

**GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION :
CONTRÔLE DE QUALITE EN BIOLOGIE
MEDICALE**

SH GTA 06

Révision 00

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



SOMMAIRE

1	OBJET DU DOCUMENT	4
2	DEFINITIONS.....	5
2.1	Les différents types de méthodes analytiques.....	5
2.2	Les différents types de contrôle de qualité	5
3	DOMAINE D'APPLICATION.....	6
4	MODALITES D'APPLICATION.....	6
5	CONTEXTE NORMATIF ET REGLEMENTAIRE	6
6	CRITERES DE PERFORMANCES DES METHODES EVALUES A PARTIR DES DONNEES DES CONTRÔLES DE QUALITE.....	7
6.1	Rappels statistiques.....	7
6.1.1	Paramètre de position	7
6.1.2	Paramètre de dispersion	8
6.2	Représentation schématique des performances évaluées	9
6.3	Evaluation des critères de performances d'une méthode.....	9
6.3.1	Fidélité intermédiaire.....	9
6.3.2	Justesse.....	9
6.3.3	Exactitude.....	10
6.3.4	Robustesse.....	10
6.3.5	Résultat et erreurs associées.....	11
7	MAITRISE DU PROCESSUS ANALYTIQUE ET CHOIX DES CRITERES D'ACCEPTABILITE	11
8	OBJECTIFS DES CONTROLES DE QUALITE INTERNES ET EXTERNES D'UNE METHODE QUANTITATIVE.....	12
9	CONTRÔLE INTERNE DE QUALITE (CIQ) - METHODES DE TYPE QUANTITATIF.....	13
9.1	Mise en place d'un système de CIQ.....	13
9.1.1	Choix des échantillons	13
9.1.2	Différents types d'échantillons de contrôle de qualité	13
9.1.3	Niveaux de concentrations.....	14
9.1.4	Notion de série et fréquence des contrôles	14
9.1.5	Période probatoire/chevauchement.....	15
9.1.6	Valeurs cibles/recyclage	15
9.1.7	Choix des seuils d'alarme et seuils d'action	15
9.1.8	Cas des méthodes avec seuil.....	15
9.2	Exploitation	16
9.2.1	Règles d'interprétations.....	16
9.2.2	Conduite à tenir.....	17
9.2.3	Cas de l'utilisation de plusieurs systèmes analytiques en "miroir"	18
10	COMPARAISONS INTERLABORATOIRES (CIL) - METHODES DE TYPE QUANTITATIF	18
10.1	Contrôle interne de qualité externalisé (CIQ externalisé)	18
10.1.1	Choix d'un programme de CIQ externalisé	19
10.1.2	Interprétation.....	19
10.2	Evaluation externe de la qualité (EEQ)	20
10.2.1	Choix d'un programme d'EEQ.....	20
10.2.2	Interprétation.....	20
10.3	Autres comparaisons interlaboratoires	21

11 MAITRISE DE LA QUALITE DES EXAMENS - METHODES DE TYPE QUALITATIF.....	21
11.1 Maîtrise de la qualification/habilitation et maintien continu des compétences du personnel.....	22
11.2 Maîtrise des conditions environnementales.....	22
11.3 Maîtrise continue des équipements.....	22
11.4 Maîtrise de l'échantillon primaire.....	23
11.5 Maîtrise de la méthode et des réactifs.....	23
11.5.1 Témoin positif/négatif	23
11.5.2 Réactifs.....	23
11.6 Contrôle interne de qualité (CIQ)	24
11.7 Evaluations Externe de la Qualité (EEQ).....	24
11.8 Exemples de maîtrise de la qualité des examens - méthodes de type qualitatif ...	25
11.9 Exemple de stratégie de mise en place du contrôle interne de qualité dans un laboratoire de bactériologie	28
11.9.1 Evaluation de la criticité des réactifs en bactériologie (Tableau 1).....	31
11.9.2 Contrôle Interne de Qualité en Bactériologie	32
11.9.3 Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)	35
11.9.4 Hémocultures.....	36
11.10 Exemple de stratégie de mise en place du contrôle de qualité en Parasitologie...	37
11.10.1 Contrôle interne de la qualité (CIQ).....	37
11.10.2 Evaluation externe de la qualité (EEQ).....	39
12 ANNEXE.....	41

1 OBJET DU DOCUMENT

La norme NF EN ISO 15189 définit les exigences générales concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale (LBM), et la norme NF EN ISO 22870 définit les exigences pour les Examens de Biologie Médicale Délocalisés (EBMD).

Le présent guide technique explicite les exigences des paragraphes 5.6 de la norme NF EN ISO 15189 ainsi que celles de la norme NF EN ISO 22870 permettant d'assurer la qualité des procédures analytiques en Biologie Médicale. Il se fonde sur les bonnes pratiques dans ce domaine et les performances communément observées et acceptées (état de l'art).

Les recommandations présentées dans ce guide, que le LBM est libre d'appliquer, sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux prescriptions et exigences des normes NF EN ISO 15189 et 22870, et du document Cofrac SH REF 02. Toute autre démarche argumentée et documentée est cependant acceptable. Dans tous les cas, le laboratoire devra démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire les exigences requises.

Ce guide s'adresse :

- aux Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) engagés dans une démarche d'accréditation auprès du COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189, complétée le cas échéant par la norme NF EN ISO 22870;
- aux évaluateurs du COFRAC : il constitue à ce titre une base d'harmonisation à leur usage ;
- aux membres des instances du COFRAC (Comité de Section, Commission Technique d'Accréditation Santé Humaine, Commission Interne d'Examen des Rapports pour l'Accréditation)
- aux fournisseurs pour comprendre et accompagner les laboratoires dans leur démarche.

Ce guide a pour but d'expliciter les aspects du contrôle de la qualité en Biologie Médicale. Il constitue un guide pratique d'aide à la mise en place de ces contrôles. Ceci s'inscrit dans le cadre de la **vérification continue des performances lors de l'utilisation** (routine) dans le laboratoire du couple équipements-réactifs, afin d'apporter une confirmation et une preuve permanentes de la validité des résultats rendus, en rapport avec les besoins définis de ses clients. Le contrôle de qualité constitue un moyen de vérification de la maîtrise en continu du processus analytique.

Le contrôle de qualité constitue la **validation continue** du processus analytique et fait suite à la vérification/validation initiale de la méthode (cf. document SH GTA 04).

Le contrôle de qualité s'adapte aux différents contextes et aux différents types d'examen des familles de la Biologie Médicale (cf. documents SH REF 08 et SH INF 50). Si "la validation est toujours un équilibre entre les coûts, les risques et les possibilités techniques " (extrait de la norme NF EN ISO/CEI 17025, § 5.4.5.3 note 3), il en est de même pour le contrôle (permanent) de la qualité analytique.

Après lecture attentive des dossiers des fournisseurs (notices, fiches techniques, références bibliographiques, ...), le biologiste médical évalue et apprécie ces informations à la lueur des recommandations ou des textes réglementaires, des critères de performance énoncés par les sociétés savantes, des attentes du prescripteur, Ce travail d'expertise est la base du métier de biologiste médical.

La conception et la mise en œuvre du contrôle de qualité sont destinées à assurer la maîtrise nécessaire et suffisante à un coût raisonnable, et à permettre une détection rapide et efficace des anomalies, sans alertes inutiles.

2 DEFINITIONS

2.1 Les différents types de méthodes analytiques

Schématiquement, on distingue deux types de méthodes (cf. document SH GTA 04) :

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 (substance, 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 ou par l'apparition d'une coloration.

2.2 Les différents types de contrôle de qualité

Contrôle interne de qualité (CIQ) : réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôles lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli.

Comparaison interlaboratoires (CIL) : organisation, exécution et évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées (NF EN ISO/CEI 17043). Le paragraphe 5.6.4 de la norme NF EN ISO 15189 précise : « Le laboratoire doit participer à des comparaisons interlaboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité ».

- **Evaluation externe de qualité (EEQ) :** Procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire (essai d'aptitude, cf. annexe : définitions) par le biais d'une comparaison interlaboratoires réalisée par un organisateur respectant substantiellement les exigences de l'ISO 43-1¹ (cf. § 5.6.4) et la réglementation en vigueur à l'aide d'échantillon de contrôles inconnus.

¹ Le guide ISO 43-1 cité dans la norme NF EN ISO 15189 : 2007 a été abrogé et est remplacé par la norme ISO/CEI 17043.

- **Contrôle interne de qualité externalisé** : CIQ réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles confrontés entre eux par établissement périodique des moyennes (*généralement mensuel*) permettant d'estimer la justesse (biais). **Le CIQ externalisé n'est pas considéré comme un EEQ (cf. document SH REF 02).**

En l'absence d'organisateur de comparaison interlaboratoires (cf. document LAB INF 19 dans l'attente de la parution du SH INF 19) pour un examen donné, le laboratoire pourra mettre en place des comparaisons par des échanges avec d'autres laboratoires (cf. § 5.6.5 NF EN ISO 15189).

3 DOMAINE D'APPLICATION

Le domaine d'application du présent guide concerne l'assurance de la qualité des résultats des processus analytiques et des examens en Biologie Médicale dont les contrôles internes de qualité (CIQ) ainsi que les comparaisons interlaboratoires (CIL), essentiellement les évaluations externes de la qualité (EEQ).

L'évaluation de la performance d'un participant peut être établi au moyen de comparaisons interlaboratoires (Essai d'aptitude ; cf. norme NF EN ISO/CEI 17043).

Le présent guide traite uniquement du contrôle de qualité de la phase analytique, les phases pré- et post-analytiques bien qu'importantes ne sont pas abordées mais doivent être maîtrisées par ailleurs.

Ce guide est applicable aux Laboratoires de Biologie Médicale accrédités ou candidats à l'accréditation.

4 MODALITES D'APPLICATION

Ce document est applicable à compter du 1er juillet 2012.

Dans le domaine de la Biologie Médicale et au jour de son approbation, ce guide technique d'accréditation reflète l'état d'avancement des connaissances en termes de contrôle de la qualité.

5 CONTEXTE NORMATIF ET REGLEMENTAIRE

La norme NF EN ISO 15189 impose, dans le § 5.6 "Assurer la qualité des procédures analytiques", que les laboratoires de Biologie Médicale mettent en place des contrôles interne et externe de qualité.

Elle précise au § 5.6.1 que :

"Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue. Il est important que ce système de maîtrise permette aux membres du personnel d'obtenir des informations claires et faciles à comprendre sur lesquelles baser leurs décisions techniques et médicales. Il convient de veiller particulièrement à éliminer les erreurs susceptibles de se produire dans le processus de traitement des échantillons, des prescriptions, des analyses, des comptes rendus, etc".

La norme aborde plus spécifiquement la notion de comparaisons interlaboratoires au § 5.6.4 :

"Le laboratoire doit participer à des comparaisons interlaboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité. La direction du laboratoire doit surveiller les résultats de l'évaluation externe de la qualité et participer à la mise en œuvre des actions correctives lorsque les critères de maîtrise ne sont pas respectés."

Ces exigences normatives sont complétées par l'Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 et plus particulièrement l'article L.6221-9 qui indique que :

« Un laboratoire de biologie médicale fait procéder au contrôle de la qualité des résultats des examens de biologie médicale qu'il réalise par des organismes d'évaluation externe de la qualité. Ces exigences sont applicables aux structures qui réalisent des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques à l'aide de techniques relevant de la biologie médicale (article L.6221-12) ainsi que les structures de l'établissement français du sang qui assurent la qualification biologique du don (article L.6221-13) ».

L'utilisation et la gestion des contrôles de qualité (CIQ, EEQ) permettent d'assurer la qualité de l'examen et la fiabilité du résultat. Après la vérification/validation des méthodes (cf. document SH GTA 04), la gestion du contrôle de qualité sera mise à profit pour estimer les incertitudes des résultats d'examen et répondre aux exigences du paragraphe 5.6.2 de la norme (cf. document SH GTA 14).

6 CRITERES DE PERFORMANCES DES METHODES EVALUES A PARTIR DES DONNEES DES CONTRÔLES DE QUALITE

6.1 Rappels statistiques

Les principaux paramètres statistiques utilisés sont :

6.1.1 Paramètre de position

- Moyenne (m) : la moyenne d'un ensemble de n résultats est la somme des résultats divisée par n .

$$m = \frac{\sum(x_i)}{n}$$

Avec :

x_i : résultat de l'échantillon de contrôle
 n : nombre de résultats

- Médiane : valeur qui partage le groupe de valeurs étudiées en deux sous-groupes de même effectif.
 On affine parfois le partage en parlant de :
 - Quartile (25% des termes < 1^{er} quartile, 50% < 2^{ème} quartile, ...).
 - Centile (1% des valeurs < 1^{er} centile, 2% < 2^{ème} centile, ...)

La médiane correspond au centile 50 (**percentile** en anglais).

Par exemple, centile 95 = 4.5 mmol/L correspond à 95 % des valeurs de la population étudiée inférieures à 4.5 mmol/L.

Autre exemple : le seuil de positivité pour la troponine donnée par l'ESC/ACC² correspond à une valeur supérieure au 99^{ème} centile de la population de référence.

- Mode : valeur la plus fréquente d'une distribution.
Dans le cadre d'une distribution Gaussienne (Loi Normale), la moyenne, la médiane et le mode sont confondus.

6.1.2 Paramètre de dispersion

- Variance : Paramètre statistique indiquant la dispersion des valeurs au niveau de la moyenne (m) d'une série de mesures.

$$\text{Variance} = \frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}$$

Soit

$$\text{Variance} = \frac{\sum (x_i)^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n - 1}$$

- Ecart-type (ET) :

$$ET = \sqrt{\text{variance}}$$

- Coefficient de variation (CV %) : Mesure de la dispersion de résultats calculée en divisant l'écart-type par la moyenne et en reportant le résultat sous forme de pourcentage.

$$CV = 100 \times ET/m$$

- Ecart-type non paramétrique :
(Centile 75 – Centile 25)/1.349³
- Etendue : Différence entre la plus petite et la plus grande des valeurs observées.

² ESC/ACC : European Society of Cardiology/American College of Cardiology

³ Hoaglin, 1983

6.2 Représentation schématique des performances évaluées

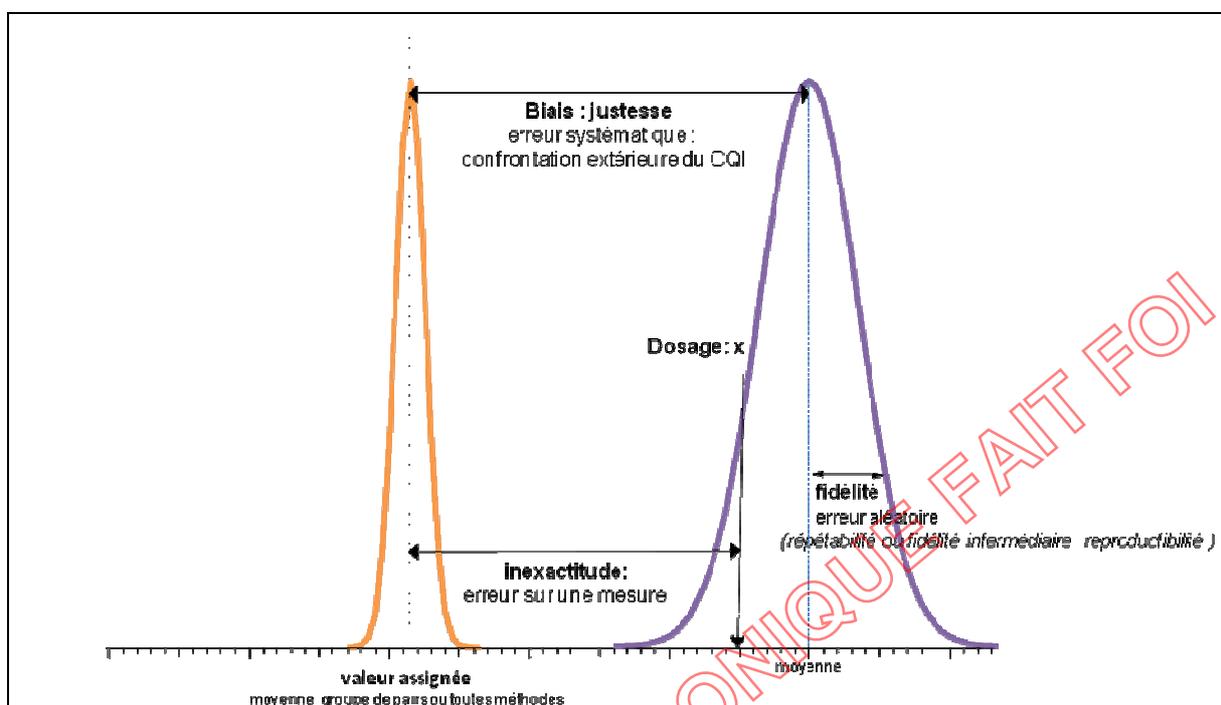


Figure 1 : Performances évaluables
X = un résultat de mesure.

Note : la *valeur assignée* (valeur cible, « vraie », ...) correspond à la valeur attribuée à une grandeur particulière et reconnue, parfois par convention, comme ayant une incertitude appropriée à un usage donné (cf. § 10).

6.3 Evaluation des critères de performances d'une méthode

6.3.1 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) est obtenue par l'analyse d'un même échantillon dans des conditions normales d'utilisation prenant en compte les facteurs tels que : opérateur, temps, lots de réactifs, étalonnages, ... (cf. document SH GTA 04). Classiquement, la fidélité intermédiaire est évaluée à l'aide du coefficient de variation calculé à partir des résultats des CIQ (au moins 15 jours ou 30 déterminations).

6.3.2 Justesse

Justesse (VIM) : étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

L'estimation du biais de justesse (cf. document SH GTA 04) peut éventuellement être établie par l'externalisation des CIQ. Une étude de justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible. L'écart observé correspond au biais. L'externalisation des CIQ permet une estimation pertinente du biais de justesse.

La justesse est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire), établie sur des échantillons de CIQ, à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur "vraie" (v) de l'échantillon testé. Cette valeur est fournie par l'organisateur de CIQ externalisé.

La justesse est exprimée par le biais en valeur absolue ou en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

$$\text{Biais en \%} = \frac{(m - v)}{v} \times 100$$

m : valeur moyenne trouvée sur des échantillons de CIQ
 v : valeur cible

6.3.3 Exactitude

Exactitude (VIM) : Etroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande.

NOTE 1 L'exactitude de mesure n'est pas une **grandeur** et ne s'exprime pas numériquement. Un **mesurage** est quelquefois dit plus exact s'il fournit une plus petite **erreur de mesure**.

NOTE 2 Il convient de ne pas utiliser le terme « exactitude de mesure » pour **justesse de mesure** et le terme « **fidélité de mesure** » pour exactitude de mesure. Celle-ci est toutefois liée aux concepts de justesse et de fidélité (cf. norme ISO 5725)

L'exactitude devrait être établie à partir d'étalon primaire et/ou de matériaux de référence certifiés (MRC). Dans la pratique en Biologie Médicale, la valeur de référence acceptée remplace la valeur vraie. A ce jour, les LBM évaluent l'exactitude à partir des données des Evaluations Externes de la Qualité (cf. document SH GTA 04).

Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat **d'un seul dosage** d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle (V). **L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude).**

L'inexactitude est exprimée en valeur absolue ou en pourcentage de la valeur cible à partir des résultats des EEQ ponctuels, selon le calcul suivant :

$$\text{Inexactitude en \%} = \frac{(x - v)}{v} \times 100$$

x : valeur trouvée pour un échantillon d'EEQ
 v : valeur cible

6.3.4 Robustesse

Par "robustesse" d'une technique d'analyse, on entend une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode, et qui fournit une indication sur sa fiabilité dans les conditions normales d'utilisation.

6.3.5 Résultat et erreurs associées

Erreur totale analytique :

Différence entre la valeur mesurée d'une grandeur et une valeur de référence, c'est la somme de l'erreur systématique (erreur de justesse) et de l'erreur aléatoire (défaut de fidélité). En biologie médicale, la valeur vraie n'étant généralement pas connue on préfère exprimer la variabilité totale des résultats d'une méthode à l'aide de l'incertitude de mesure (cf. document SH GTA 14).

Erreur totale :

Elle correspond à l'erreur totale analytique complétée par tous les éléments de l'analyse de risque portant sur l'ensemble du processus depuis la prescription jusqu'à l'utilisation du résultat. Tous ces éléments qui peuvent ne pas être quantifiables, s'ajoutent à l'erreur totale analytique.

Incertitude :

L'incertitude est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder, elle est associée à tout résultat de mesure. Son évaluation prend en compte les erreurs aléatoires et les erreurs systématiques (cf. document SH GTA 14).

L'incertitude est :

- un paramètre de dispersion caractérisant l'étendue des valeurs à l'intérieur de laquelle la valeur vraie est supposée se trouver,
- un paramètre associé au résultat d'une mesure qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait être attribué au mesurande (Eurachem).

7 MAITRISE DU PROCESSUS ANALYTIQUE ET CHOIX DES CRITERES D'ACCEPTABILITE

Selon la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.6.1) : « Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue. Il est important que ce système de maîtrise permette aux membres du personnel d'obtenir des informations claires et faciles à comprendre sur lesquelles baser leurs décisions techniques et médicales. Il convient de veiller particulièrement à éliminer les erreurs susceptibles de se produire dans le processus de traitement des échantillons, des prescriptions, des analyses, des comptes rendus, etc. »

Il est fondamental de souligner que le laboratoire doit avoir une politique et une stratégie en termes de contrôle de qualité (nature du ou des échantillon(s), contrôle(s) de trousse, contrôle(s) indépendant(s), nombre, matrice, périodicité, criticité, effectif du groupe de comparaison, exploitation statistique, planification, ...)⁴.

Il est à rappeler que le choix des indicateurs de performances et limites d'acceptabilité associées d'une méthode doit se faire **préalablement** (lorsqu'ils existent) à la mise en place du contrôle de qualité :

- le choix est du ressort du biologiste médical,
- le choix reflète l'état de l'art et la pertinence de l'interprétation clinique des résultats. Il peut s'appuyer sur les recommandations de la Haute Autorité de santé, des sociétés savantes ou de conférences de consensus, sur des publications scientifiques ou par défaut, sur les règles d'interprétation des organisateurs des EEQ.

⁴ cf. SH REF 02 (§5.6)

Pour établir les cartes de contrôle :

- les limites d'acceptabilité choisies doivent être adaptées et notifiées pour chacun des niveaux et pour chacun des analytes sous contrôle,
- les recommandations de l'ANSM en matière de réactifs de laboratoires doivent être respectées (ex : créatinine calibration en deux points, réactovigilance, ...).

Note : les performances annoncées par les fournisseurs sont à prendre en considération en comparaison avec celles obtenues par le laboratoire. Il est rappelé que le choix des limites d'acceptabilité relève de la responsabilité du biologiste.

8 OBJECTIFS DES CONTROLES DE QUALITE INTERNES ET EXTERNES D'UNE METHODE QUANTITATIVE

1^{er} objectif : contrôle de l'étalonnage

La plupart des méthodes quantitatives sont régulièrement étalonnées, la **conformité** des résultats des échantillons de CIQ apporte la preuve de la maîtrise de cet étalonnage (improprement appelé calibration). Les échantillons de patients ne peuvent être analysés qu'après la vérification de la conformité de l'étalonnage.

2^{ème} objectif : maîtrise du suivi du processus analytique à l'aide des cartes de contrôle

La maîtrise du processus analytique se fait à l'aide de cartes de contrôle de type LEVEY-JENNINGS. L'application des règles de WESTGARD permet d'optimiser l'interprétation et de l'informatiser.

Pour cet objectif, il est concevable d'utiliser des échantillons de contrôles titrés ou non (commerciaux ou fabriqués *in situ*) à condition que la taille des lots soit suffisante et la stabilité connue et maîtrisée (utilisation d'un même lot le plus longtemps possible). Il est recommandé que les échantillons de contrôle aient un comportement le plus proche possible de celui des échantillons de patients, voire identique.

Du point de vue pratique, la mise en œuvre du CIQ vise à :

- vérifier la conformité analytique des résultats en temps réel, détecter les erreurs et les corriger immédiatement,
- prévenir les erreurs par l'observation d'un certain nombre de phénomènes (dérives, variabilité, tendances, ...).

3^{ème} objectif : vérification des performances de la méthode

- *contrôle de la fidélité intermédiaire (cf. document SH GTA 04)*

Les résultats des CIQ sont analysés périodiquement (généralement mensuellement) avec comparaison des coefficients de variation pour vérifier que la technique est **reproductible** dans le temps.

- *contrôle de la justesse ou de l'exactitude (cf. document SH GTA 04)*

Les résultats des EEQ permettent une approche de l'exactitude. Les résultats des CIQ externalisés peuvent constituer une approche de la justesse.

- *estimation de l'incertitude de mesure (cf. document SH GTA 14)*

La combinaison des critères fidélité et justesse permet d'aborder la notion d'incertitude qui peut être intégrée au processus d'interprétation et de la prestation de conseil.

9 CONTRÔLE INTERNE DE QUALITE (CIQ) - méthodes de type quantitatif

9.1 Mise en place d'un système de CIQ

9.1.1 Choix des échantillons

Le ou les échantillon(s) de contrôle ne peu(ven)t en aucun cas être le matériau ayant servi à l'étalonnage et inversement.

Contrôle titré ou non titré ?

L'échantillon de contrôle utilisé pour un CIQ est destiné à établir la fidélité de la méthode testée. Cet objectif est atteint aussi bien avec un sérum titré qu'avec un sérum non titré.

Avec les échantillons titrés, le laboratoire peut comparer la moyenne obtenue au titre donné par le fournisseur. Cette approche de la justesse est à confirmer par une comparaison interlaboratoires.

Effet matrice ?

Il est souhaitable que le comportement des échantillons de contrôle choisis soit le plus proche possible de celui des échantillons biologiques analysés. Le laboratoire établira un cahier des charges en demandant à ses fournisseurs d'analyseur et d'échantillons de contrôle, les substances susceptibles d'entraîner des interférences responsables de l'« effet de matrice ».

9.1.2 Différents types d'échantillons de contrôle de qualité

Contrôle de trousse : Matériau mis au point et fabriqué pour l'évaluation spécifique d'une trousse d'un dispositif médical de diagnostic *in vitro* et généralement fourni dans celle-ci. Il est rappelé qu'un contrôle de trousse n'est pas un véritable contrôle interne de qualité mais est un témoin de réaction (exemple : témoin de coloration, de migration, ...).

Contrôle « dépendant » du fournisseur du couple réactif/analyseur : Matériau de contrôle interne de qualité mis au point et fabriqué pour l'évaluation spécifique d'un système analytique ou d'un DM-DIV et distribué par le fournisseur du système analytique.

Contrôle « indépendant » du fournisseur du couple réactif/analyseur : Matériau de contrôle interne de qualité mis au point et fabriqué indépendamment de toute trousse spécifique d'un DM-DIV et fourni séparément.

Contrôle à l'aide d'un « pool » d'échantillons biologiques : Le laboratoire peut constituer des pools à partir de ses propres échantillons. L'interprétation des pools sera basée sur les mêmes règles que celles des CIQ. Le laboratoire définira la méthode de fabrication des pools et s'assurera de leur stabilité dans le temps. Ces matériaux de contrôles peuvent être utilisés en l'absence de CIQ commercialisés ou en complément de ceux-ci.

Note : Les échantillons de contrôle, quelle que soit leur origine, doivent être manipulés avec les mêmes précautions que les échantillons de patients en raison des risques de contamination possibles.

Il est souhaitable que le laboratoire n'utilise pas que les échantillons de contrôle inclus dans les trousse, il est préférable d'ajouter un contrôle « indépendant ».

Il est également souhaitable que le laboratoire dispose d'échantillons de contrôle de différentes origines :

- contrôle commercialisé par le fournisseur du système analytique ou des réactifs,
- contrôle commercialisé par d'autres fournisseurs,
- éventuellement à l'aide de « pools » de stabilité démontrée préparés *in situ*.

Les contrôles de trousse ne peuvent être utilisés seuls que lorsque les autres types précités sont inadaptés.

9.1.3 Niveaux de concentrations

Idéalement, le CIQ porte sur différents niveaux de concentrations (au minimum 2) et notamment proche des seuils de décision clinique (exemple : HbA1c à 7.0%, glucose à 7.00 mmol/L, seuil de positivité pour les sérologies, ..).

Le contrôle à plusieurs niveaux de concentrations permet une vérification de la maîtrise du processus analytique sur toute l'étendue de mesure.

Attention

Ces échantillons sont garantis par le fournisseur pour un niveau donné, les dilutions parfois utilisées pour atteindre certains seuils doivent être employées avec précaution et validées, notamment en immunoanalyse (nature du diluant).

9.1.4 Notion de série et fréquence des contrôles

Les résultats des patients ne peuvent être libérés qu'après vérification de la conformité d'au moins un échantillon de contrôle interne. La détermination de la fréquence des contrôles relève d'une **analyse de risques**⁵, chaque laboratoire définit **pour chaque type d'examen la fréquence optimale**.

A titre d'exemples :

- En cas de grande série (300 échantillons)⁶ : analyser 2 contrôles (à 2 niveaux) environ tous les 50 à 100 échantillons en fonction de la robustesse de la technique. La stratégie de deux contrôles simultanés permet une interprétation immédiate avec une confirmation ou une infirmation de la conformité.
- En cas de travail en urgence, « au coup par coup » : la fréquence des contrôles est à définir en fonction du temps, par exemple 2 contrôles à 2 niveaux toutes les 8 heures,

⁵ Voir article C. Parvin en bibliographie

⁶ Il a été montré par NEUBAUER que l'analyse des 2 niveaux tous les 50 échantillons pour les grandes séries permettait d'améliorer l'efficacité (interprétation immédiate, optimisation du coût des contrôles par rapport à celui des « réanalyses » éventuelles).

une fréquence plus rapprochée est parfois nécessaire en cas de dérive fréquente connue.

- En cas de régénération de réactifs (ex : hémostase), prévoir l'analyse d'un contrôle par flacon de réactif régénéré.

Il est souhaitable qu'un contrôle soit pratiqué à la fin de la série afin de vérifier la maîtrise analytique de l'ensemble des échantillons analysés précédemment.

9.1.5 Période probatoire/chevauchement

A chaque changement de lot d'échantillons de contrôle, le laboratoire veille à anticiper l'établissement des valeurs cibles et des seuils d'interprétation. Ceux-ci sont déterminés selon des essais probatoires définis par le laboratoire en fonction de la spécificité de l'examen et de la durée de validité du lot. Pendant cette période, la conformité de la technique est assurée par le lot de contrôle en cours. Le nouveau lot est analysé comme un échantillon de patient. La moyenne des résultats obtenus permet de déterminer la valeur cible initiale, les seuils d'interprétations des nouvelles cartes de contrôle sont réajustés si nécessaire.

Le nombre de détermination préliminaire sera adapté à la période d'utilisation du lot de contrôle interne (période très courte de 1 à 2 jours pour l'hématologie par exemple avec un nombre de mesures significatif).

9.1.6 Valeurs cibles/reciblage

Chaque laboratoire détermine la valeur cible qui correspond à la moyenne des valeurs obtenues pendant la période probatoire. Cette valeur est retenue comme valeur moyenne pour l'établissement de la carte de contrôle. Au cours de l'utilisation du lot d'échantillons de contrôle la valeur cible peut être réajustée si nécessaire. **Tout « reciblage » est argumenté et précédé d'une étude sur les sources potentielles de variations (étalonnage, changement de lot de réactifs, maintenance, ...).** La valeur cible retenue prend en compte l'ensemble de ces sources normales de variations sur une période suffisamment étendue pour être significative (si possible 6 mois).

9.1.7 Choix des seuils d'alarme et seuils d'action

Les seuils d'alarmes (2s) et seuils d'action (3s) sont déterminés à partir de l'écart-type (s) établi sur une période significative (si possible 6 mois). Ces seuils d'alarmes correspondent aux performances analytiques du laboratoire en termes de fidélité. Ces valeurs sont à comparer aux limites acceptables fournies par l'HAS (HbA_{1c}, bilan lipidique, troponine), par l'état de l'art (VALTEC) ou des objectifs analytiques reconnus (RICOS, CLIA, QUALAB, RILIBAK,...). Le CV obtenu par le laboratoire est un indicateur de la fidélité intermédiaire du système et est comparée aux CV limites acceptables préétablis. Il peut être utilisé pour le suivi du bon fonctionnement du système analytique.

Pour de rares examens pour lesquels il n'existe pas de recommandations consensuelles, le laboratoire établit lui-même les limites acceptables les plus adaptées à une bonne interprétation des résultats.

9.1.8 Cas des méthodes avec seuil

Pour les méthodes assimilées au type quantitatif c'est-à-dire pour lesquelles le résultat de type qualitatif est extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable (ex : HIV, recherche de drogues, biologie moléculaire) avec interprétation par rapport à un seuil, le laboratoire privilégiera des contrôles proches du seuil. Le laboratoire complète le contrôle de

conformité de la méthode par un contrôle positif pour vérifier la maîtrise de la réponse obtenue.

En l'absence de contrôle commercialisé, le laboratoire peut établir un pool d'échantillons de patients adapté au seuil de la technique.

9.2 Exploitation

9.2.1 Règles d'interprétations

Les cartes de contrôles seront exploitées en utilisant des règles permettant d'identifier et d'anticiper des variations aléatoires ou systématiques : c'est le cas des règles de Westgard qui peuvent être utilisées en association sous forme de multi-règles.

Les rejets et alarmes sont gérés par exemple à l'aide des règles de Westgard (Westgard et al., 1981) :

Règles de rejet :

- 1_{3s} : 1 valeur éloignée de plus de 3 écart-types de la moyenne,
- 2_{2s} : 2 valeurs consécutives éloignées de plus de 2 écart-types du même côté de la moyenne,
- R_{4s} : 2 valeurs consécutives éloignées l'une de l'autre de plus de 4 écart-types.

Règles d'alarmes :

- 1_{2s} : 1 valeur éloignée de plus de 2 écart-types de la moyenne,
- 4_{1s} : 4 valeurs consécutives éloignées de plus de 1 écart-type du même côté de la moyenne,
- 10_x : 10 valeurs consécutives situées du même côté de la moyenne.

Ces règles d'alarmes sont particulièrement intéressantes dans le cas d'intervalles d'acceptation utilisant la moyenne cumulée.

En dehors de ces cas, les résultats sont considérés comme conformes.

A court terme (quotidiennement) :

La validité du CIQ permet de s'assurer de la maîtrise du processus analytique (validité de l'étalonnage et/ou validité des résultats depuis le précédent contrôle).

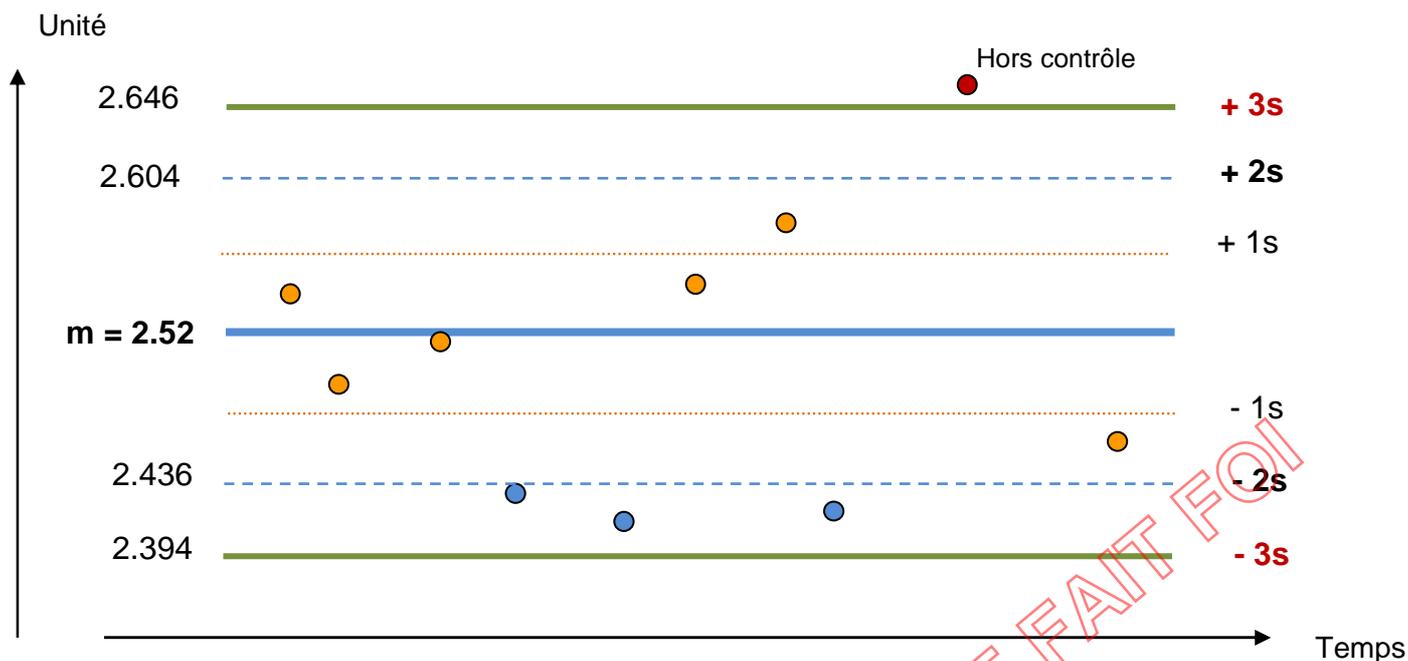
A moyen terme :

Le CIQ permet de mettre en évidence des tendances ou des phénomènes de dérive. Le laboratoire sera attentif à ces phénomènes et mettra en place des actions préventives de type maintenance ou autres évitant les situations « hors-contrôle ».

A long terme :

Le coefficient de variation est calculé périodiquement (par exemple mensuellement) et est comparé aux spécifications préalablement retenues, en tenant compte de la pertinence analytique et clinique. Les coefficients de variations annualisés (avec le même lot de CIQ) sont des indicateurs exploités lors de la revue de direction. Le CV obtenu est comparé au CV prédéfini par le laboratoire et au CV du fournisseur de réactifs. *A minima*, le CV prédéfini par le laboratoire est celui du fournisseur.

Le CV obtenu à long terme (compatible avec le CV acceptable retenu lors de la vérification/validation de méthodes) permettra d'établir les limites de cartes LEVEY-JENNINGS.



Exemple de carte de contrôles :

La carte de contrôle est établie en rapportant en abscisse la périodicité du contrôle et en ordonnée la valeur cible associée aux **seuils d'alerte** ($\pm 2s$), à calculer pendant une longue période de temps si possible 6 mois minimum et aux **seuils d'action** ($\pm 3s$).

9.2.2 Conduite à tenir

NOTE :

Le laboratoire prendra en compte tous les contrôles et n'opèrera pas de corrections des résultats des patients en fonction des valeurs des contrôles.

La conduite à tenir en cas de transgression d'une ou plusieurs règles doit être formalisée pour les cas les plus fréquemment rencontrés (par exemple à l'aide d'un logigramme).

En cas d'anomalie du résultat des CIQ le laboratoire pourra réaliser les actions suivantes :

- Analyser l'historique des résultats de contrôle,
- « Réanalyser » le CIQ,
- Reconstituer un nouvel échantillon de CIQ,
- Réétalonner,
- Changer de flacons de réactif,
- ...

Toutes les actions menées à la suite d'une anomalie sur le contrôle de qualité doivent être tracées. Si l'anomalie ne peut pas être résolue selon les dispositions documentaires préétablies (mode opératoire, procédure de gestion du CIQ, ...), la non-conformité avérée est accompagnée d'un enregistrement dans le système qualité du laboratoire (fiche de non-conformité). Dans ce cas, le laboratoire réalise une étude d'impact documentée de la non-conformité constatée sur les résultats des échantillons jusqu'au contrôle précédent déclaré conforme et met en place les actions curatives et correctives qui s'imposent. Cette étude peut conduire à la « réanalyse » d'échantillons, à des rappels de comptes rendus, voire des rappels de patients (cf. § 5.8.15 norme NF EN ISO 15189 et document SH REF 02). Dans ce

dernier cas, une information préalable de l'ARS peut être nécessaire (cf. document SH REF 02).

SH REF 02 § 4.9

Tout rappel de patients nécessite un contact préalable du biologiste-responsable avec l'agence régionale de santé, sauf cas qui serait à la fois particulièrement limité en nombre de patients et sans conséquence clinique importante pour les patients concernés. En effet, tout rappel de patients peut, en soi, être source d'une crise sanitaire locale ou perçu comme tel, crise dont la gestion incombe au directeur général de l'agence régionale de santé (L.1435-1 du CSP).

SH REF 02 § 5.6

En cas de CIQ non conforme, le LBM s'attache à évaluer l'impact sur les résultats rendus depuis le précédent CIQ conforme.

9.2.3 Cas de l'utilisation de plusieurs systèmes analytiques en "miroir"

En cas d'utilisation de 2 ou plusieurs systèmes analytiques (ex. "miroir", EBMD et automate de secours "back-up") pour la réalisation d'examens de même et ce de manière indifférente, l'exploitation du CIQ du jour est à consolider, en s'assurant de la compatibilité des résultats. Il s'agit pour le laboratoire de définir des bornes de validation commune, afin de garantir que les résultats sont non-significativement différents.

10 COMPARAISONS INTERLABORATOIRES (CIL) - méthodes de type quantitatif

L'évaluation externe de la qualité (EEQ) sur des échantillons de résultats inconnus est une obligation légale (L.6221-9 du CSP ; cf. document SH REF02 § 5.6).

Les CIQ peuvent également faire l'objet d'une comparaison avec les résultats d'autres laboratoires au sein de programmes de CIQ externalisés. La comparaison de la moyenne obtenue avec la valeur cible⁷ permet d'établir une approche de la justesse. Cette comparaison est complémentaire des EEQ.

10.1 Contrôle interne de qualité externalisé (CIQ externalisé)

Lorsque le CIQ est réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles, les résultats des différents laboratoires peuvent être confrontés entre eux par établissement des moyennes (*généralement mensuel*) et permet d'estimer la justesse (biais). Lors de son choix, le laboratoire privilégie des CIQ externalisés intégrant des fournisseurs de réactifs d'origines différentes afin d'assurer la pertinence de cette estimation.

⁷ Selon la norme NF EN ISO/CEI 17043 (ANNEXE B), Il existe diverses procédures pour déterminer les valeurs assignées (valeurs cibles) ce qui nécessitent l'utilisation de :

« a) valeurs connues, avec des résultats déterminés par une formulation spécifique de l'entité soumise à l'essai d'aptitude (par exemple fabrication ou dilution);
b) valeurs de référence certifiées, déterminées par des méthodes d'essai ou de mesure définitives (pour les essais quantitatifs);
c) valeurs de référence, déterminées par analyse, mesurage ou comparaison de l'entité soumise à l'essai d'aptitude avec un matériau de référence ou un étalon traçable à un étalon national ou international;
d) valeurs consensuelles provenant des participants experts — il convient que les experts (qui peuvent, dans certains cas, être des laboratoires de référence) aient une compétence prouvée dans la détermination du (ou des) mesurand(e)s testé(s), en utilisant des méthodes validées connues pour être hautement exactes et comparables aux méthodes généralement utilisées;
e) valeurs consensuelles provenant des participants, en utilisant des méthodes statistiques décrites dans l'ISO 13528 et dans le protocole harmonisé international de l'UICPA, et en tenant compte des effets des observations aberrantes. »

10.1.1 Choix d'un programme de CIQ externalisé

Le fournisseur de CIL est un fournisseur critique. Il doit répondre à un cahier des charges du laboratoire établi à partir des exigences de la norme NF EN ISO 15189 et des textes réglementaires (document SH REF 02 et textes en vigueur). Le laboratoire s'assure auprès du fournisseur :

- du type de programme,
- des niveaux de contrôle,
- du choix du nombre de participants et de l'effectif des groupes de comparaisons,
- des types d'échantillons,
- du mode de traitement statistique des données,
- des fréquences d'intercomparaisons,
- du mode de calcul des limites acceptables et des limites de rejet,
- ...

Le laboratoire choisira le groupe de comparaison (pairs ou toutes méthodes) en fonction du paramètre ou de la méthode (ex : immunoanalyse), de l'effectif des groupes de comparaison et de l'interprétation du résultat. Lorsqu'il existe des recommandations nationales ou internationales (HAS ou OMS), le résultat est interprété indépendamment des méthodes de dosages (ex : HbA1c, cholestérol, glucose, ...); le laboratoire comparera ses résultats aux résultats globaux (moyenne générale par exemple pour la justesse).

10.1.2 Interprétation

1- Ratio de Coefficient de Variation (RCV) :

En complément de l'évaluation de son propre CV à long terme, le laboratoire pourra évaluer le RCV en calculant le rapport du CV du laboratoire avec le CV du groupe de comparaison sous forme de Ratio de Coefficient de Variation (RCV ; parfois appelé CVI pour "Coefficient of Variation Index" en Hématologie) :

$$RCV = \frac{CV_{labo}}{CV_{groupe\ de\ comparaison}}$$

Remarque : ce ratio peut s'avérer être un indicateur insuffisant lorsque le CV du groupe de comparaison est inadapté (trop élevé ou trop faible). Il est alors possible de remplacer le CV du groupe de comparaison par le CV limite acceptable (CV acceptable) prédéfini par le laboratoire à partir de la bibliographie, sous la forme d'un ratio de limite acceptable (RLA),

$$RLA = \frac{CV_{labo}}{CV_{acceptable}}$$

Une valeur proche de 1,0 traduira une performance équivalente au groupe de comparaison, une valeur inférieure à 1,0 une performance meilleure, et une valeur supérieure à 1,0, une performance dégradée.

Un RCV ou RLA supérieur à 1 devra faire l'objet d'une analyse appropriée.

- 2- La justesse (biais) peut être exprimée par le calcul du SDI pour « Standard Deviation Index » ou IET pour « Indice d'Ecart-Type ». Cette expression en nombre d'écart-type indique l'écart entre la moyenne des résultats du laboratoire (m_{labo}) et la moyenne du groupe de comparaison (m_{groupe}) :

$$IET = \frac{(m_{labo} - m_{groupe})}{ET_{groupe}}$$

L'évaluation du biais est d'autant plus pertinente que le nombre de participants entrant dans le calcul de la valeur cible est statistiquement significatif ($n > 30$).

Une valeur proche de zéro traduira une absence de biais par rapport au groupe; plus la valeur absolue de cet indicateur sera élevée plus elle traduira un biais important.

10.2 Evaluation externe de la qualité (EEQ)

Pour l'évaluation externe de la qualité, la participation au Contrôle National de Qualité (CNQ) est obligatoire. La participation à d'autres essais interlaboratoires organisés par des associations de contrôle de qualité ou par des industriels complète l'évaluation par le CNQ. Les résultats obtenus ainsi que les commentaires, les écarts et les éventuelles mesures correctives sont systématiquement "tracés". Conformément au document SH REF 02, le laboratoire établira un planning de participation qui tient compte de la disponibilité et de la pertinence des programmes adaptés. Une fréquence au moins trimestrielle est raisonnable. Dans tous les cas, cette fréquence fera l'objet d'une politique définie par le laboratoire sous réserve des obligations réglementaires.

SH REF 02 ; § 5.6 :

Si le LBM dispose de plusieurs systèmes analytiques pour un même examen, il participe aux EEQ pour chacun d'entre eux.

NB : Dans le cas de la vitesse de sédimentation par exemple, le laboratoire s'assurera de la qualité de la matrice et de sa stabilité avant de retenir le fournisseur. En l'absence d'échantillon de contrôle satisfaisant, le laboratoire peut s'appuyer sur une méthode de référence (WESTERGREEN).

10.2.1 Choix d'un programme d'EEQ

Le laboratoire se reportera au § 10.1.1 du présent document.

10.2.2 Interprétation

L'exactitude peut être exprimée par le calcul du "z-score". Cette expression en nombre d'écart-type indique l'écart entre le résultat du laboratoire et la moyenne du groupe de comparaison :

Le score z représente la mesure normalisée du biais du laboratoire, calculée à partir de la valeur assignée et de l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude (cf. NF ISO 13528).

$$Z - Score = \frac{(X_{labo} - m_{groupe\ de\ comparaison})}{ET_{groupe\ de\ comparaison}}$$

Pour les scores z :

- $|z| \leq 2,0$ indique des performances « satisfaisantes » et ne génère aucun signal.
- $2,0 < |z| < 3,0$ indique des performances « discutables » et génère un signal.
- $|z| \geq 3,0$ indique des performances « insatisfaisantes » et génère un signal d'action.

L'évaluation de l'exactitude est d'autant plus pertinente que le nombre de participants entrant dans le calcul de la valeur cible est statistiquement significatif ($n > 30$ si possible).

Plus la valeur absolue de cet indicateur sera élevée plus elle traduira une inexactitude importante.

Le positionnement obtenu dans le cadre de ces opérations doit être "revu" par le personnel technique et biologique du laboratoire. Ces revues doivent permettre de décider des mesures correctives si nécessaire ou des commentaires (analyses documentaires) à apporter en cas d'anomalie. Il ne faut pas hésiter si besoin à demander d'éventuelles explications complémentaires à l'organisateur d'EEQ ainsi que des échantillons de contrôle supplémentaires pour d'éventuelles vérifications. Toute anomalie nécessite une gestion d'actions curatives et/ou correctives tracées sur une fiche de non-conformité.

Les anomalies qui sont de nature à entraîner un risque majeur pour la santé des patients font l'objet d'un signalement à L'ARS par les organisateurs d'EEQ (cf. article L-6221-9 du CSP) en fonction de la réglementation en vigueur.

L'exploitation des EEQ peut contribuer à l'estimation de l'incertitude de mesure (cf. document SH GTA 14).

Par ailleurs en cas d'utilisation de plusieurs systèmes analytiques (et/ou sur plusieurs sites), il appartient au laboratoire de participer aux comparaisons interlaboratoires pour chacun d'eux. Le laboratoire analysera le même échantillon sur chaque système et comparera les résultats obtenus.

10.3 Autres comparaisons interlaboratoires

Pour les examens pour lesquels il n'existe pas d'EEQ organisée et pertinente, le laboratoire met en place un autre moyen d'évaluation de la justesse et/ou de l'exactitude :

- Par une comparaison avec d'autres laboratoires avec un échange d'échantillons,
- Par analyse d'un matériau de référence de pureté connue (cf. § 5.6 du document SH REF 02).
- Par la comparaison avec une méthode de référence.

Dans ces conditions le laboratoire formalise les limites acceptables en tenant compte des exigences analytiques et clinico-biologiques.

SH REF 02 ; § 5.6 :

Si le LBM dispose de plusieurs systèmes analytiques pour un même examen, il apporte par ses programmes de contrôle de qualité internes (CIQ) et leurs exploitations journalières (ou à fréquence définie par le LBM), la preuve que les résultats fournis par ces différents instruments ou méthodes sont compatibles, le cas échéant à plusieurs niveaux. Le biologiste médical peut également évaluer la fidélité de ses méthodes de cette manière.

11 **MAITRISE DE LA QUALITE DES EXAMENS - méthodes de type qualitatif**

Pour les examens qualitatifs, la maîtrise des résultats et du processus analytique pourra être plus complexe que pour les examens de type quantitatif et nécessitera la mise en œuvre de moyens divers, autres que les CIQ et les EEQ. Les sources de variations sont nombreuses

et les différentes étapes du processus seront à maîtriser (document SH GTA 01 - § 6.14, 6.15 & 6.16).

La criticité est variable en fonction de chaque méthode ; il incombe au laboratoire de définir pour chaque méthode les conditions et la maîtrise de chacune des données d'entrée susceptible d'affecter les résultats.

11.1 Maîtrise de la qualification/habilitation et maintien continu des compétences du personnel

La maîtrise de la qualité passe obligatoirement par une habilitation du personnel. Celle-ci sera basée sur des confrontations individuelles et en aveugle intra et interlaboratoires complétées par des essais d'aptitude. Cette compétence doit être réévaluée périodiquement selon un planning défini par chaque laboratoire en fonction de la criticité de l'analyse.

Exemples :

- Evaluation et harmonisation des pratiques de lecture : lecture de lame (Hématocytologie); lecture des examens directs (Microbiologie), Cytogénétique, - identifications par rapport à des banques d'images de (Parasitologie, Hématocytologie)⁸,
- Formation continue en interne ou e-learning,
- Congrès, séminaires.

11.2 Maîtrise des conditions environnementales

Cet aspect est encore plus critique pour les techniques qualitatives que pour les techniques quantitatives. L'évaluation de la maîtrise des conditions environnementales porte sur les conditions ambiantes (température, hygrométrie, poussières, ...). Le laboratoire respectera la logique des circuits de flux (échantillons, boîtes, personnels, ...), les conditions de climatisation, de stérilité des paillasse ainsi que la législation en vigueur.

Exemple :

- Laboratoire de Biologie Moléculaire : surveillance de température suivie en début et fin de manipulation dans les pièces, différence de pression entre les pièces, preuve de non contamination (wipe tests)...

11.3 Maîtrise continue des équipements

Le laboratoire s'assure de la maîtrise de ses équipements :

- Système Analytique/Analyseur : données métrologiques, maintenance, ...
- Equipements de type intermédiaire : appareils qui interviennent dans le processus analytique mais qui n'interviennent pas dans la mesure (ex : appareil de coloration, centrifugeuse, étuve, PSM, ...)
- Logiciels
- Equipements de mesure : thermomètres, pipettes, balances, ...

⁸ Les banques d'images peuvent être par exemple des tables ou des planches internet.

11.4 Maîtrise de l'échantillon primaire

Le laboratoire s'assure de la maîtrise de la préparation de l'échantillon:

- qualité de l'étalement en hématocytologie, cytogénétique,
- méthode d'ensemencement en microbiologie,
- charge de l'inoculum en microbiologie,
- stabilité de l'échantillon,
-

11.5 Maîtrise de la méthode et des réactifs

11.5.1 Témoin positif/négatif

La vérification de la réaction passe par l'utilisation de témoins réactifs positif et négatif validant l'étape du processus concerné. Si le processus analytique contient plusieurs étapes, dans la mesure du possible, chacune d'entre elles fera l'objet d'une vérification par un témoin réactionnel adapté.

Exemples : agglutination en Immunohématologie (groupe ABO Rh), en Coagulation (PDF, D-Dimères), en Bactériologie (sérotypage), en Parasitologie et Mycologie (techniques d'agglutination), en biologie moléculaire suivi des contrôles tout le long du processus (extraction comprise).

Si Il existe des témoins réactifs, ils sont mis en œuvre pour valider une réaction positive et/ou négative (ex : témoin réactif et non réactif dans le cadre de phénotypage ou de la lecture d'une lame témoin BK). Les témoins positif et négatif peuvent être complétés à intervalle régulier par l'utilisation d'un contrôle indépendant⁹ de la trousse.

En l'absence de témoin réactif, le laboratoire mettra en place un contrôle préparé en interne avec un pool d'échantillons dont la stabilité et l'homogénéité sont vérifiées (ex : bandelette urinaire, test en immunofluorescence).

Les témoins appropriés sont systématiquement réalisés en parallèle du traitement de l'échantillon.

11.5.2 Réactifs

Le laboratoire teste les réactifs à chaque nouveau lot et/ou chaque livraison d'un même lot (critique pour immunohématologie, sérologie virale, en biologie moléculaire, ...), afin de vérifier qu'ils sont conformes aux spécifications définies par le laboratoire.

En Microbiologie, si le laboratoire prépare ses milieux de culture, il lui appartient d'élaborer un plan qualité pour vérifier leur stérilité et leur fertilité, pour chaque préparation (cf. § 5.3.2 de la norme NF EN ISO 15189). Pour les milieux commercialisés, le **certificat de libération de lot du fournisseur est suffisant dans le cas où les conditions de transport et de stockage sont respectées jusqu'à l'utilisateur final.**

Les milieux de culture fabriqués *in situ* ont une traçabilité de fabrication (date de mise en service, date de péremption, test de fertilité et stérilité).

- Les souches de référence proviennent de différentes collections ou centre de ressources biologiques (Institut Pasteur, ATCC..). Elles sont recommandées par des sociétés savantes et une harmonisation Européenne concernant les valeurs critiques (CMI) est en cours dans le cadre de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Il est possible d'utiliser une banque constituée au sein du laboratoire à partir de souches identifiées avec certitude.

⁹ Matériau de contrôle interne de qualité mis au point et fabriqué indépendamment de toute trousse spécifique d'un dispositif médical de diagnostic *in vitro* et fourni isolément.

- Sensibilité des agents microbiens aux antibiotiques ou antifongiques (antibiogrammes, antifongigrammes et CMI) :
Le plus utile réside en fait dans le choix judicieux de souches de référence ou de souches provenant d'isolats cliniques permettant de déceler sans faille les différents mécanismes de résistance des agents microbiens.

Note : Les recommandations de l'ANSM en matière de réactifs de laboratoires doivent être respectées.

11.6 Contrôle interne de qualité (CIQ)

Lorsqu'il existe des échantillons de contrôle interne de qualité, ils sont utilisés pour vérifier la maîtrise du processus et éventuellement les tendances (ex : souche de références en bactériologie et mycologie, antibiogramme, antifongigramme ...).

Les indicateurs de performances d'une méthode et les limites d'acceptabilité associées sont choisis **préalablement** (lorsqu'ils existent) à la mise en place du contrôle de qualité. Le laboratoire pourra s'appuyer sur d'autres indicateurs de performances tels que les rejets de lecture des analyseurs pour diverses causes (Immuno-hématologie), % d'acceptabilité si plusieurs contrôles pour un même type de sonde (en biologie moléculaire). Des cartes de contrôle peuvent être établies pour suivre et anticiper les dérives trop importantes et mettre en évidence les tendances.

11.7 Evaluations Externe de la Qualité (EEQ)

Celles-ci sont moins fréquentes que pour les examens à résultats quantitatifs, mais il est possible d'en trouver en France ainsi que dans des réseaux ou structures européennes et/ou internationales afin de participer à de telles comparaisons de résultats.

La formation du personnel réalisée au travers d'évaluation et d'harmonisation des pratiques de lecture (ex : hématocytologie, parasitologie, bactériologie) peuvent être considéré comme une évaluation externe de la qualité pour la réalisation « manuelle » des examens de lecture, mais en aucun cas cette pratique constitue un EEQ pour l'analyseur automatique correspondant.

- Exemple : en Hématologie, la réalisation des formules leucocytaires nécessitent à la fois une évaluation externe de la qualité pour l'ensemble des paramètres de l'analyseur (échantillon de sang) et d'autre part une EEQ pour la réalisation des formules leucocytaires en méthode manuelle (lame, banque image, ...).

A défaut d'EEQ, les échanges de gré à gré sont nécessaires. Le rythme d'une confrontation trimestrielle semble approprié (cf. § 5.6 SH REF 02).

11.8 Exemples de maîtrise de la qualité des examens - méthodes de type qualitatif

Type de technique	Familles	Exemples d'examen	Maîtrise					
			Habilitation/ Maintien des compétences (Fréquence ¹⁰)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Points critiques Moyens de maîtrise	CIQ	EEQ
Cytologie manuelle Examen direct	BIOCHBM	Cristaux urinaires	OUI (cf. § 11.1)/+++					OUI
	BACTH	ECBU	OUI/+++			Confrontation interne ¹¹		Échange interlaboratoire
	PARASITOMYCO	Trichomonas	OUI/+++			Confrontation interne, maîtrise préanalytique +++		
Cytologie automatisée Examen direct	BACTH	ECBU	OUI/+	OUI	OUI	Confrontation interne, maîtrise préanalytique +++		Échange interlaboratoire
Cytologie manuelle Après coloration, marquage	HEMATOBM	Frottis sanguin (identification cellulaire)	OUI/+++			Confrontation interne, Etalement & coloration		OUI
	BACTH	GRAM	OUI/+++			coloration	OUI (souche(s) test positif)	
	BACTH	ZIEHL	OUI/+++		OUI (lame positive fixée)	coloration		
	PARASITOMYCO	Recherche de plasmodium	OUI/+++			Etalement & coloration ; Confrontation interne ; maîtrise préanalytique +++		OUI
	PARASITOMYCO	Pneumocystis en IF directe	OUI/+++		OUI (lame positive fixée)			Echange interlaboratoire

¹⁰ **Fréquence** : L'habilitation est une notion de base mais dans certains cas, l'absence d'autres moyens de contrôle rend cette exigence particulièrement importante. Le nombre de croix correspond à l'importance de cette habilitation.

¹¹ **Confrontation interne** : Dans le cas où le laboratoire réalise l'examen en manuel et à l'aide d'un analyseur les résultats obtenus sur les mêmes échantillons sont comparés sur la base de critères d'acceptabilité. Dans le cas où le laboratoire n'utilise qu'une technique manuelle, il pourra être procédé à une confrontation entre opérateurs (double lecture).

Type de technique	Familles	Exemples d'examen	Maîtrise					
			Habilitation/ Maintien des compétences (Fréquence ¹⁰)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Points critiques Moyens de maîtrise	CIQ	EEQ
Cytologie automatisée Après coloration, marquage	HEMATOBM	Identification cellulaire	OUI/+			Confrontation interne	OUI	OUI
Tests rapides sur supports solides A lecture subjective	BIOCHBM	Bandelette urinaire	OUI/+++			Confrontation interne	CIQ de la méthode quantitative	EEQ de la méthode quantitative
Tests rapides sur supports solides A lecture automatisée	BIOCHBM	Bandelette urinaire	OUI/+			Confrontation interne	CIQ de la méthode quantitative	EEQ de la méthode quantitative
Tests rapides sur supports solides (screening) A lecture subjective	BIOCHBM, PARASITOMYCO, TOXICOBM, IMMUNOSEROBM	Test immuno chromatographique (toxique urinaire, procalcitonine)	OUI/+++			Confrontation interne	CIQ de la méthode quantitative (si possible)	OUI
Immuno-électrophorèse	IMMUNOSEROBM, PARASITOMYCO, BIOCHBM	Identification de protéines	OUI/+++			Rigueur de l'identification des échantillons lors du dépôt si technique manuelle	Pool préparé en interne	OUI
Blot	IMMUNOSEROBM, PARASITOMYCO, BIOCHBM	Identification de protéines	OUI/+++	OUI	OUI	Rigueur de l'identification des échantillons lors du dépôt		OUI
Test d'agglutination	IMMUNOHEMATOBM	Groupes sanguins & RAI	OUI/++++			maîtrise préanalytique +++ , si technique manuelle (2 techniques, réglementaires)	OUI (réglementaire)	OUI
	COAGBM, IMMUNOSEROBM, AUTOIMMUNOBM	PDF, antigènes, anticorps, toxines	OUI/+++	OUI	OUI	Rigueur de l'identification des échantillons lors du dépôt si technique manuelle	Pool préparé en interne	OUI si existe

Type de technique	Familles	Exemples d'examen	Maîtrise					
			Habilitation/ Maintien des compétences (Fréquence ¹⁰)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Points critiques Moyens de maîtrise	CIQ	EEQ
Biologie moléculaire	PARASITOMYCO, VIROH, BACTH, HEMATOBM	Identification de microorganismes	OUI/+++	OUI	OUI	Rigueur dans la préparation des échantillons et des mélanges réactionnels (traçabilité à bien définir)	OUI	OUI
Culture	BACTH, PARASITOMYCO, VIROH	Identification de microorganismes	OUI/+++				OUI (souche de référence) ¹²	OUI
Antibiogramme/ fongigramme Méthode manuelle	BACTH, PARASITOMYCO	Sensibilité aux antibiotiques	OUI/+++				OUI (souche de référence)	OUI
Antibiogramme/ fongigramme	BACTH, PARASITOMYCO	Sensibilité aux antibiotiques	OUI/+++				OUI (souche de référence)	OUI

¹² Cf.REMIC
SH GTA 06 – rév. 00

11.9 Exemple de stratégie de mise en place du contrôle interne de qualité dans un laboratoire de bactériologie

La mise en place de contrôle de qualité interne au sein d'un laboratoire de bactériologie est de la responsabilité du biologiste médical. Sa démarche doit être adaptée à la spécificité de son activité (polyvalent, spécialisé) et à l'objectif clinique recherché.

A la différence d'autres domaines de la biologie médicale où le processus analytique permet une quantification d'analyte dans des matrices assez stables (dont la seule variation majeure est le rythme nyctéméral), en bactériologie le laboratoire est confronté à des organismes vivants qui subissent des modifications génotypique et phénotypique.

Le résultat d'une analyse bactériologique est souvent la conclusion de l'expertise de plusieurs étapes analytiques (quantitatives ou qualitatives) utilisant de nombreux réactifs.

Cette particularité fait que les CIQ en bactériologie doivent assurer la validation en continu du processus analytique et doivent être adaptés aux objectifs cliniques de chaque laboratoire.

Le biologiste médical définira une stratégie qui tient compte de l'évaluation des risques et de la criticité des différentes étapes du processus analytique.

Les recommandations des fournisseurs de réactifs ou d'automates feront l'objet d'une analyse critique pour pouvoir les adapter et les intégrer aux besoins spécifiques du laboratoire.

Le passage d'un grand nombre de CIQ inadaptés au processus analytique augmente la charge de travail au détriment des objectifs cliniques que le laboratoire s'est fixé.

Le biologiste médical détermine les facteurs de risques pouvant influencer sur la qualité analytique à chaque étape et pour chaque réactif. Il mettra en œuvre des CIQ pertinents avec des périodicités permettant de les maîtriser.

La stratégie à mettre en place nécessite *a minima* la réalisation des points suivants :

- 1- recenser l'ensemble des réactifs utilisés au laboratoire (milieux de culture, disque d'antibiogramme, ...),
- 2- recenser l'ensemble des processus analytiques utilisant des techniques manuelles ou automatisées,
- 3- réaliser une étude de criticité pour chaque réactif et chaque processus analytique ce qui permettra de mettre en évidence les points sensibles à maîtriser. Cette étude de criticité est combinée à l'analyse de cause via la méthode des 5 M (Milieu, Main d'œuvre, Matière, Méthode, Matériel).

Matériaux de références

La mise en place de contrôles internes en bactériologie en utilisant des matériaux de référence (MR) doit tenir compte des préconisations des sociétés savantes (CA SFM, EUCAST, ...), et doit, donc, être réactualisée.

Ces MR sont des souches dont le phénotype et le profil de résistance sont connus :

- ATCC (American Type Culture Collection)
- CIP (Collection de l'Institut Pasteur)
- Ou autre souche dont le phénotype est connu (« souchothèque »).

Préconisations fournisseurs

- 1- Vérification auprès de chaque fournisseur de la présence des fiches qualité de chaque réactif utilisé (milieux de culture solide ou liquide, disque d'antibiogramme, carte d'identification, carte d'antibiogramme, flacon d'hémoculture, ...).
Si les milieux sont réalisés au laboratoire, mettre en place un plan qualité répondant aux caractéristiques de chaque réactif.
- 2- Vérification auprès de chaque fournisseur de la stabilité de chaque réactif pendant le transport et pendant la période de conservation en dehors du laboratoire (fiche de stress).

Si ces préconisations fournisseurs ne sont pas respectées, le laboratoire devra apporter la preuve de la conformité de ces réactifs en mettant en place un plan qualité adapté.

Evaluation de la criticité des réactifs et des processus en bactériologie

Le laboratoire peut mettre en place une évaluation de la criticité basée sur 3 items, chacun coté de 1 à 3 :

- la fréquence (F) d'apparition des anomalies constatées par le laboratoire peut être cotée de la façon suivante :
 - 1 pour une fréquence de 0 à 1 fois par an,
 - 2 pour une fréquence de 2 à 3 fois par an,
 - 3 pour une fréquence supérieure à 3 fois par an.
- la gravité (G) de l'anomalie sur le processus analytique et ses incidences sur le diagnostic, le traitement ou l'épidémiologie :
 - 1 pour aucune incidence,
 - 2 pour une incidence probable,
 - 3 pour une incidence certaine.
- la détectabilité (D) de l'anomalie au cours du processus analytique incluant la phase pré et post analytique :
 - 1 pour anomalie détectable au cours du processus analytique,
 - 2 pour anomalie dont la détection peut être possible au cours du processus analytique,
 - 3 pour une anomalie non détectable au cours du processus analytique.

Un exemple de niveau de détectabilité : coté 1

Lors d'un ECBU, la défaillance de pousse sur un milieu de culture avec un examen cytologique montrant la présence de signes indirects d'infection (taux de leucocytes élevé, présence de nombreuses bactéries) peut faire évoquer les points suivants :

- milieu de culture non adapté au germe,
- milieu de culture défaillant (problème de fertilité),
- conditions de culture non respectées,
- erreur d'ensemencement.

Dans ce cas un nouvel ensemencement devra se faire avec un nouveau milieu de culture, si possible de lot différent ou un milieu différent adapté en vérifiant l'identification de l'échantillon d'urine ensemencé et en respectant les conditions de culture.

La cotation de chaque item va permettre d'établir un indice de criticité (IC) résultant de la multiplication des 3 items :

$$IC = F \times G \times D$$

A chaque laboratoire d'établir en fonction de sa spécificité biologique et clinique le seuil à partir duquel une action ou un CIQ doit être mis en place.

Un exemple de stratégie de mise en place de CIQ est présenté dans ce document, il est composé de 3 parties :

- 1- Une évaluation de criticité sur des réactifs de bactériologie **limitée** à des milieux de cultures, des disques ATB, des réactifs automatés (cf. § 11.9.1)
Dans cette analyse, un indice de criticité supérieur à 6 **nécessite** la mise en place d'un CIQ.
- 2- Sur la base de cette évaluation de criticité : la mise en place des contrôles de qualité (cf. § 11.9.2).
- 3- Deux exemples de processus analytiques ECBU et hémocultures (cf. § 11.9.3 et 11.9.4).
Ces deux processus sont décrits en technique manuelle et automatique.

11.9.1 Evaluation de la criticité des réactifs en bactériologie (Tableau 1)

Indice de Criticité I.C = FxGxD Lorsque I.C > 6 = mise en place d'un CIQ

Fréquence de l'anomalie F : 1 = 0 à 1 fois / an; 2 = 2 à 3 fois / an; 3 = > 3 fois / an

Evaluation de la gravité G : 1 = sans incidence sur le diagnostic; 2 = incidence probable sur le diagnostic et le traitement; 3 = incidence certaine sur le diagnostic, le traitement et l'épidémiologie

Délectabilité au cours du processus analytique D : 1 = anomalie détectable; 2 = détection possible; 3 = anomalie non détectable

Anomalies possibles	Fréq	Gravité	Détection	I.C	Remarque / CAT	Action à entreprendre
Milieux de culture						
Absence de plan qualité à la production	1	3	1	3	Fiches qualité obligatoires (avec le détail du plan qualité)	Documents fournisseurs
Non respect des délais et/ou conditions de transport	1	3	1	3	A vérifier à réception par rapport aux fiches de stress produit	Documents fournisseurs
Non respect de la conservation à la réception	1	3	1	3	A vérifier à réception par rapport aux fiches de stress produit	Documents fournisseurs
Non respect de la conservation au laboratoire	1	3	1	3	Maîtrise métrologique obligatoire (évaluation incident)	Destruction des produits
Anomalie sur un lot (réactovigilance)	1	3	3	9	Enquête rétrospective (évaluation incident)	Mise en place CIQ adapté
Disques ATB						
Absence de plan qualité à la production	1	3	1	3	Fiches qualité obligatoires (avec le détail du plan qualité)	Documents fournisseurs
Non respect des délais et/ou conditions de transport	1	3	1	3	A vérifier à réception par rapport aux fiches de stress produit.	Documents fournisseurs
Non respect de la conservation à la réception	1	3	1	3	A vérifier à réception par rapport aux fiches de stress produit	Documents fournisseurs
Non respect de la conservation au laboratoire	1	3	1	3	Maîtrise métrologique obligatoire (évaluation incident)	Destruction des produits
Anomalie sur un lot (réactovigilance)	1	3	3	9	Enquête rétrospective (évaluation incident)	Mise en place CIQ adapté
Sensibilité des pneumocoques	3	3	2	18	Contrôle des disques en manuel	cf. TABLEAU 2
Discordance résultat automate / manuel sur BLSE	3	3	2	18	Contrôle en manuel "bouchon de champagne"	cf. TABLEAU 2
Discordance résultat automate / manuel sur BMR	3	3	2	18	Contrôle des disques en manuel	cf. TABLEAU 2
Réactifs d'automate (Vitek)						
Absence de plan qualité à la production	1	3	1	3	Fiches qualité obligatoires (avec le détail du plan qualité)	Documents fournisseurs
Non respect des délais et/ou conditions de transport	1	3	1	3	A vérifier à réception (fiche de stress produit)	Documents fournisseurs
Non respect de la conservation à la réception	1	3	1	3	A vérifier à réception (fiche de stress produit)	Documents fournisseurs
Non respect de la conservation au laboratoire	1	3	1	3	Maîtrise métrologique obligatoire (évaluation incident)	Destruction des produits
Anomalie sur un lot (réactovigilance)	1	3	3	9	Enquête rétrospective (évaluation incident)	Mise en place CIQ adapté
Anomalie du couple automate / réactif	1	3	3	9	Contrôle du couple automate / réactif (rythme adapté)	cf. TABLEAU 2
Processus analytique : techniques manuelles						
Lecture manuelle disque ATB / E-test	3	3	3	27	Double lecture (2 personnes)	cf. TABLEAU 2
Saisie manuelle des résultats	3	3	3	27	Vérification de saisie obligatoire	cf. Procédure gestion CQ
Coloration Gram automate	2	3	2	12	CQI Lors du changement de réactifs et/ou par jour (selon automate)	cf. TABLEAU 2
Coloration Gram manuelle	1	3	3	9	Risque à la décoloration / CQI à chaque coloration	cf. TABLEAU 2
Coloration Ziehl manuelle (faux négatif)	1	3	3	9	CQI à chaque coloration	cf. TABLEAU 2
Coloration MGG manuelle	1	2	1	2	Reconnaissance morphologique des cellules	
Suspension bactérienne (Mc Farland)	1	3	3	9	Maîtrise métrologique	cf. MO de l'automate
Cytologie automate (urines)	2	3	2	12	Corrélation avec microscopie optique	cf. MO de l'automate

11.9.2 Contrôle Interne de Qualité en Bactériologie

11.9.2.1 Contrôle de qualité sur les techniques automatisées

Automates concernés : automate 1, automate 2,

Contrôle : couple automate / réactif

Risque : changement de lot, défaillance métrologique de l'automate, péremption après conservation du lot de réactif

- Organisation des CIQ sur automates ATB et ID (TABLEAU 2)

Fréquence : chaque souche est passée 1 fois/mois soit 1 passage de 2 CIQ/semaine et/ou à chaque changement de lot de galerie

		AUTOMATE 1		AUTOMATE 2	
Souche utilisée		ATB	Identification	ATB	Identification
Recommandations CASFM	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	ATB PSE	ID32 GN	NR	ID GNB
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	ATB UR	ID32 E	AST-N123	ID GNB
		ATB G-		AST-XN8	
		AST-N128 (Urines)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATB STAPH	Manuel	AST-P581	Manuel
	<i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672 (contrôle de la résistance naturelle)	ATB UR	ID32 E	AST-N123	ID GNB
ATB G-		AST-XN8			
			AST-N128 (Urines)		
Autres souches	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	NR	NR	AST-P576	ID GPC
	<i>S. aureus</i> Méti R ATCC 43300	NR	Manuel	AST-P581	Manuel
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	NR	API20 STREPT	AST-P606	ID GPC
	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	ATB ANA	API20 A	NR	NR

NR : non réalisé

➤ Organisation des CIQ sur autres automates de bactériologie (TABLEAU 3)

<i>Automate</i>	<i>CIQ utilisé</i>	<i>Règle de passage / objectif</i>
<i>Automate de cytologie urinaire</i>	<i>Contrôle fournisseur</i>	<i>Passage de 2 niveaux chaque jour</i>
	<i>Microscope</i>	<i>Comparaison journalière entre les culots urinaires et les résultats de l'UF1000 (cf. mode opératoire de l'automate)</i>
<i>Automate d'hémoculture</i>	<i>Passage 1 fois/mois d'une souche ATCC après calibration (4 niveaux) ; Dilution à 15.000 bactéries / mL Bacille gram -, cocci gram +, anaérobie, levure, campylobacter</i>	<i>Test de fertilité : test des alarmes et du délai de détection (cf. fiche de suivi des CIQ de l'automate)</i>
<i>Colorateur de lame</i>	<i>Souches ATCC : 1 bacille gram – 1 cocci gram +</i>	<i>2 fois par semaine (à chaque changement de bain)</i>

LA VERSION ELECTRONIQUE EST PROTEGEE

11.9.2.1 Organisation des CIQ en techniques manuelles

TABLEAU 4 :

Risque : péremption après ouverture, conservation

Fréquence : 1 fois par mois et/ou à chaque changement de lot de réactif

Souches utilisées	ATB Disque Céfinase	ATB Disque Fox ²	Staphy Slide Fumouze	ATB Disque BLSE	Oxydase	E Test	ATB Disque Norfo
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	✓	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	✓	✓	✓	NR	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i> Méti R ATCC 43300	✓	✓	✓	NR	NR	NR	NR
<i>E. coli</i> souche locale Résistante aux β lactamines (BLSE)	NR	NR	NR	✓ ¹	NR	NR	NR
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	NR	NR	NR	NR	NR	✓ ³	✓ ⁴
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	NR	NR	NR	NR	✓	NR	NR

¹ Utilisation de 5 disques d'ATB (β -lactamines) : Amoxicilline + Acide Clavulanique, Ceftazidime, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxime → Aspect « Bouchon de champagne » ; ² Fox : Cefoxitine (S \geq 27 mm ; R < 27 mm) ; ³ CMI Pénicilline, Amoxicilline, Cefotaxime, Ceftriaxone ; ⁴ \varnothing < 10 mm = PSDF.

TABLEAU 5 :

Technique	CIQ utilisé	Règle de passage / objectif	Risque
Milieux de culture solides et liquides (liste cf. Stratégie de maîtrise de la qualité milieux de bactériologie)	Plan qualité du fournisseur		
	Contrôle par échantillonnage (souches ATCC, CNQ, EEQ)	Repiquage des souches ATCC ou lors de la mise en œuvre des CNQ/EEQ (fonction du type de prélèvement)	Maitrise des délais fournisseur, péremption, conservation
Lames	1 témoin positif	A chaque coloration de BK	Technicien dépendant
	Lame avec Bacille gram -	A chaque Gram en manuel	Technicien dépendant

11.9.3 Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

L'ECBU nécessite la maîtrise des étapes suivantes :

1. Pré-analytique :
 - flacons adaptés,
 - conditions de prélèvement,
 - températures de conservation adaptées,
 - délais avant analyse,
 - renseignements cliniques obligatoires pour contribuer à une interprétation clinique adaptée au patient.
2. Formation et habilitation du personnel avec la connaissance des protocoles de validation analytique.
3. Transport et conservation des réactifs (milieux de culture, carte d'identification, disque pour réaliser l'antibiogramme, ...) selon les préconisations du fournisseur :
 - Certificats par lot (plan qualité),
 - Essais de chocs thermiques (fiche de stress).

	Technique automatisée	Technique manuelle	
Cytologie urinaire	CIQ automate Contrôle microscopie optique (2 à 5 urines fraîches / jour) vs automate	Formation / habilitation Corrélation inter techniciens (semestrielle ou annuelle)	
Coloration de Gram	1 Bacille gram- et 1 Cocci gram+ (rythme fonction de l'automate) 1 passage / jour ou lors de changement réactif.	1 CIQ Cocci gram+ à chaque coloration Formation / habilitation	
Ensemencement			
Milieux de culture	En fonction de la criticité (cf. tableau 1)	En fonction de la criticité (cf. tableau 1)	
Qualité de l'ensemencement	Vérification à la lecture	Formation / habilitation Vérification à la lecture	
Quantification	CIQ (suspensions connues)	Ose calibrée	
Lecture			
Culture stérile	Analyse du résultat : corrélation des différentes étapes quantification (automate), ED, culture, clinique	Analyse du résultat : corrélation des différentes étapes quantification (microscope), ED, culture, clinique	
Culture positive (seuil)	Mac Farland (densitomètre)	CIQ journalier	CIQ journalier
	Identification	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Contrôle du couple automate / réactif (cf. tableau 2)	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine (cf. tableau 2)
	Antibiogramme	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Contrôle du couple automate / réactif Cf. tableau 2	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Cf. tableau 2 Double lecture : disques et E-test (risque +++)
	Expertise	BLSE, céphalosporinases, ... CIQ (souche MRC) (cf. tableau 2)	Si nécessaire (ex BLSE) CIQ (souche MRC) (cf. tableau 2)
	Saisie de résultats	Vérification connexion mensuelle	Double saisie ou vérification de saisie.
	EEQ	Echange d'urines fraîches entre laboratoires : contrôle entre automates, automate vs technicien et entre techniciens Contrôle de quantification (dans les 24H) 4 fois / an Pas de culture	Echange d'urines fraîches entre laboratoires Contrôle inter techniciens Contrôle de la quantification (dans les 24H) 4 fois / an Pas de culture
Interprétation clinique	Base : sociétés savantes (SFM, REMIC, HAS)	Base : sociétés savantes (SFM, REMIC, HAS)	

11.9.4 Hémocultures

La réalisation d'hémocultures nécessite la maîtrise des étapes suivantes :

1. Pré-analytique :
 - flacons adaptés,
 - conditions de prélèvement,
 - températures adaptées,
 - délais,
 - renseignements cliniques obligatoires pour contribuer à une interprétation clinique adaptée au patient.
2. Formation et habilitation du personnel avec la connaissance des protocoles de validation analytique.
3. Transport et conservation des réactifs selon préconisations fournisseur :
 - Certificats par lot (plan qualité),
 - Essais de chocs thermiques (fiche de stress).

	Technique automatisée	Technique manuelle
Culture	1 CIQ / semaine (fonction du nombre d'hémoculture réalisée) Souche MRC au seuil de détection Bornes d'acceptation à mettre en place	1 CIQ par échantillonnage lors EEQ / CNQ ou MRC Fertilité / stérilité Fonction de la criticité
Signal alarme	Souche MRC au seuil de détection Bornes d'acceptation à mettre en place Délais de positivité du fournisseur à vérifier Cf. extrait en exemple la fiche de suivi des CIQ de bactériologie (cf. ci-dessous)	Formation habilitation (lecture visuelle)
Coloration de gram	1 Bacille gram- et 1 Cocci gram+ (rythme fonction de l'automate) 1 passage / jour ou lors de changement réactif.	1 CIQ Cocci gram+ à chaque coloration Formation / habilitation
Ensemencement		
Milieux de culture	En fonction de la criticité Cf. tableau 1	En fonction de la criticité Cf. tableau 1
Qualité de l'ensemencement	CIQ (suspensions connues)	Formation / habilitation
Lecture		
Identification	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Contrôle du couple automate / réactif Cf. tableau 2	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Cf. tableau 2
Antibiogramme	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Contrôle du couple automate / réactif Cf. tableau 2	CIQ (souche MRC) 1 à 2 / semaine Cf. tableau 2 Double lecture : disques et E-test
Expertise	BLSE, céphalosporinases, ... CIQ (souche MRC) Cf. tableau 2	Si nécessaire (ex BLSE) CIQ (souche MRC) 1 fois / mois Cf. tableau 2
EEQ	Lyophilisat par organisation inter comparaison 4 /an	Lyophilisat par organisation inter comparaison 4 /an
Interprétation clinique	Base : sociétés savantes (SFM, REMIC), HAS	Base : sociétés savantes (SFM, REMIC), HAS

Extrait de la fiche de suivi des CIQ de bactériologie

Contrôle Interne de Qualité pour l'automate d'hémoculture :

Chaque mois, une souche ATCC (bacille -, Cocci +, anaérobie, levure et campylobacter) est testée. Une dilution de 15.000 bactéries / ml est incubée dans les flacons aérobies et anaérobies pour vérifier la détection par l'automate.

Les résultats sont comparés aux recommandations fournisseurs (fiches techniques) et aux résultats du dossier de validation.

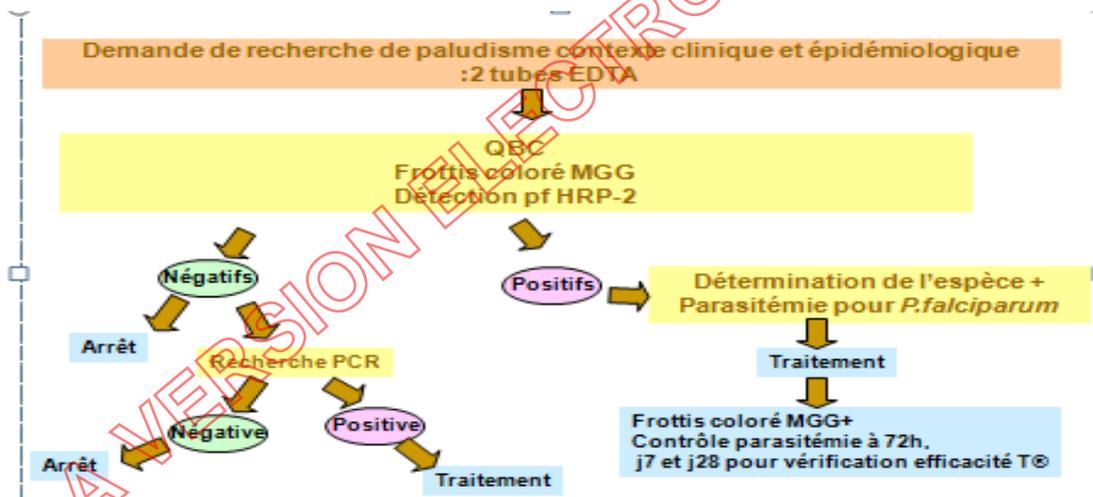
Valeurs acceptables (fournisseur) :

<i>bacille gram -</i>	10,8 à 35,2 heures
<i>cocci gram +</i>	13,3 à 35,1 heures
<i>anaérobie</i>	29,4 à 45,1 heures
<i>levure</i>	17,3 à 74,4 heures
<i>campylobacter</i>	26 à 124,8 heures

11.10 Exemple de stratégie de mise en place du contrôle de qualité en Parasitologie

Le diagnostic du paludisme fait partie des examens à réaliser en urgence. Il repose à la fois sur une identification morphologique de l'agent pathogène responsable et dans le cas du *Plasmodium falciparum* sur le calcul de la parasitémie.

Il existe plusieurs méthodes de diagnostic mais une seule stratégie de diagnostic.



Quelque soit la technique utilisée, l'habilitation initiale et continue du personnel est essentielle.

11.10.1 Contrôle interne de la qualité (CIQ)

➤ Méthodes de coloration

Frottis (coloration M.G.G.)

Goutte épaisse (coloration Giemsa)

Les contrôles internes portent sur :

- L'échantillon

- Qualité du frottis en monocouche,
- Qualité de la goutte épaisse (hématies totalement éclatées)

- Maîtrise des colorations

- Coloration correcte des frottis :

Parasites :

- cytoplasme coloré en bleu
- chromatine du noyau en rouge
- vacuole blanche

Eléments figurés du sang :

- hématies : rose saumon
- polynucléaires neutrophiles : beige
- polynucléaires éosinophiles : rouge orangé
- cytoplasme des lymphocytes : bleu ciel
- cytoplasme des monocytes : gris mauve ou violet

- Coloration correcte de la goutte épaisse :

Eviter tout dépôt de colorant en filtrant le Giemsa avant toute utilisation et en le remplaçant à chaque coloration

- Maîtrise de la lecture

- Frottis

Reconnaissance du type de Plasmodium à l'aide de :

- la présence de trophozoïtes binucléés
- le biparasitisme éventuel dans les hématies
- la forme des gamétocytes
- la forme des corps en rosace (nombre de noyaux)
- la taille des hématies parasitées

Parasitémie (*Plasmodium falciparum*) :

- Choisir 10 champs au hasard et éloignés les uns des autres.
- Compter par champ :
 - le nombre d'hématies parasitées

le nombre total d'hématies (parasitées et non parasitées) sur 1 champ

La parasitémie = Nombre d'Hématies parasitées / Nombre d'Hématies total

Le résultat de la parasitémie correspond à la moyenne obtenue sur 10 champs.

Le frottis est la technique de référence dans le cadre du diagnostic du paludisme et doit être maîtrisée par tout laboratoire.

- Goutte épaisse

Présence de Plasmodium

Pour ces techniques, des lames colorées et anonymisées servent de contrôles internes (lecture et compte rendu de l'interprétation enregistré et effectué à un rythme prédéfini).

Le pourcentage de réponse pour un contrôle interne du Paludisme (minimum 5 lames) par ces techniques est :

- 100% pour présence ou absence de *Plasmodium*
- 100% pour l'identification de *Plasmodium falciparum*
- 80% pour l'identification d'une autre espèce

➤ Méthode de concentration « QBC »

C'est une technique de concentration/coloration en tube capillaire à l'acridine orange. Cette technique impose la lecture à la fois en lumière fluorescente puis en lumière blanche.

• En fluorescence

La mise au point se fait sur la couche leuco-plaquettaire puis déplacement vers la couche érythrocytaire pour rechercher les trophozoïtes (interface érythrogranulocytaire et zone érythrocytaire). Il faut examiner le tube sur toute sa circonférence par rotation de ce dernier (environ 10 à 15 champs).

Sur un fond sombre, le noyau des trophozoïtes apparaît en vert. La couleur du cytoplasme varie du vert au rouge. Dans cette zone peuvent également être observés quelques gamétocytes.

• En lumière blanche

Eteindre la fluorescence

Dans la zone lympho-monocytaire, sont observés :

- les gamétocytes
- les schizontes
- les leucocytes mélanifères

Le pigment malarique apparaît sous forme de grains noirs fins dans les parasites et sous forme de « grains » de grande taille dans les leucocytes mélanifères.

Le pourcentage de réponse pour le contrôle interne (minimum 3 échantillons) se fait comme précédemment, il est pour cette technique de :

- 100% pour présence ou absence de *Plasmodium*.

➤ Test rapide de détection des Antigènes (savonnettes)

Les trois antigènes détectés par immunochromatographie sont :

- Pf HRP-2 (histidin rich protein-2) spécifique de *P. falciparum*
- pLDH spécifique de *P. vivax*
- pLDH commun à toutes les espèces de *Plasmodium*.

Il n'y a pas de témoin négatif ou positif, seulement un témoin de réaction qui valide le bon fonctionnement du test.

Le contrôle interne se fera sur la lecture de 3 tests en vérifiant le respect strict du temps de la lecture (20 min et pas plus).

Le pourcentage de réponse est de :

- 100% pour présence ou absence de *Plasmodium*
- 100% pour l'identification de *Plasmodium falciparum*

11.10.2 Evaluation externe de la qualité (EEQ)

➤ Techniques de coloration (EEQ sur frottis)

Il existe plusieurs types d'EEQ :

- CNQ : 1 échantillon par an
- Des organisateurs d'EEQ nationaux ou internationaux : plusieurs échantillons par an (minimum 2).

L'exploitation des EEQ est faite par des scores qui varient suivant l'organisme.

➤ Autres techniques

A ce jour, il n'y a pas d'EEQ sur sang frais. De plus, l'échantillon se dégradant en 72h, les échanges de prélèvement sont difficiles (échanges de lames possibles).

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

12 ANNEXE

DOCUMENTS COFRAC – EA – ILAC

[LAB INF 19](#) (dans l'attente de la parution du SH INF 19) Liste des organisateurs de comparaisons interlaboratoires.

[Document EA 4/18](#), "Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation".

[Document ILAC P9](#) Document ILAC P9, "ILAC Policy for participation in National and International Proficiency testing activities" ([ILAC](#)).

[Document Cofrac SH REF 02](#), "Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale".

[Document Cofrac SH GTA 01](#), "Guide technique d'accréditation en Biologie Médicale".

[Document Cofrac SH GTA 14](#), « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale »

[Document Cofrac SH GTA 04](#), "Guide technique d'accréditation de vérification / validation des méthodes en Biologie Médicale".

[Document Cofrac SH INF 50](#), "Portées-types d'accréditation".

[Document Cofrac SH REF 08](#), "Expression et évaluation des portées d'accréditation".

SITES INTERNET

AFNOR, Association Française de Normalisation, www.afnor.fr

Cofrac, Comité Français d'Accréditation, www.cofrac.fr

EA, European co-operation for Accréditation, www.european-accréditation.org

ILAC, International Laboratory Accreditation Cooperation, www.ilac.org

James O. Westgard, PhD, www.westgard.com

HAS, Haute Autorité de santé, www.has-sante.fr

ANSM, Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, www.ansm.sante.fr/

Eurachem, eurachem.org

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, www.eucast.org

SFM, Société Française de Microbiologie, www.sfm-microbiologie.org

SFRL, Syndicat de l'Industrie du Diagnostic In Vitro, www.sfrl.fr

PUBLICATIONS

C. GIROUD. Introduction à la pratique du contrôle de qualité au LABM (304pp).. Editions FM Bio, 2007 – ISBN 978- 9521005-7-8

C. GIROUD, J. ARNAUD, V. ADJIDE, A. VASSAULT et le sous-groupe 2 analytique de la SFBC In Qualité et accréditation en biologie médicale Ann Biol Clin 2010 ; 68 (Hors série no 1) : 1-10.

J. ARNAUD, V. ADJIDE, A. VASSAULT et le sous-groupe 2 analytique In Qualité et accréditation en biologie médicale Ann Biol Clin 2010 ; 68 (Hors série no 1) : 1-10.

A. NEUBAUER, C. WOLTER, C. FALKNER, D. NEUMEIER Optimizing frequency and number of controls for automatic multichannel analyzers Clin. Chem., 1998, 44:5, 1014-23

C. A. PARVIN. Assessing the Impact of the Frequency of Quality Control Testing on the Quality of Reported Patient Results. Clinical Chemistry, 2008, 54:12 2049–2054

J.O. WESTGARD, P.L. BARRY, M.R. HUNT, T. GROTH. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry, Clin Chem, 1981, 27/1 : 493-501.

Le REMIC, Référentiel en Microbiologie médicale, Société Française de Microbiologie, 4^{ème} édition, 2010, SFM Ed.

Le REVIR, Référentiel en Virologie médicale, Société Française de Microbiologie, 1^{ère} édition, 2000, SFM Ed ,.

Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires. NF ISO 13528 ([AFNOR](#)).

Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189 ([AFNOR](#)).

Analyses de biologie délocalisées (AODB) – Exigences concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 22870 ([AFNOR](#)).

Evaluation de la conformité - Exigences générales pour les essais d'aptitude. [*comparaisons interlaboratoires*] NF EN ISO/CEI 17043 ([AFNOR](#)).

Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Parties 1-6. NF ISO 5725: Décembre 1994 et rectificatifs techniques ([AFNOR](#)).

Les fournisseurs de DM DIV et la norme NF EN ISO 15189
Position Paper édition mai 2011 ([SFRL](#))