

# Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal

SELON LA NORME NF EN ISO 15189

Partie 2 : Phase analytique - octobre 2014

GROUPE DE TRAVAIL QUALITÉ – COMMISSION TECHNIQUE AFDPHE



Association Française  
pour le **D**épistage  
et la **P**révention  
des **H**andicaps de l'**E**nfant

**Membres du groupe**

**Claude BENDAVID, David CHEILLAN, Christine COLLET,  
Michèle COLOMBIER, Christelle CORNE, Marie-Christine DENIS,  
Marie-France FRIGERE, Roselyne GARNOTEL, David GUENET,  
Samir MESLI, Gilles RENOM.**

**Comité de lecture**

**Benoit CYPRIANI, Sophie MIRALLIE, Jean-Louis PERIGNON.**

# SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>2. VÉRIFICATION/VALIDATION DE MÉTHODES</b>	<b>5</b>
2.1. Portée A : VÉRIFICATION DE MÉTHODES	5
2.1.1/ Vérification de la fidélité	5
2.1.2/ Approche de la justesse	6
2.1.3/ Vérification de l'exactitude	6
2.1.4/ Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure	6
2.1.5/ Vérification de l'intervalle de mesure	7
2.1.6/ Vérification de l'absence de contamination inter-échantillon (s'il y a lieu)	7
2.1.7/ Vérification de la stabilité des réactifs	8
2.1.8/ Vérification des interférences	8
2.1.9/ Intervalles de référence	8
2.1.10/ Comparaison de méthodes	8
2.1.11/ Analyse des discordances	8
2.2. Portée B : VALIDATION DE MÉTHODES	13
2.2.1/ Evaluation de la fidélité	13
2.2.2/ Evaluation de l'exactitude	13
2.2.3/ Evaluation de l'intervalle de mesure	14
2.2.4/ Evaluation des intervalles de référence	14
2.2.5/ Evaluation de l'incertitude de mesure	14
2.2.6/ Vérification de l'absence de contamination inter-échantillon	14
2.2.7/ Evaluation des interférences	14
2.2.8/ Evaluation de la stabilité des réactifs	14
2.2.9/ Comparaison de méthodes	14
<b>3. SUIVI DES PERFORMANCES</b>	<b>15</b>
3.1. Suivi périodique des CIQ	15
3.2. Incertitudes de mesure	15
3.3. Comparaison des automates (miroir ou repli)	15
<b>4. AU QUOTIDIEN</b>	<b>15</b>
4.1. Traçabilité	15
4.2. Conseils pour la gestion des CIQ	16
4.3. Vérification technique	16
4.4. Environnement	16
4.5. Indicateurs qualité	16
4.6. Intervention et/ou maintenance par le fournisseur	17

## 1. INTRODUCTION

L'objectif de ce document est de fournir un guide aux laboratoires de dépistage néonatal engagés dans la démarche d'accréditation (arrêté du 17 octobre 2012). La première partie du travail a été focalisée sur les vérifications et validations de méthodes de type quantitatif utilisées dans les laboratoires de dépistage néonatal.

Sont exclus pour l'instant :

- l'analyse en biologie moléculaire du gène de la mucoviscidose
- la recherche de la drépanocytose
- tous les suivis de patients.

La norme ISO 15189 demande en effet de déterminer des critères de performance pertinents (préablement à l'étude expérimentale) mais leurs limites d'acceptabilité sont difficiles à établir dans le contexte du dépistage néonatal car les données de la littérature sont très pauvres vis-à-vis des examens réalisés sur papier buvard. Chaque laboratoire pourra donc s'appuyer sur les recommandations de ce groupe de travail.

### Extrait du SH GTA 04 revoo, avril 2011

Ce dossier apporte les éléments de vérification suivants, par recherche bibliographique et/ou par vérification sur site

PARAMÈTRES À VÉRIFIER ET/OU À CONNAÎTRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<b>Spécificité</b> analytique	Oui	Non	Oui
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	Oui	Oui
<b>Justesse</b> (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible	Oui
<b>Intervalle de mesure</b> (limite de quantification et limites de linéarité)	Oui	À vérifier si nécessaire <sup>(1)</sup>	Oui
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Oui	Oui	
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles	Oui
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Oui	Non	Oui
<b>Robustesse</b>	Non	Non	Si besoin
<b>Interférence</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)	Oui	À vérifier si nécessaire <sup>(2)</sup>	Oui
<b>Intervalle de référence</b> « ex-valeurs normales »	Oui	À vérifier dès que possible, si justifié	Oui à établir
Comparaison avec une méthode de référence	Oui (si existe)	Non	Oui (si possible)
Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD) <sup>(3)</sup>	Oui (si existe)	Oui (si possible)	Oui
Analyse des discordances <sup>(4)</sup>	Oui	Oui	Oui

*Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>(5)</sup> de la méthode ou du système analytique*

1. Pour des techniques avec une zone étendue de valeurs possibles.

2. Pour confirmer ou en cas d'interférences non décrites.

3. Appareils en miroir : privilégier les appareils utilisant des techniques de principes analytiques identiques sinon, il est possible d'utiliser des codes examens différents pour le même paramètre ou d'utiliser un facteur de corrections (pour les techniques linéaires) de manière transitoire. Le laboratoire doit avoir une stratégie d'uniformisation des techniques pour un même paramètre.

4. Pour les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (absorbance par exemple), avec un effet de seuil (étude des faux positifs et des faux négatifs par exemple).

5. En cas de dépassement des spécifications choisies a priori par le laboratoire, celui-ci justifie l'acceptation des écarts pour pouvoir conclure à l'aptitude de la méthode et l'enregistre.

Les données (en particulier les données brutes automatées) correspondant à la vérification ou validation de méthode sont à conserver à minima durant toute la période d'utilisation de la méthode, puis 18 mois après l'arrêt de la méthode. Attention à la traçabilité : les résultats des analyses doivent être systématiquement reliés aux différents lots de réactifs, étalons et contrôles de qualité employés pour leur obtention, ainsi qu'aux différents équipements utilisés et aux personnes intervenues. Ces données doivent figurer dans le dossier de validation de méthode.

## 2. VÉRIFICATION/VALIDATION DE MÉTHODES

### 2.1. Portée A : VÉRIFICATION DE MÉTHODES

Les méthodes automatisées distribuées par les fournisseurs et marquées CE sont considérées comme des méthodes normalisées reconnues. Ces méthodes sont toutefois à vérifier sur site au laboratoire, pour démontrer qu'elles répondent aux besoins du laboratoire et de ses clients en terme de performance analytique (cf. SH GTA 04). Il est obligatoire de rédiger un dossier par automate.

En portée A, les notices techniques du fournisseur doivent être scrupuleusement suivies puisque nous sommes dans le cadre de l'adoption des méthodes/équipements/réactifs fournisseur. Toute adaptation de la notice technique doit être validée (domaine de la portée flexible de type B).

Dans le cadre de la gestion de la portée flexible, il est important de tracer et de mesurer l'impact de tout changement de version de la notice du fournisseur.

Un exemple de SH-FORM<sub>43</sub> est donné à la fin du chapitre 2.1.

#### 2.1.1/ Vérification de la fidélité

Il est recommandé d'utiliser des CIQ mais en restant vigilant sur la qualité du punch (au centre de la tache en évitant la périphérie). Cf analyses de risques.

Les données fournisseur sont connues et doivent figurer sur le SH FORM 43 ; il est possible de les considérer comme des objectifs à atteindre, à défaut d'autres valeurs.

##### **Répétabilité**

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible.

Les recommandations du groupe sont les suivantes pour mesurer la répétabilité :

- à partir d'un CIQ
- minimum sur un niveau (autour du seuil) et 2 niveaux si possible (SH-GTA-04)
- 20 dosages minimum (recommandé 30) en raison de la faible disponibilité du matériel de contrôle.
- Critère d'acceptabilité :  $CV < 15\%$  pour les méthodes automatisées (chiffre issu du travail de synthèse des données des laboratoires de dépistage participant au groupe de travail).

##### **Fidélité intermédiaire**

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages.

Les recommandations du groupe sont les suivantes :

- à partir d'un CIQ
- tous les niveaux disponibles (2 niveaux minimum)

- 30 dosages minimum (ce qui n'est pas difficile dans notre thématique car il y a plusieurs séries de dosage par semaine).
- Critère d'acceptabilité :  $CV < 20\%$  pour les méthodes automatisées (chiffre issu du travail de synthèse des données des laboratoires de dépistage participant au groupe de travail).

### 2.1.2/ Approche de la justesse

Non applicable car pas de programme officiel de contrôle interne externalisé.

### 2.1.3/ Vérification de l'exactitude

En l'absence d'externalisation des CIQ le laboratoire établit l'inexactitude de la méthode en comparant les valeurs obtenues sur les EEQ aux valeurs cibles retenues.

Il est recommandé de prendre en compte les résultats sur plusieurs années antérieures (pour la vérification initiale) et ceux de l'année en cours pour la vérification annuelle. Le calcul de l'incertitude de mesure repose sur un biais **moyen**.

Le groupe de travail recommande :

- l'utilisation des CNQ (participation obligatoire)
- la comparaison au groupe de pairs.
- Critère d'acceptabilité : biais  $< 20\%$ .

La participation à d'autres programmes d'EEQ est encouragée mais dans tous les cas, le résultat doit être comparé à celui du groupe de pairs (notamment s'il doit être utilisé pour le calcul de l'incertitude de mesure).

Le groupe de travail propose la liste de programmes suivants :

- Newborn Screening Quality Assurance Program (CDC)
- United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)
- Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB)

### 2.1.4/ Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure

La connaissance de l'incertitude de mesure apporte au biologiste médical un élément important pour l'interprétation du résultat, par exemple lorsque ce dernier est comparé à un seuil de décision reconnu (paragraphe 5.6.2 SH REF 02).

Les paramètres de fidélité intermédiaire et d'exactitude peuvent être considérés comme 2 composantes de l'incertitude de mesure et le calcul est possible avec la somme quadratique des 2 composantes (cf. SH GTA 04 rev00, avril 2011 et SH-GTA-14).

Il est impératif de la mesurer autour de la valeur seuil (mais 2 niveaux sont conseillés).

Le groupe de travail ne formule pas de recommandation chiffrée pour l'incertitude de mesure car il est écrit dans SH GTA 14 rev00 :

*« 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. »*

Il est judicieux d'envisager une valeur de retest basée sur ce calcul d'incertitude de mesure.

- Si l'incertitude de mesure est inférieure à la différence (seuil d'action – seuil de retest proposé par l'AFDPHE), le laboratoire peut conserver le seuil de retest AFDPHE.
- Si l'incertitude de mesure est supérieure à la différence (seuil d'action – seuil de retest proposé par l'AFDPHE), il est recommandé de prendre en compte cette incertitude de mesure et de déterminer une nouvelle valeur de retest.

Une réévaluation annuelle des incertitudes est indispensable, ainsi que lors de toute modification de méthodes.

### 2.1.5/ Vérification de l'intervalle de mesure

Non applicable pour nos vérifications de méthode (la fiche technique du fabricant définit l'intervalle de mesure).

### 2.1.6/ Vérification de l'absence de contamination inter-échantillon (s'il y a lieu)

Cette vérification peut être effectuée ; elle doit être proche de zéro.

Exemple d'un protocole de dosage avec distribution horizontale pour évaluer cette contamination inter-échantillon :

Schéma de plaques pour AutoDELFIA ou GSP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	B	B	C	C	D	D	E	E	F	F
B	1	2	3	H	H	H	H	H				
C												
D				H	H	H	H	H				
E												
F				H	H	H	H	H				
G												
H				B1	B1	B1	B1	B1		1	2	3

  

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3									
B				B3	B3	B3	B3	B3				
C												
D										1	2	3
E												
F												
G												
H												

J.Leva

Les automates étant équipés d'un peigne comportant 2 lignes d'embouts, seules les lignes B, D, F et H de la plaque sont concernées.

Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Contamination en \%} = \frac{(mB_1 - mB_3)}{(mH - mB_3)} \times 100$$

En valeur absolue, cette contamination devra être inférieure à 2,8 écart-type de la répétabilité.

- : Gamme (points doublés A,B,C,D,E,F)
- : Contrôles (1,2,3)
- : Standard haut
- : Standard bas
- : Buvard blanc

### 2.1.7/ Vérification de la stabilité des réactifs

Elle n'est pas nécessaire dans le cadre de la portée A mais une grande vigilance doit être portée aux exigences techniques.

En effet, si l'utilisation du coffret est dans les limites de stabilité préconisées dans la fiche technique, il est judicieux de vérifier la stabilité des réactifs sensibles (traceur). Cf. chapitre 11-8 du SH-GTA-04.

## 2.1.8/ Vérification des interférences

Elles sont connues dans la bibliographie :

### 2.1.8.1 Méthodes DELFIA

- Interférences par EDTA et citrate pour les dosages de TSH, 17OHP et IRT sur AutoDELFIA
  - *Hotkamp U, Clin Chem, 2008 ; 54 : 602-5*
  - *Fingerhut R, Anal. Methods, 2013 ; 5 : 4769-4776*
- Interférence de la contamination fécale (chymotrypsine) des DBS pour le dosage de l'IRT.
- Interférence de l'hémoglobine, des lipides, de la bilirubine et de l'EDTA : testée par le fournisseur et inexistante sur automate GSP pour tous les paramètres.

### 2.1.8.2 Méthodes radio-immunologiques

D'après CisBio

- TSH : aucune interférence avec la bilirubine (jusqu'à 250 mg/L) et avec les triglycérides (jusqu'à 20 g/L) ; protection de la trousse contre les anticorps hétérophiles
- Trypsine : pas d'effet de la bilirubine (jusqu'à 250 mg/L) et des triglycérides (jusqu'à 20 g/L)
- 17OHP : pas de données fournisseur

## 2.1.9/ Intervalles de référence

L'AFDPHE établit les seuils d'action pour chaque dosage. Ils sont établis à partir de l'étude des percentiles de l'ensemble des naissances sur le territoire national.

## 2.1.10/ Comparaison de méthodes

Comparaison nécessaire à l'installation d'un nouvel automate, quand l'appareil est en miroir ou en back up, selon les recommandations du COFRAC.

## 2.1.11/ Analyse des discordances

Si la comparaison est réalisée, il s'agit de l'analyse des discordances des résultats de 2 méthodes de dosage pour un même patient. Cette analyse est à rapporter à l'incertitude de mesure pour chacun des automates.

Se référer à la formule proposée dans le chapitre 11.9 du SH GTA 04 (limites de suivi)



Exemple de SH FORM 43

## EXAMEN DE BIOLOGIE MÉDICALE :

**Neonatal Trypsine Immunoréactive  
sang total sur buvard**

méthode en routine depuis le xx/xx/xxxx

### DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Analyte/Mesurande :	Trypsine Immunoréactive
Principe de la Mesure :	Immunoanalyse avec marqueur
Méthode de mesure :	Time-Resolved Fluorescence Immunoassay
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	sang total séché
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Buvard AFDPHE* (papier-filtre)
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Punchage
Unités :	µg/L de sang total
Intervalles de référence <sup>(1)</sup> :	Seuil alerte : 55 µg/L de sang total Seuil d'action : 65 µg/L de sang total
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	KC
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	AutoDELFLIA® PerkinElmer 1235
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Bo05-212 Notice 1395908-5
Matériau d'étalonnage (références) :	Calibrateurs préparés à partir de sang humain avec un hémocrite à 55% et calibrés par gravimétrie
Raccordement métrologique :	/
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	6 niveaux en double (sur la 1 <sup>ère</sup> plaque) valeurs approximatives selon les lots: 0 / 25 / 50 / 100 / 250 / 500 µg/L de sang total

\* AFDPHE : Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant

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

### MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Nom (habilité)
Procédure de validation :	PROCÉDURE DE VÉRIFICATION (PORTÉE A) / VALIDATION (PORTÉE B) DES MÉTHODES QUANTITATIVES DU LABORATOIRE
Procédure de gestion de la portée flexible :	PROCÉDURE DE GESTION PORTÉE FLEXIBLE: EXAMEN BIOLOGIE MÉDICALE DU LABORATOIRE
Période d'évaluation :	xxxx à xxxxx
Date de mise en service :	Date
Autorisation de mise en service par :	Biologiste responsable

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrées	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sang total séché sur buvard AFDPHE : – Qualité du dépôt – Identitovigilance – Date de péremption	Documentation associée du laboratoire
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Punchage	Documentation associée du laboratoire
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Compétence du personnel Formation et suivi des formations	Documentation associée du laboratoire
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Température ambiante	Documentation associée du laboratoire
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Suivi des coffrets réactif : – Changement de numéro de lot – Changement de numéro de version de la fiche technique Gestion des stocks et dates de péremption Gestion des alertes ANSM	Documentation associée du laboratoire
Matériau de référence :	Conservation des standards et CIQ : – Température Gestion des CIQ	Documentation associée du laboratoire
Équipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques)	Température du réfrigérateur, chambre froide Qualité de l'eau Maintenances de l'automate	Documentation associée du laboratoire
Exigences informatiques* spécifiques	Saisie manuelle : – des valeurs des Standards et CIQ dans le logiciel AutoDELFIA – des valeurs des CIQ dans le logiciel URT Logiciel Neonat	Documentation associée du laboratoire

\* item à renseigner si nécessaire

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

**Répétabilité** : CIQ associés au coffret de réactif.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>(2)</sup> µg/L sang total	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) (recommandations AFDPHE)	Conclusion <sup>(3)</sup>
Echantillon niveau 1 : 30,0 µg/L	30				7,9 % pour niveau de 22,5 µg/L	15 %	Conforme / non conforme
Echantillon niveau 2 : 70,0 µg/L	30				7,6 % pour niveau de 48,4 µg/L	15 %	Conforme / non conforme

**Conclusions**

**Fidélité intermédiaire** : CIQ associés au coffret de réactif.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>(2)</sup> µg/L sang total	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) (recommandations AFDPHE)	Conclusion <sup>(3)</sup>
Echantillon niveau 1 : 30,0 µg/L	30				9,4 % pour niveau de 22,5 µg/L	20 %	Conforme / non conforme
Echantillon niveau 2 : 70,0 µg/L	30				8,9 % pour niveau de 48.4 µg/L	20%	Conforme / non conforme
Echantillon niveau 3 : 110,0 µg/L	30				8,0 % pour niveau de 104 µg/L	20%	Conforme / non conforme

**Conclusions**

**Justesse (approche de la)** : CIQ non externalisables

Echantillons	Nombre (N)	Valeur Labo <sup>(4)</sup> µg/L sang total	Cible (groupe de pairs) µg/L sang total	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite <sup>(5)</sup> (recommandations AFDPHE)	Conclusion
Echantillon CNQ xxDNN1	1			NA		NA	20 %	Conforme / non conforme
Echantillon CNQ xxDNN2	1			NA		NA	20%	Conforme / non conforme

**Conclusions**

2. Nombre de chiffres significatifs

3. Conforme/non conforme

4. Nombre de chiffres significatifs

5. Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

### INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation)

Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	CIQ + EEQ
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	niv 1 CIQ +/- x,x µg/L sang total soit xx %
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	niv 2 CIQ +/- x,x µg/L sang total soit xx %
Interprétation :	xxxx

#### Conclusions

Discussion par rapport à la valeur seuil.

### COMPARAISON DE METHODES (si nécessaire)

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Notice fournisseur
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	Appareil en miroir : xxxxxx
Nombre de mesures :	30 (valeurs basses et hautes)
Intervalle de comparaison adapté à l'activité du laboratoire :	xx à xx µg/L
Méthode d'exploitation des résultats :	Régression des moindres rectangles
Equation de la droite de régression :	$y = ax + b$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Limites de suivi ou calcul d'Altman
Autre interprétation graphique :	
Conclusions et dispositions <sup>(6)</sup> :	<b>Conclusion sur les discordances des résultats</b> (éviter les faux négatifs et limiter les faux positifs)

### INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B) (si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH)

Limite de détection :	NA
Mode de détermination de la limite de quantification :	NA
Limite inférieure de linéarité (de quantification) :	NA
Limite supérieure de linéarité :	NA

6. Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation *transitoire et documentée* d'un facteur de correction).

### ❖ INTERFERENCES

(ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)

Vérification bibliographique :	Notice fournisseur → Hotkamp U, <i>Clin Chem</i> , 2008 ; 54 : 602-5 → Fingerhut R, <i>Anal. Methods</i> , 2013 ; 5 : 4769-4776
Vérification :	NA

### ❖ CONTAMINATION

(indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)

Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, bHCG) :	Technique en microplaque : étude en fonction de la structure du peigne de lavage
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides) :	NA
Vérification bibliographique :	Notice fournisseur
Vérification :	Conforme / non conforme

#### Commentaires éventuels

Prévoir de mettre une conclusion et méthode déclarée validée par

Nom du biologiste

## 2.2. Portée B : VALIDATION DE MÉTHODES

Complément et précisions par rapport au paragraphe 2.1

### 2.2.1/ Evaluation de la fidélité

Les recommandations du groupe de travail sont les suivantes :

- CV de répétabilité < 15 %
- CV de fidélité intermédiaire < 20 %.

### 2.2.2/ Evaluation de l'exactitude

Cf portée A

### 2.2.3/ Evaluation de l'intervalle de mesure

L'étude de la **limite de détection** est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés pour les blancs et les échantillons. Pour l'estimer, on peut effectuer 30 mesures répétées des blancs (papier buvard vierge) dans une même série et on calcule moyennes et écarts-type de ces 30 mesures.

Limite de détection =  $3s$

La **limite de quantification** peut-être calculée de la même manière.

Limite de quantification =  $10s$

La **limite supérieure de linéarité** sera définie comme étant égale au dernier point de gamme de calibration.

### 2.2.4/ Evaluation des intervalles de référence

Cf portée A

### 2.2.5/ Evaluation de l'incertitude de mesure

Le groupe de travail ne formule pas de recommandation chiffrée pour l'incertitude de mesure car il est écrit dans SH GTA 14 revoo :

*« 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. »*

Il est judicieux d'envisager une valeur de retest basée sur ce calcul d'incertitude de mesure.

– Si l'incertitude de mesure est inférieure à la différence (seuil d'action – seuil de retest proposé par l'AFDPHE), le laboratoire peut conserver le seuil de retest AFDPE.

– Si l'incertitude de mesure est supérieure à la différence (seuil d'action – seuil de retest proposé par l'AFDPHE), il est recommandé de prendre en compte cette incertitude de mesure et de déterminer une nouvelle valeur de retest.

Une réévaluation annuelle des incertitudes est indispensable, ainsi que lors de toute modification de méthodes.

### 2.2.6/ Vérification de l'absence de contamination inter-échantillon

Elle doit être proche de zéro.

Cf SH-GTA-04 pour le calcul.

### 2.2.7/ Evaluation des interférences

Pour le dosage de la phénylalanine, absence d'interférences connues à ce jour, la présence de tyrosine (systématique) devant être considérée plutôt comme un défaut de spécificité du dosage.

### 2.2.8/ Evaluation de la stabilité des réactifs

Tous les instruments de métrologie (balances, pipettes...) doivent être contrôlés.

Les préparations de tous les réactifs doivent être tracées (qui a fait les pesées et quand) et vérifiées dans leur stabilité pendant la période choisie par le laboratoire pour leur utilisation. Il est possible de vérifier que pendant cette période les variations de DO pour un même standard sont inférieures au CV de la fidélité intermédiaire. Il est judicieux de choisir un standard proche de la valeur seuil.

On détermine ensuite une période d'utilisation inférieure ou égale à la durée testée. Les dates de péremption doivent être écrites sur tous les flacons.

### 2.2.9/ Comparaison de méthodes

Cf portée A.

## 3. SUIVI DES PERFORMANCES

### 3.1. Suivi périodique des CIQ

La périodicité est à définir en fonction du nombre d'analyses.

### 3.2. Incertitudes de mesure

Il est nécessaire de calculer cette incertitude de mesure tous les ans afin de déterminer la valeur du seuil de retest.

– Si l'incertitude de mesure est inférieure à la différence (seuil d'action – seuil de retest proposé par l'AFDPHE), le laboratoire peut conserver le seuil de retest AFDPHE.

– Si l'incertitude de mesure est supérieure à la différence (seuil d'action – seuil de retest proposé par l'AFDPHE), il est recommandé de prendre en compte cette incertitude de mesure et de déterminer une nouvelle valeur de retest..

### 3.3. Comparaison des automates (miroir ou repli)

Le groupe de travail recommande d'évaluer cette **comparaison annuelle** avec un minimum de 30 échantillons.

#### 1<sup>er</sup> cas : changement de technique

Item non obligatoire car les techniques sont recommandées, testées et suivies par l'AFDPHE. Les données sont centralisées sur le plan national.

#### 2<sup>e</sup> cas : automates en miroir

Le groupe de travail n'émet pas de recommandations. La théorie est d'utiliser la règle de la différence entre 2 résultats qui doit être inférieure à 2,8 fois l'écart-type de la fidélité intermédiaire (selon NF ISO 5725-6) et ceci sur minimum 30 échantillons.

#### 3<sup>e</sup> cas : automate de repli

Les échantillons d'EEQ doivent également être analysés sur cet appareil. Des dispositions écrites et appliquées doivent prouver la maîtrise de l'équipement à un niveau équivalent à l'équipement habituel.

## 4. AU QUOTIDIEN

### 4.1. Traçabilité

Toutes les étapes du dosage doivent être tracées de manière à pouvoir retrouver l'opérateur, le lot de réactif utilisé, les étalons et les CIQ utilisés,...

Pour les réactifs, la date de réception au laboratoire, les dates de première utilisation ou de reconstitution, ainsi que les dates de péremption avant et après ouverture sont à enregistrer.

Les versions des notices doivent être suivies et enregistrées.

Un test de traçabilité sur une demande peut constituer un bon exercice de vérification des dispositions prises.

## 4.2. Conseils pour la gestion des CIQ

Les CIQ doivent encadrer une série d'examens (début et fin). La notion de série est à définir par chaque laboratoire en fonction de son nombre d'analyses. De même, chaque laboratoire doit définir sa stratégie de gestion des CIQ (fréquence, niveaux, bornes d'acceptabilité...). Le laboratoire établit ses propres règles ou choisit des règles de Westgard pour la gestion des CIQ en apportant la plus grande vigilance et le suivi le plus strict sur **le CIQ se rapprochant le plus de la valeur seuil**.

Il est conseillé d'établir la valeur cible du laboratoire pour chaque lot de CIQ, avec un minimum de 20 résultats de dosage de ce CIQ.

Toutes les actions menées à la suite d'une anomalie sur le CIQ doivent être tracées. Les modalités de réalisation d'une étude d'impact doivent être décrites.

## 4.3. Vérification technique

### Critères de ré-analyse :

- Seuils d'alerte recommandés par l'AFDPHE et révisés annuellement Cf. § 2.1.4
- Recommandations particulières : repassage des résultats « OUT », des « Blood spot possibly missing »...

### Critères de validation des ré-analyses :

- La moyenne du retest ne peut être établie que si l'écart entre les 2 valeurs est acceptable ; le groupe de travail propose une valeur limite pour cette différence : inférieure à 2,8 écart-types de la répétabilité (selon NF ISO 5725-6 paragraphe 4.1.2).
- Comparaison de la moyenne du retest avec la première valeur (écart maximal de 2,8 écart-types de la fidélité intermédiaire). Dans le cas d'une discordance, le biologiste devra se référer aux dispositions internes du laboratoire. En l'absence de discordance, la moyenne du retest est interprétée vis-à-vis des seuils d'action recommandés par l'AFDPHE

## 4.4. Environnement

Une attention doit être portée sur les exigences métrologiques : respect et traçabilité de la température des pièces et des enceintes.

Chaque établissement définit les dispositifs à considérer comme critiques au sein du laboratoire de dépistage. Le groupe de travail n'émettra pas de recommandations à ce sujet ; chaque laboratoire devra suivre les directives du RAQ (Réfèrent Assurance Qualité) local.

## 4.5. Indicateurs qualité

Quelques exemples proposés :

- taux de CIQ rejetés
- performance du laboratoire aux EEQ
- ...



#### **4.6. Intervention et/ou maintenance par le fournisseur**

Après maintenance ou réparation, le laboratoire s'assure du fonctionnement conforme de l'équipement par une requalification adaptée, notamment à l'aide des CIQ.

Le biologiste responsable donne l'autorisation de remise en production.

En cas d'intervention par le fournisseur à distance, le laboratoire assure la traçabilité des opérations réalisées. L'enregistrement correspondant est soit fourni par le fournisseur, soit établi par le laboratoire. Le laboratoire doit exiger les preuves des essais réalisés.