pour 2 x 2 x ET) sont observées représente une sécurité.

Anomalie constatée : « *Les comparaisons des résultats observés par 2 méthodes différentes ne comportent pas les graphes correspondants.* »

Conséquence : Les différences observées entre les 2 méthodes ne sont pas visualisées et leur appréciation n'est pas pertinente.

Lors du changement d'une méthode, avant sa mise en service, une comparaison des résultats doit être programmée pour assurer le suivi approprié des patients. Faire fonctionner deux systèmes en miroir nécessite également d'effectuer une comparaison de méthodes du même ordre. En effet, les résultats obtenus peuvent présenter des différences susceptibles de modifier la prise en charge des patients.

Or, nous avons parfois observé :

- une absence de comparaison des résultats émanant de 2 méthodes différentes ne permettant pas l'harmonisation des résultats.
- pour certains dossiers, des différences inexplicables alors que sont comparés des résultats émanant de 2 systèmes analytiques identiques utilisant des réactifs du même lot. Ces différences peuvent être la conséquence d'un défaut de stabilité car les dosages ont été effectués avec un décalage dans le temps.

La visualisation graphique des différences observées permet une évaluation pertinente des résultats. Le graphe des différences est souvent, à tort, baptisé « Bland et Altman ».

12. Evaluation des interférences

Anomalie constatée : « La fiche technique de l'examen communiquée par le fournisseur mentionne une interférence due à l'hémolyse mais le protocole analytique ne précise pas comment l'intensité de l'hémolyse est estimée ni le seuil à partir duquel il convient d'avoir une interprétation critique des résultats des patients. »

Conséquence : Les résultats patients sont communiqués sans prise en compte de l'interférence et peuvent donc être erronés.

La conduite à tenir en présence d'une hémolyse, d'un ictère ou d'un trouble, soit des situations fréquemment rencontrées, doit être définie et communiquée à l'ensemble des opérateurs pour éviter de fournir des résultats erronés. Les données des fiches techniques des fournisseurs relatives aux interférences peuvent constituer une aide, mais elles sont souvent insuffisantes pour définir cette conduite.

13. Evaluation des changements préanalytiques

Anomalie constatée : « Le laboratoire n'a pas documenté l'impact du changement de tubes de prélèvement sur les résultats des patients.

~~La comparaison après un changement préanalytique, par exemple un changement de tubes de prélèvement, est absente.~~ »

Conséquence : Si les résultats des patients, à la suite d'un changement de tubes de prélèvement, présentent des différences, il convient de les documenter et de définir une conduite à tenir en fonction des différences observées.

Si des différences existent entre deux modes de prélèvement, par exemple en présence ou sans antiglycolytique, le compte rendu des résultats doit en faire état.

14. Evaluation de la contamination d'un échantillon par un autre

Anomalie constatée, par exemple pour le dosage hCG : « Le laboratoire a évalué la contamination en calculant le pourcentage de contamination (+0,015 %). Il ne sait pas l'apprécier et ne sait pas à partir de quelle valeur il doit prendre des mesures pour vérifier les échantillons suivants susceptibles d'avoir été contaminés. »

Conséquence : Le laboratoire ne sait pas à quoi se référer pour déterminer l'impact potentiel de cette contamination sur la qualité des résultats et sur la prise en charge éventuelle du patient.

Le laboratoire doit pouvoir interpréter l'évaluation de la contamination inter-échantillon pratiquée et, en cas d'influence, prendre les mesures nécessaires.

Le protocole prévoit d'effectuer un test *t* de Student pour définir si les différences sont significatives ou non. Si les différences ne sont pas significatives, il est inutile de calculer un pourcentage difficile à apprécier. Si la différence est significative, il faut définir à partir de quelle valeur la contamination peut conduire à un résultat erroné affectant une prise en charge appropriée du patient.

Malgré cette nécessité, les résultats obtenus ne sont généralement pas interprétés. Ce point peut donner lieu à une formation complémentaire pour ne pas fausser un diagnostic.

15. Autres

15.1 Formalisation du dossier

Anomalie constatée : « Absence de dossier de vérification de méthodes :

- soit les dosages ont été effectués mais les résultats ne sont pas compilés, en un dossier formalisé de synthèse,
- soit les essais n'ont pas été effectués,
- soit les données ne sont accompagnées d'aucune conclusion. »

Conséquence : L'exigence de la norme n'est pas appliquée. Le laboratoire ne peut pas apporter la preuve de la performance des méthodes utilisées.

15.2 Relecture insuffisante :

Anomalie constatée : « Coupé-collé inapproprié. »

Conséquence : Les dossiers sont voisins et la tentation de recopier les dossiers chlorure, pour le sodium et le potassium par exemple, sans vérification préalable, peut conduire à des données absurdes.

Certains dossiers sont manifestement préparés à partir d'un autre par « coupé-collé » sans prendre garde aux différences.

15.3 Date des essais/date de mise en service

Les essais doivent être conduits avant la mise en service de la méthode. Cependant, s'ils n'ont pas été formalisés au moment de la mise en service, les résultats présentés peuvent correspondre à ceux accumulés au cours de l'utilisation de la méthode. Depuis 2013, la date des essais devrait précéder celle de la mise en service.

15.4 Conservation des données brutes

Anomalie constatée : « Les fichiers de données stockés sous EXCEL ne sont pas verrouillés. »

Conséquences : Il y a un risque de modification des données enregistrées.

15.5 Validation du dossier, autorisation de mise en service

Anomalie constatée : « Le dossier de vérification n'est pas daté, pas signé. L'autorisation d'emploi de la méthode n'est pas formalisée. »

Conséquences : Le défaut de formalisation du dossier introduit une incertitude préjudiciable sur l'engagement du laboratoire et sur la traçabilité relative à la méthode utilisée.

15.6 Mesurande

Anomalie constatée : « Le milieu biologique dans lequel est mesuré le constituant à mesurer n'est pas précisé. »

Exemple 1 : « Le glucose mesuré dans le sang diffère d'un glucose mesuré dans le plasma. Cela signifie que si le laboratoire utilise les 2 méthodes, ce n'est pas le même mesurande et qu'il est, en conséquence, inutile de prouver la cohérence entre les résultats des 2 méthodes. »

Exemple 2 : dosage du sodium sans autre indication : « La définition de la nature du mesurande et du milieu biologique est incomplète pour le dosage du sodium. Le milieu n'est pas défini, ni le mode de mesure. S'il s'agit d'un dosage par potentiométrie indirecte, ou par potentiométrie directe, le mesurande n'est pas le même et la cohérence entre les résultats des 2 systèmes n'est pas à démontrer. »

C'est le cas d'un analyseur de gaz du sang (potentiométrie directe) et d'un analyseur multiparamétrique (potentiométrie indirecte).

Conséquence : Il y a un risque d'erreur d'interprétation en cas d'utilisation d'une des 2 méthodes en remplacement de l'autre, suite à des résultats non cohérents avec les antécédents.

Un examen de biologie est prescrit pour répondre à une interrogation du clinicien. La réponse est donnée, à partir d'une mesure ou d'une recherche effectuée par la mise en œuvre d'une méthode analytique permettant de fournir un résultat représentatif de la question posée. Le composé, la molécule ou le constituant sont représentés par le « mesurande », ce que la méthode est susceptible de mesurer.

Si le même « mesurande » est analysé par 2 méthodes différentes, il faudra s'assurer que

les résultats émanant des 2 méthodes sont en cohérence. Par exemple, un sodium mesuré dans le plasma par potentiométrie directe (ex : appareil de gaz du sang) correspond à la mesure d'une concentration de sodium par litre de plasma alors que le sodium dosé par potentiométrie indirecte mesure une concentration de sodium par litre d'eau. L'application d'un facteur de correction entre les 2 méthodes ne permet pas de corriger les fausses hyponatrémies observées en potentiométrie indirecte. La connaissance de la nature du mesurande représente donc un élément de pertinence pour l'interprétation des résultats : le mesurande « sodium » n'est pas suffisant pour définir ce qui est réellement mesuré.

Autre exemple : le dosage des triglycérides consiste à doser le glycérol après l'action d'une lipase. Le mesurande est donc le glycérol. La plupart des méthodes utilisées ne dosent pas le glycérol préexistant dans le sérum ou le plasma avant l'action de la lipase, ce qui signifie que, si le patient présente une glycérolémie importante (due à un déficit en glycérol kinase par exemple), ce type de méthode peut conduire à des résultats de triglycéridémie faussement élevés.

Ces deux exemples illustrent l'importance pour le biologiste de connaître les outils utilisés et d'être conscient de leurs limites ; c'est pourquoi il convient de préciser et la méthode et le milieu (sang ou plasma).

15.7 Utilisation de logiciels de validation de méthodes

Un grand nombre de dossiers de vérification de méthodes sont élaborés avec l'aide de logiciels de traitement de données. Leur utilisation permet une harmonisation des calculs et des dossiers. Cependant, les commentaires générés automatiquement observés ne sont pas toujours pertinents.

IV - Conclusion

Les différentes anomalies rapportées dans cet article correspondent aux anomalies les plus fréquemment rapportées dans les dossiers examinés.

Toutefois, la plupart des dossiers sont complétés à l'aide de données rétrospectives pour les méthodes déjà utilisées au laboratoire au moment de la demande d'accréditation. Pour les méthodes nouvelles, un dossier doit être formalisé avant leur utilisation.

Il conviendrait que les laboratoires disposent, d'une part, d'un dossier établi en validation initiale élaboré avant la mise en routine de la méthode, complété pendant les premières semaines d'utilisation et, d'autre part, d'un dossier de maîtrise en continu des performances, établi à partir des données de contrôle de qualité (CIQ, CIQ/CIL, EEQ).



POUR ALLER PLUS LOIN

Normes et textes réglementaires

Afnor, NF EN ISO 15189 : 2012, Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence

Cofrac, SH REF 02, Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012, www.cofrac.fr

Cofrac, SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, Rev 01, 2015, www.cofrac.fr

Cofrac, SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, V00, 2011, www.cofrac.fr

Cofrac, SH GTA 14, Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, 2011, www.cofrac.fr

Afnor, Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Parties 1-6, NF ISO 5725 : 1994 et rectificatifs techniques

Recommandations de la SFBC

VASSAULT A., HULIN A., CHAPUZET E., ARNAUD J., GIROUD C. et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC, Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse - Qualité et accréditation en biologie médicale, *Ann Biol Clin*, 2010, 68(Spec N°1) :247-294

HENNY J., ARNAUD J., GIROUD C., VASSAULT A. et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC, Intervalles de référence : détermination et vérification, *Ann Biol Clin*, 2010, 68(Spec N°1):305-310

GIROUD C., ARNAUD J., VASSAULT A. et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC, Incertitude de mesure, *Ann Biol Clin*, 2010, 68(Spec N°1):237-245

VASSAULT A., GRAFMEYER D., NAUDIN C., *et al*, et les membres de la commission de Validation de techniques de la SFBC, Protocole de validation de techniques (Protocole Valtec) - Document B., *Ann Biol Clin*, 1986, 44:686-745

VASSAULT A., GRAFMEYER D., DE GRAEVE J., COHEN R., BEAUDONNET A., BIENVENU J., Groupe de travail SFBC, Analyses de biologie médicale : spécification et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques, *Ann Biol Clin*, 1999, 57:685-695

Autres articles

VASSAULT A., Procédure de validation d'une technique, *Spectra Biologie*, 1997, 16(90):43-50

GIROUD C., DUMONTET M., VASSAULT A., BRACONNIER F., FERARD G., Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale (Document F), *Ann Biol Clin*, 2007, 65:185-200

recommandations de la SFBC

