

Validation de méthode : acides aminés

Marie-Hélène Read, CHU de Caen

Nov 2014

Préambule

- ▶ **Accompagnement qualité**

- ▶ RAQ + AQ I, 8 ETP /pôle biologie
- ▶ ACC 1/2 j/mois -1 an

→ extension « portée flexible » dont 10 AA

- ▶ **Evaluation COFRAC**

- ▶ 1^{ère} inspection biochimie +viro en mai 2013,
- ▶ 2^é inspection oct 2014

- ▶ **Plan selon chapitres et paragraphe de la norme**

Chapitre 5 = exigences techniques

Chapitre 4 = exigences relatives au management



5 Exigences techniques

- ▶ 5.1 Personnel
- ▶ 5.2 Locaux et conditions environnementales
- ▶ 5.3 Matériel de laboratoire
- ▶ 5.4 Procédures pré-analytiques
- ▶ 5.5 Procédures analytiques
- ▶ 5.6 Qualité des procédures analytiques
- ▶ 5.7 Procédures post-analytiques
- ▶ 5.8 Compte-rendu des résultats



5.1 Personnel

- ▶ **Fiches de poste** : secr/tech/biol/interne
- ▶ **Fiches d'habilitation** : pr tous + pr référents informatique/qualité/méetrologie...
- ▶ **Preuves de la formation**
 - ▶ Ex signatures sur fiche manip tuteur+ tech en formation
 - ▶ **Questionnaires** tech/biol/secr/internes
 - ▶ **chromato /cas cliniques** pour biologistes
 - ▶ **(5 CAAS, 5CAOU, 5ACN)**
- ▶ **Suivi habilitations** : cadre/**plannings validation**
- ▶ **Suivi formations** : traces formations internes et externes



Test interprétation chromatographie

Nom/Prénom... biol X

Date :

But du test : conclure sur les tracés

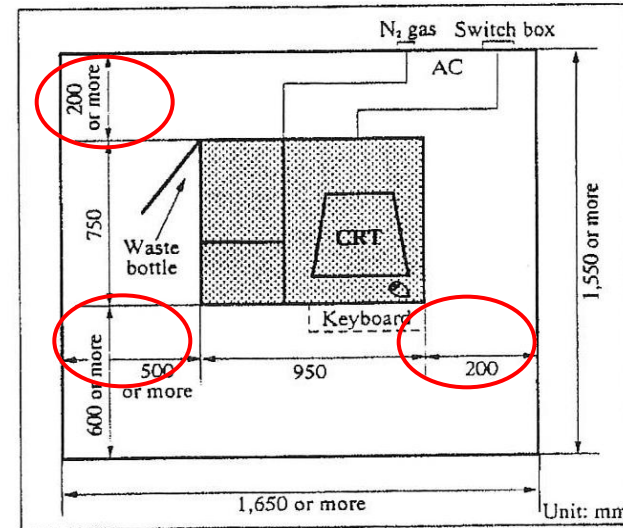
Thème : Acides aminés

Cas n°	Commentaires/conclusion	Avis/paraphe responsable
CAAS N°1	Hyperphénylalaninémie avec tyrosinémie basse chez NN de J7. Évoque PCU déficit PAH. Conseiller test au Kuvan et dosage biopéridines sang + urines.	Ok signature
CAAS N°2	Hyperglycinémie importante isolée évoque Hyperglycinémie sans cétose. Demander nouveau prélèvement avec LCR pour calcul rapport glycine LCR/plasma	Ok signature
CAAS N°3	Augmentation des acides aminés ramifiés, présence d'alloisoleucine évoque leucinose. Contacter un médecin référent



5.2 Locaux et conditions environnementales

- ▶ Signalétique /sécurité locaux
- ▶ Respecter conditions d'installation matériel ex centrifugeuses, Aminotac Jéol...



- ▶ Enceintes thermiques + sondes températures
- ▶ Non-conformité renseignées si alarmes

➤ Conditions environnementales:

Alimentation:	AC100V /115 / 200 / 230V, 50/60Hz, 1.2kVA
Bornier de mise à la terre:	Un, 100 ohms ou moins
Température:	10 à 30 °C
Variation de température:	5°C/jour, 2°C/heure ou moins
Humidité:	20 à 70%
Environnement:	absence de gaz corrosif, poussières, source de vibration et champ magnétique extérieur
Azote gazeux:	un gaz de haute pureté doit être mis à Disposition (indice de pureté: 99,9999%)
Dimensions:	950 (L) x 750 (l) x 900 (H) mm
Poids:	250kg

5.4 Procédures pré-analytiques

- ▶ Définir délai/températures acceptables AA sang/urines/LCR :
 - Dans glace délai < 6h, hors glace délai < 2h*
 - Centrifugation à froid, conservation < -15°C*
 - et date et heure déprotéinisation notée dans logiciel labo*
 - ▶ Documents cohérents : répertoire des analyses/fiche de prélèvement/bon demande/fiches techniques réception centrale
 - ▶ Habilitation des personnes en charge de la réception des tubes
 - date/h/paraphe
 - Gestion des non conformités pré-analytiques :
sur délai/température/R.cliniques/prescripteur
-



5.5 procédures analytiques

Formulaire SH FORM 43

- 1) détailler la méthode/réactifs/programme HPLC...
- 2) Lister tous les points critiques,
détailler la « maîtrise des risques »
 - ▶ penser aux **risques d'inversion de tubes**
 - ▶ détailler **critères de validation analytique**



Critères de validation analytique

Critère	OK	Observation
Standard début série/std précédent		
Hauteur/Forme pics/séparation		
Surface EI AEC (+/- 20%)		< <
Temps de rétention		Si pas OK modif table : Oui/Non
Concentrations AA std avant recal (entre 80 et 120 µmol/l)		
CIQ		
Résultats CIQ sur MVT en vert ou jaune		Si toujours rouge après 2 ^{ème} préparation (CIQ > 3 SD) remplir FNC : n°
Surface EI AEC sur CIQ (+/- 20%)		
Echantillons		
Surface EI AEC (+/- 20%)		
Vérification position des vials		
Envoi sur MVT/fin de jour		
Remplir le tableau suivi des RT et surfaces des pics du std AA		

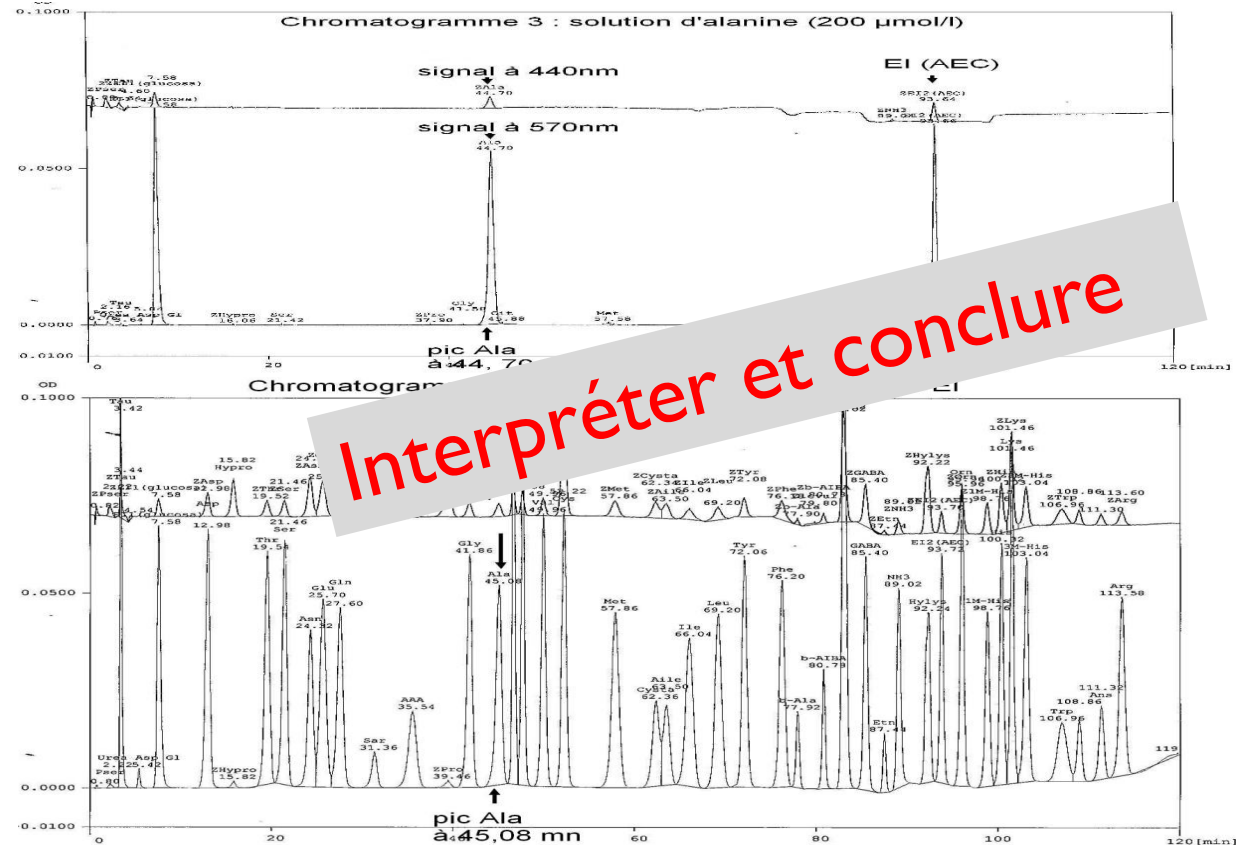
Spécificité analytique

► SH FORM 43 par acide aminé par matrice

Commander AA purs (Sigma) pour vérifier SPECIFICITE ANALYTIQUE :

- Ex de Chromatogrammes
- blanc
- l'AA pur en solution aqueuse
- l'étalon Sigma
- 6 plasmas
- 1 plasma surchargé

Tableau récapitulatif TR et TRR/aa le plus proche et/ou EI avec moy/SD/CV



SH FORM 43 - suite

2) Définir normes/âge, seuil décisionnel, limites acceptables

(CV répét et FI) pour conclure si conformité pour chaque AA

Données limites acceptables C.RICOS sur <http://www.westgard.com>

Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). Carmen Ricós...

<i>ex desirable specification pour</i>				<i>alanine</i>
<i>1%</i>	<i>=</i>	<i>CV limite FI</i>	<i>=</i>	<i>7,4 %</i>
<i>et B%</i>	<i>=</i>	<i>biais limite EEQ/pairs</i>	<i>=</i>	<i>14,4 %</i>

3) Étude répétabilité et fidélité intermédiaire (FI) sur pool de plasma ou CIQ (pour tous les AA)

Répét : n= 8 ou 10

FI : sur 2 niveaux n=30 (ou moins)

Justesse : si CIQ, calculer biais/cible CIQ

Conclure à chaque fois / limites (RICOS ou autre)



Ex présentation répétabilité

Etude de répétabilité réalisée sur n=10

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite *	Conclusion
Clinchek niveau 1	10	158,12	2,26	1,43	-	4,4	conforme
Clinchek niveau 2	10	602,40	9,61	1,60	-	4,4	conforme
SKML	10	534,88	8,19	1,53	-	4,4	conforme

*CV limite calculé en appliquant la formule CV répétabilité=0,75 du CV reproductibilité d'après A. Vassault (Ann BiolClin, 1999)

Ex présentation fidélité intermédiaire =reproductibilité

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne $\mu\text{mol/l}$	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur Inter (total)	CV (%) limite (RICOS)	Conclusion
Clinchek niveau 1	30	167,09	6,99	4,18	-	5,9	conforme
SKML	30	511,67	22,05	4,31	-	5,9	conforme

- N=30
- Durée suffisamment longue pour tester la colonne à des âges différents
- NB : CV RICOS très variables d'un AA à l'autre



SH FORM 43- suite

- ▶ **exactitude** : contrôles externes ERNDIM

16 EEQ/2 ans, calcul biais/cible pairs/limite RICOS

Justifier si biais > limite : acceptable ou anomalie ponctuelle ou non ?

- ▶ **Incertitude U** : d'après GTA-14 CIQ/EEQ, calcul à 2 niveaux

conclure pertinence calcul au niveau du ou des seuils décisionnels

- ▶ **Linéarité** testée entre 5 et 2000 $\mu\text{mol/l}$ (tous aa)

- ▶ **Contamination** vérifiée sur 1 blanc après mélange à 2000 $\mu\text{mol/L}$

Au total

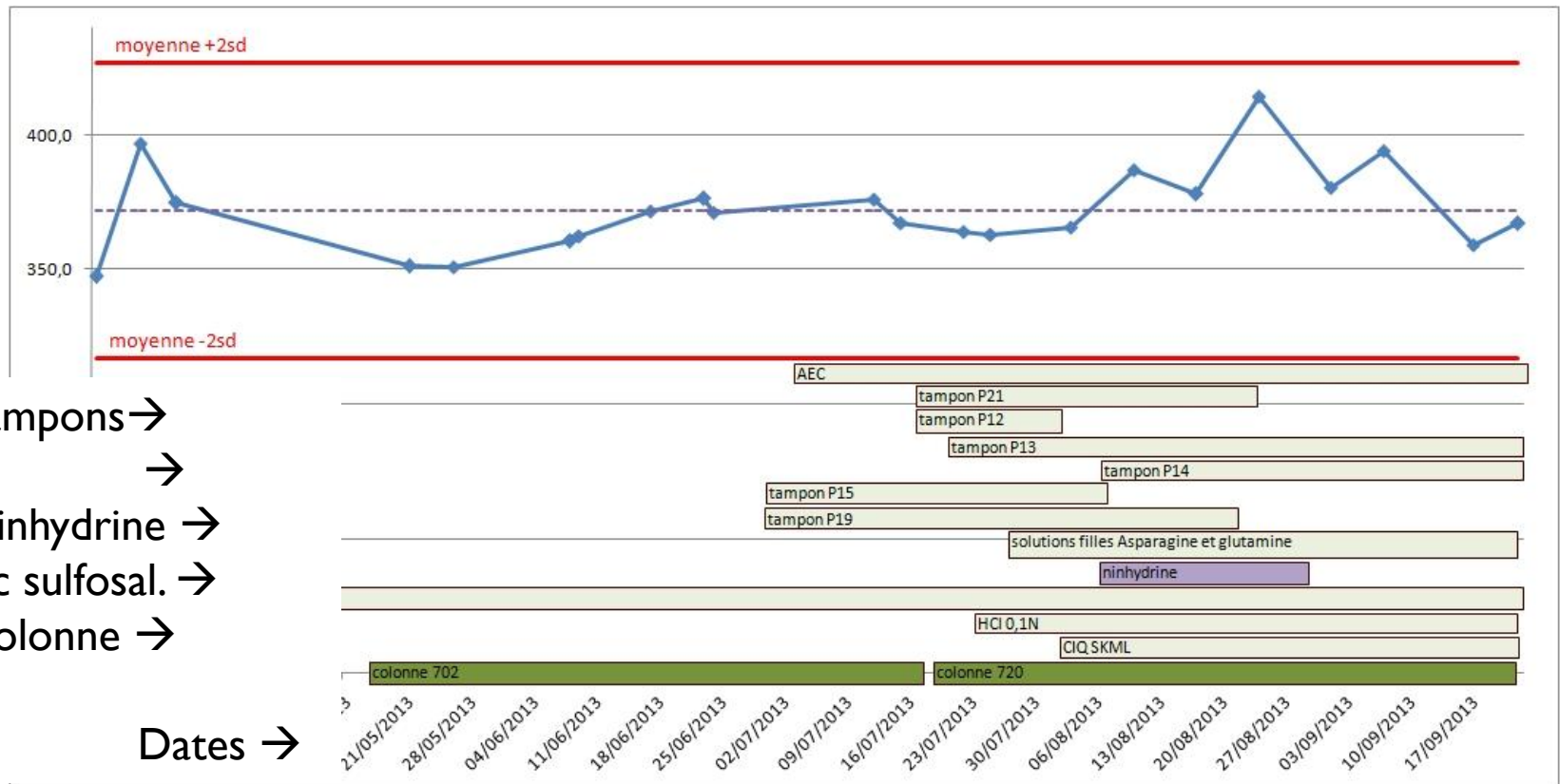
20 échantillons de répétabilité + 8 échantillons linéarité + 1 échantillon contamination

+ 1 blanc et 25 échantillons spécificité analytique soit 55 runs pour la validation de 25 AA

+ 2 CIQ/ série pour la fidélité intermédiaire

SH FORM 43- suite

- ▶ **stabilité réactifs** : périodes d'utilisation des différents réactifs sur la carte de contrôle des CIQ



SH FORM 43- suite

Robustesse → en développement, étude de l'impact de différents facteurs (conc phase mobile, âge colonne....)

→ Ou, si méthode en place, étude de la reproductibilité des temps de rétention (TR et TRR) et des surfaces des pics du calibrant au cours d'un temps suffisant pour prendre en compte les facteurs âge de la colonne et opérateur.

	ALA	GLY	EI=AEC
TR CV%	0,52%	0.56%	0,06%
TRR/ALA CV%	-	0.82%	0,56%
Surface pic CV%	6,26%	6.37%	7,19%
Rapport surface pic/surface EI CV%	3.79%	3.26%	-

Et conclure !

...bonne stabilité des temps de rétention et du signal rapporté au signal de l'étalon interne ...

La robustesse de la méthode est démontrée et est suivie régulièrement.



Procédures analytiques suite

Etudes complémentaires

Stabilité préanalytique

Centrifugation

Hémolyse

Interférences

Stabilité à bord...

Ajouter études locales si besoin mais préférer études nationales.



5.6 assurer la qualité des procédures analytiques

▶ **Suivi TR et surface de l'étalon pour chaque AA**

▶ **Suivi CIQ: CV mensuels et annuels**

NB justifier choix SD pour acceptation série – cf GTA 06

▶ **Suivi EEQ/ biais RICOS : Recalcul annuel de l'incertitude**

▶ **non-conformité et action corrective si anomalie**



Divers +++++

- ▶ Métrologie

 - Certificats étalonnage pipettes,

 - Balance (masses étalons, incertitude balance, limite pesées)

 - Centrifugeuses

- ▶ Fiches de pesée de produit

- ▶ Suivi lots de réactifs pour audit de traçabilité

- ▶ Qualification informatique liaison si transfert données



5.7 procédures post-analytiques

5.8 compte-rendu des résultats

- ▶ **Validation biologique**
 - ▶ **Fiches techniques** validation,
 - ▶ **formation** à la validation,
 - ▶ **codes pour commentaires** interprétation à formaliser
- ▶ **Suivi délai rendu résultats** : 1 enquête par an



4 Exigences relatives au management

- 4.1 organisation et management
- 4.2 système de management de la qualité
- 4.3 maîtrise des documents
- 4.4 revue de contrats
- 4.5 analyses transmises à des sous traitants
- 4.6 services externes et approvisionnement
- 4.7 Prestations de conseil
- 4.8 traitement des réclamations
- 4.9 identification et maîtrise des non-conformités
- 4.10 Actions correctives
- 4.11 Actions préventives
- 4.12 Amélioration continue
- 4.13 enregistrements qualité et enregist. techniques
- 4.14 audits internes
- 4.15 revue de direction



4.4 revue de contrats

4.5 analyses transmises à des sous traitants

4.6 services externes et approvisionnement

- ▶ **Contrats avec centres hospitaliers de la région**
+ Convention de preuve si envoi résultats par fax
- ▶ **Contrats avec sous traitants** (centres de référence)
- ▶ **Contrat avec labo si échange en cas de panne**
- ▶ Contrats internes au CHU avec services préleveurs, avec biomédical, informatique...

- ▶ Revue annuelle des contrats avec **évaluation des fournisseurs**
« critiques » (JEOL, ERNDIM ...)



4.7 prestations de conseil

Trace des « prestations de conseil » :

- Cahier ou carnet avec trace discussions téléphoniques
- sur SIL
 - « renseignement patient »
 - si résultat téléphoné,
 - si ajout d'analyse suite à conseil



4.8 Traitement des réclamations

4.9 Identification et maîtrise des non-conformités

4.10 Actions correctives

4.11 Actions préventives

4.12 Amélioration continue

▶ **Logiciel Gesqual**

- ▶ Déclaration des réclamations et non conf. : accessible à tous, déclaration simplifiée
- ▶ À suivre par les biologistes, +++ **préciser incidence sur résultats**, tracer et suivre actions
- ▶ Revue régulière par service (tous les mois ou tous les 2mois)



Au final

Dynamique de l'ensemble du laboratoire du CHU et implication de toute l'équipe +++

- ▶ Techniciens référents : Claire Soucy et Maud Marchiset
- ▶ Interne : Manon Rivière
- ▶ Biologiste responsable EEQ : Florence TRUQUET



Points abordés lors de l'évaluation

- ▶ SHFORM43 envoyés avant l'évaluation : qq remarques
- ▶ AA contraintes d'installation/température pièce/centrifugeuse
- ▶ Suivi manip avec I tech
- ▶ Questions sur maintenance, CIQ après maintenance, gestion des EEQ, non-conformités
- ▶ Tableaux calcul incertitude
- ▶ Verrouillage tableaux
- ▶ Évaluation fournisseurs



conclusion

- ▶ Beaucoup de choses à mettre en place mais les manip seront utilisables pour tous les AA
- ▶ Un CIQ titré n'est pas obligatoire (cf GTA-06)
- ▶ ERNDIM : demander biais limites acceptables et stat d'après norme I7043
- ▶ Pour urines/LCR qu'est-ce qui est justifié dans les SHFORM 43
- ▶ Pour les AA rares: quanti → SHFORM 43

- ▶ Suggestion groupe de travail biol_SFEIM_aa pour
 - ▶ revoir limites acceptables
 - ▶ Interroger ERNDIM sur stat et limites
 - ▶ Préciser exigences sur AA rares et sur matrices urines +LCR
 - ▶ ...

