

Atelier M10
Validation de méthode en virologie
De la théorie à la pratique

Dr Marcel Miédougé
Institut Fédératif de Biologie de Purpan
Laboratoire de Virologie - CHU de Toulouse

Colloque National des Biologistes des Hôpitaux
Toulouse 27-09-2012

IFB Purpan CHU de Toulouse



Programme

- ✓ Rappels théoriques sur l'accréditation
- ✓ La validation de méthodes
- ✓ Le suivi de la méthode

Rappels théoriques sur l'accréditation

La norme ISO 15189

Laboratoire d'analyses de biologie médicale

Exigences particulières concernant la qualité et la compétence

- ✓ **Version 2 - Aout 2007**
- ✓ **Internationale** (Organisation Internationale de Normalisation)
- ✓ **Partie 4 : Exigences relatives au management**
- ✓ **Partie 5 : Exigences techniques**
 - 5.5 : Procédures analytiques
 - 5.5.2 : le laboratoire doit utiliser uniquement des méthodes validées...

Les référentiels du COFRAC

DOCUMENTS DE REFERENCE (REF)

RÉFÉRENCE	TITRE
SH REF 08	Expression et évaluation des portées d'accréditation
SH INF 50	Portées types

GUIDES TECHNIQUES D'ACCREDITATION (GTA)

RÉFÉRENCE	TITRE
SH GTA 04	Guide technique d'accréditation de vérification (PORTEE A) / Validation (PORTEE B) des méthodes en biologie médicale
SH GTA 14	Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale
SH GTA 06	Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale

FORMULAIRES (FORM)

RÉFÉRENCE	TITRE
SH FORM 43	FICHE TYPE QUANTITATIF - Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale
SH FORM 44	FICHE TYPE QUALITATIF - Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Références

- ✓ **Textes législatifs :**
 - ✓ Code de santé publique
 - ✓ Décrets et arrêtés

- ✓ **Directive européenne de marquage CE**
 - ✓ Cas général : « simple déclaration »
 - ✓ Réactifs annexe II, liste A : HIV, HTLV, hépatite B,C, D
 - Dossier validé par organisme notificateur
 - STC : Spécifications techniques communes
 - Libérations des lots validé par organisme agréé

- ✓ **Assimilables : recommandations HAS, RE VIR..**

STC

- ✓ Exigences dépistage HIV :
 - ✓ Spécificité : tests à réaliser ???
 - ✓ Spécificité : exigence ???
 - ✓ Sensibilité : exigence ???
 - ✓ Limite de détection AgP24 : ???

La validation de méthodes

Portée flexible A et B

- ✓ SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation
- ✓ Portée (de la demande) d'accréditation :
 - « Énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le LBM est accrédité (demande l'accréditation) »
- ✓ Portée A :
 - « Portée correspondant à une demande d'accréditation du LBM souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, d'utiliser sous accréditation les révisions successives des méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées. »
- ✓ Portée B :
 - « Portée correspondant à une demande d'accréditation du LBM souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées. »

Procédure validation de méthodes

- ✓ Référence : SH GTA 04
- ✓ Responsabilité
- ✓ Décrire le processus
- ✓ Créer un modèle de protocole type

Qualitatif ou quantitatif ?

Les méthodes de type quantitatif :

Elles fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule ou organisme, ...) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes). Sont également assimilés au type quantitatif, les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable (absorbance par exemple), avec interprétation par rapport à un seuil (examens réalisés en technique EIA ou RIA par exemple).

Les méthodes de type qualitatif :

Le résultat de ce type de méthode n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée. On peut classer dans cette catégorie tous les examens où aucune mesure d'une donnée quantifiable ne peut être déterminée et ceux dont le résultat est obtenu par l'observation de la réaction, par comparaison avec des témoins positif et négatif notamment

Exemples :

- La plupart des examens de biochimie, d'hormonologie, d'hémocytométrie, et d'hémostase sont des examens réalisés par des méthodes de type quantitatif. De même en immunologie par exemple le dosage des immunoglobulines, des IgE totales, des fractions du complément, ou des anticorps (Ac anti-HBs, etc.) et certains examens de sérologies virales (hépatites, HIV et HTLV, CMV, etc.), parasitaires (toxoplasmose, etc.) sont des examens assimilables à des méthodes quantitatives,
- Les examens faisant appel à des principes d'immuno chromatographie (sérologies unitaires par exemple), de Blot et assimilés (Western-Blot, RIBA, etc.), d'agglutination de latex, de particules sensibilisées ou d'hématies (VDRL, TPHA, Facteur rhumatoïde, RAI, groupage sanguin, etc.), d'Immunoélectrophorèse, ou d'Immunofluorescence (auto-anticorps, sérologies,) sont typiquement réalisés par des méthodes de type qualitatif, tout comme les examens d'identification de germes en microbiologie ou de cellules en hématocytologie.

Protocole

Test Qualitatif



Modèle SH FORM 44



Portée A (Vérification)
Portée B (Validation)

Test Quantitatif



Modèle SH FORM 43



Portée A (Vérification)
Portée B (Validation)

Exemple quantitatif (1)

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :

CODE : XXXX

METHODE QUANTITATIVE :

Virus HBV : détection/quantification des anticorps anti-HBS

Exemple quantitatif (2)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Anticorps anti-HBs
Principe de la Mesure :	Chimiluminescence
Méthode de mesure :	Trousse X sur automate Y
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...):	lister
Type de récipient, Additifs (tubes, ...):	lister
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...):	détailler
Unités :	UI/ml
Marquage CE	OUI
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	détailler
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	détailler
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Standard OMS
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Détailler calibration

Exemple quantitatif (3)

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Nom des techniciens (s)
Procédure de validation :	PG-XXX
Procédure de gestion de la portée flexible :	PG-YYY
Type de portée	A
Période d'évaluation :	Mars/avril 2010
Date de mise en service :	15 avril 2010
Date de début de rendu sous accréditation	01 mai 2010
Autorisation par :	Nom du biologiste

Exemple quantitatif (4)

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs	Lister	MOP Analyse du risque
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Lister	idem
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Habilitation au poste de travail	PG-ZZZ
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Lister	MOP Analyse du risque
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Lister	MOP Suivi réactifs
Matériau de références (témoins) :	Lister	MOP Suivi réactifs
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Lister	MOP correspondants

Exemple quantitatif (5)

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE Vérification sur site : Portée A : OUI (NON sur GTA), Portée B : OUI		
EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
-Spécifications Techniques Communes pour les tests inclus dans la liste A ou B de l'annexe II. -Pour les autres marqueurs : 96 à 99,5% par analogie.	A remplir	Evaluer sur 10 à 30 échantillons négatifs selon disponibilités.

Exemple quantitatif (6)

REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE	
Vérification sur site : Portée A : OUI , Portée B : OUI	
EXIGENCE	VERIFICATION SUR SITE
<p>Coefficient de variation (CV) < XX % L'analyse de « l'état de l'art » en sérologie virale (sérologie HIV, virus des hépatites A, B et C, CMV, rubéole) à partir des résultats des programmes d'EEQ (CNQ, CTCB :Centre Toulousain de Contrôle de qualité en Biologie) montre que les techniques les plus utilisées permettent d'obtenir des CV au dessous de XX %.</p>	<p><u>Répétabilité :</u> Au moins 1 sérum négatif et 1 sérum positif testés sur une seule série à raison de 10 à 30 déterminations selon les possibilités et le coût (minimum 5).</p> <p><u>Reproductibilité :</u> Réalisé sur le Contrôle de qualité fournisseur et indépendant sur plusieurs séries à raison de 5 à 30 déterminations selon les possibilités et le coût. La reproductibilité notamment inter-lot sera ensuite affinée lors du suivi de la méthode.</p>

Exemple quantitatif (7)

Répétabilité:

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Conclusion Conforme/Non Conforme
Echantillon niveau 1						
Echantillon niveau 2						

Fidélité intermédiaire (= reproductibilité intralaboratoire) :

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Conclusion Conforme/Non Conforme
Echantillon niveau 1						
Echantillon niveau 2						

Exemple quantitatif (8)

Exactitude Vérification sur site : Portée A (dès que possible) : OUI, B : OUI	
Type de marqueurs	VERIFICATION SUR SITE
Marqueurs quantitatifs avec résultats en unités internationales : sera intégré au calcul de l'incertitude.	Réalisé le cas échéant à partir de l'étalon international fourni par le NIBSC. Celui-ci est reconstitué et la concentration adaptée au niveau cliniquement pertinent. L'échantillon est testé 5 à 10 fois et la moyenne déterminée. Le biais est ensuite calculé : Biais = Moyenne – Valeur théorique
Marqueurs quantitatifs avec résultats non standardisés (ratio par exemple)	Suivi ponctuel sur CQE si analyse statistique disponible : notamment biais et z score

Exemple : CTCB (2)

- **Statistiques selon la norme ISO 13 528**
 - Elimination des valeurs totalement aberrantes (médiane \pm 50%)
 - Déterminations des moyennes (Mr) et écart-types (ETr) robustes pour chaque trousse avec effectif ≥ 3 et résultats interprétables.
- **Valeur assignée : moyenne des pairs**
- **Calcul du score « z » : $(\text{Résultat} - \text{Mr}) / \text{ETr}$**
 - Score de 0 à 2 : conforme
 - Score entre 2 et 3 : alerte
 - Score supérieur à 3 : action

Exemple : CTCB (2)

Compte rendu individuel: anti-HBs

Sérum 1122 - Anticorps HBs

Résultat de référence : Positif

Votre résultat qualitatif	N	Toutes techniques confondues			Votre technique : ABBOTT - Architect		
		Positif	Négatif	Douteux	Positif	Négatif	Douteux
Positif	334	333	1	0	78	0	0

Votre note : **A**

(A = Réponse attendue - B = Réponse acceptable - C = Réponse à analyser par le laboratoire - D = Réponse erronée - N.D = Non déterminée)

Votre résultat quantitatif	Seuil	Votre technique : ABBOTT - Architect			
		N	Moyenne	Ecart-type	CV
= 110	10	77	99,77	9,17	9,19

Votre score : **+1,12**

Exemple quantitatif (9)

Incertitude Vérification sur site : Portée A : OUI, B : OUI		
Type de marqueurs	Calcul	Application
Marqueurs quantitatifs avec résultats en unités internationales	Détail calcul incertitude : voir guide COFRAC SH GTA 14 Incertitude élargie U : = 2 X racine [(Et)² + (Biais)² /3] Biais : voir justesse Et : écart-type déterminé sur le niveau choisi pour déterminer l'incertitude (ou par assimilation à partir du CV de fidélité intermédiaire)	Zones douteuses en sérologie.
Marqueurs quantitatifs avec résultats non standardisés	Non calculé. Mais suivi de la méthode : -CQE -CQII trimestriel	Zones douteuses en sérologie.

Exemple quantitatif (10)

INTERVALLE DE MESURE

Vérification sur site : Portée A : si nécessaire (technique avec zone étendue de valeurs possible)

Portée B : OUI

LIMITE DE DETECTION

S : EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
<ul style="list-style-type: none">-Critères définis dans les STC si disponibles.-A définir selon la pertinence clinique pour les marqueurs quantitatifs : niveau admis comme celui conférant une immunité protectrice principalement.-Spécifications indiquées dans la notice	A remplir	<p>Réalisé le cas échéant à partir de l'étalon international fourni par le NIBSC. Celui-ci sera reconstitué et la concentration ramenée au seuil de détection et testé 5 fois.</p> <p>A coupler éventuellement avec l'évaluation de la justesse.</p> <p>Anti-HBs, Rubéole IgG AgHBs HIV combo</p>

Exemple quantitatif (11)

LIMITE DE QUANTIFICATION : Non pertinent en sérologie		
EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
<p>-Critères définis dans les STC si disponibles. -Autres : à définir pour les autres marqueurs selon la pertinence clinique et les spécifications indiquées dans la notice</p>	<p>A remplir</p>	<p>Vérification portée A : Réalisée au seuil de quantification en effectuant un test de répétabilité sur 5 échantillons</p> <p>Détermination en portée B : Réalisée à partir d'une gamme décroissante préparée par dilution de l'étalon international avec répétabilité testé sur 5 à 10 répliquats à chaque point. Limite = valeur minimum pour laquelle les exigences de répétabilité sont obtenues.</p>

Exemple quantitatif (12)

LINEARITE		
EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
<p>-Analyser le domaine de mesure et discuter la nécessité d'une étape de dilution pour les valeurs hors du domaine de mesure</p> <p>- Linéarité : coefficient de régression linéaire $R^2 > 0,95$.</p>	<p>A remplir</p>	<p>Évaluée en utilisant une gamme en 5 points répartis sur le domaine d'analyse préparée à partir du standard OMS ou d'un échantillon ayant une concentration élevée. Valider si nécessaire le protocole de dilution en testant plusieurs dilutions réalisées à partir de l'étalon ou de patients.</p>

Exemple quantitatif (13)

COMPARAISON DE METHODES		
Vérification sur site : Portée A : OUI, Portée B : OUI		
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :		
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :		
EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
<p>Sensibilité diagnostique et analyse des discordances : STC : 98 à 100% en fonction des virus et des marqueurs. Autres marqueurs : par analogie la cible minimale est fixée à 98%.</p> <p>Corrélation pour les méthodes standardisées : - test de Spearman : corrélation significative si $p < 0,05$. -Equation de la droite de régression : Pente proche de 1 et ordonnée à l'origine proche de 0 -Diagramme des différences Ecart à discuter selon état de l'art et répercussions cliniques.</p> <p>Appareils en miroir : corrélation et comparaison des contrôles de qualité (écart inférieur à 2,8* ET selon SH GTA 01 ou selon CV de reproductibilité)</p>	A remplir	<p>Tester 10 à 50 échantillons (selon disponibilité) de positivité connue (ancienne méthode utilisée ou critères moléculaires ou clinique de concentration connue et répartie sur le domaine de quantification.</p> <p>Sensibilité diagnostique et analyse des discordances : Corrélation pour les méthodes standardisées : - test de Spearman : -Equation de la droite de régression : -Diagramme des différences</p> <p>Dispositions mises en œuvre le cas échéant : facteur de correction, mesures transitoires...)</p>

Exemple quantitatif (14)

INTERFERENCES	
Vérification sur site : Portée A : si nécessaire (pour confirmer ou en cas d'interférences non décrites), Portée B : OUI	
Vérification bibliographique :	
Vérification :	(ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :

CONTAMINATION	
Vérification sur site : Portée A : OUI, Portée B : OUI	
Inter échantillon	Alterner 1 échantillon positif fort avec 1 négatif (3 fois)
Vérification bibliographique :	
Vérification :	

Exemple quantitatif (15)

ROBUSTESSE	
Vérification sur site : Portée A : NON, Portée B : OUI	
Données bibliographiques :	
Vérification sur site :	<ul style="list-style-type: none">-Evaluer si possible l'impact des conditions ambiantes (température, temps, effet de bord ou de position..).-La robustesse sera ensuite plus précisément évaluée dans le cadre du suivi à long terme de la méthode.
Conclusions et dispositions:	

STABILITE DES REACTIFS	
Vérification sur site : Portée A : NON, Portée B : OUI	
Données bibliographiques :	
Vérification sur site :	<ul style="list-style-type: none">-Tester échantillon connu et faire un graphe avec jours en abscisses et % de variation en ordonnée : stabilité = atteinte quand on dépasse les limites acceptables de variation (CV de reproductibilité)-La stabilité sera plus précisément évaluée dans le cadre du suivi à long terme de la méthode (Conformité du contrôle de qualité en fin de coffret...)
Conclusions et dispositions :	

Le suivi de la méthode

A intégrer dans le dossier de suivi

- Suivi des contrôles de qualité interne et externe
- Réactovigilance
- Divers

CIQ : contrôle interne de la qualité (1)

- ✓ Référence : SH GTA 06
- ✓ Contrôles fournisseurs : variabilité intra lot
- ✓ Contrôle indépendant :
 - proche du seuil
 - Variabilité inter lot
 - Validation nouveau lot
 - commerciaux ou « maison »
- ✓ Contrôle interne externalisé

EEQ : évaluation externe de la qualité

- ✓ **CNQ Afssaps**
- ✓ **OCIL : Organismes de comparaisons interlaboratoires**
- ✓ **Echanges inter-laboratoires**

Exemple : CTCB

Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique

- **Accréditation obtenue en novembre 2009**
- **Portée d'accréditation**
 - Parasitologie/Virologie : sérologies Toxoplasmose – Rubéole – EBV – CMV,
 - Virologie : sérologies Hépatites A, B, C, E, HIV et HTLV
 - Virologie : biologie Moléculaire HIV, HBV, HCV, HPV.
 - Biochimie, Bactériologie
- **Référentiel**
 - LAB CIL REF 02 : Organismes de comparaisons interlaboratoires : exigences pour l'accréditation.
 - NF ISO 13528 : Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires

Exemple : CTCB (2)

Analyse des résultats quantitatifs: anti-HBs

Analyse des réponses quantitatives

Trousses	N	N*	Min*	Max*	Moy r	ET r	CV r
ABBOTT - Architect	78	77	74	121,19	99,8	9,17	9,2
ABBOTT - AxSYM	32	31	115	196	149	21,1	14,2
BECKMAN - Access	16	16	91	156,1	109	13	12
BECKMAN - UniCel Dxi 600 / 800	34	33	64	147	103	12,5	12,1
BIOMERIEUX - Vidas	17	17	133	187	159	17,3	10,9
BIORAD - Monalisa	4	3	133	168,34	137	5,62	4,1
ORTHO - Vitros	13	13	101	116	109	4,59	4,2
ROCHE - Cobas 6000 - 8000 / Modular	77	77	127	180,8	161	7,77	4,8
ROCHE - Elecsys / Cobas e411	17	17	141,9	177	160	10,3	6,4
SIEMENS - Advia Centaur	29	29	133	213	196	11	5,6
SIEMENS - Immulite 2000	4	4	118	141	135	5,67	4,2