



Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes de Biologie médicale

SH GTA 04 - Révision 02

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI





SOMMAIRE

1	OBJET	7
2	REFERENCES ET DEFINITIONS	8
2.1	Références	8
2.2	Définitions	8
3	DOMAINE D'APPLICATION	10
4	MODALITES D'APPLICATION	11
5	MODIFICATIONS APPORTEES A L'EDITION PRECEDENTE	11
6	PROCEDURES ET ENREGISTREMENTS	11
6.1	Maîtrise de la documentation – méthodologie	11
6.2	Procédure de vérification / validation de méthodes	12
6.3	Procédure de gestion de portée flexible	13
7	ANALYSE DES RISQUES	14
7.1	Préambule	14
7.2	Méthodologie de l'analyse des risques	15
8	VALIDATION / VERIFICATION SUR SITE DES PERFORMANCES D'UNE METHODE ET METHODES DE CALCUL DES CRITERES DES PERFORMANCES	21
8.1	Description du processus	22
8.2	Description de la méthode	22
8.3	Mise en œuvre	22
8.4	Maîtrise des risques	23
8.5	Identification des performances à évaluer	23
8.6	Vérification des niveaux de performances et méthodes de calcul	24
8.6.1	Vérification / validation d'une méthode quantitative	24
8.6.1.1	Evaluation de la répétabilité	24
8.6.1.2	Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)	26
8.6.1.3	Justesse	28
8.6.1.4	Exactitude	29
8.6.1.5	Incertitude de mesure	32
8.6.1.6	Comparaison de méthodes	33
8.6.1.7	Etendue de mesure	36
8.6.1.8	Interférences et spécificité analytique	37
8.6.1.9	Contamination	38
8.6.1.10	Robustesse et stabilité des réactifs	41
8.6.1.11	Intervalle de référence et/ou valeurs seuils	42
8.6.1.12	Déclaration d'aptitude	43
8.6.2	Vérification/Validation d'une méthode qualitative	43
8.6.2.1	Variabilité inter-opérateurs	43



8.6.2.2	Sensibilité, spécificité analytiques, justesse et fidélité	44
8.6.2.3	Incertitude de mesure	45
8.6.2.4	Approche de la limite de détection	45
8.6.2.5	Comparaison de méthodes	46
8.6.2.6	Interférences	46
8.6.2.7	Contamination	46
8.6.2.8	Robustesse	46
8.6.2.9	Intervalle de référence et/ou valeurs seuils	46
8.6.2.10	Déclaration d'aptitude	46
9	EXEMPLES DE METHODOLOGIE D'ANALYSES DES RISQUES ET ADAPTATION DU DOSSIER DE VERIFICATION / VALIDATION DE METHODES	47
9.1	Stratégie de vérification / validation de méthode pour la comparaison d'automates lors de l'intégration, changement et déplacement d'automates	48
9.1.1	Précisions	48
9.1.2	Analyse des risques	49
9.1.3	Stratégies de comparaison lors de l'intégration/changement de nouveaux automates et de déplacement avec démontage ou impact technique	56
9.2	Cas d'une vérification/validation d'une méthode intégrant une matrice rare	58
9.2.1	Principe	58
9.2.2	Exemples de matrices rares	58
9.2.3	Exemples de moyens pour vérifier/valider une méthode intégrant une matrice rare	59
9.2.4	Extrait d'un DVM	61
9.2.5	Guide pour le calcul des rendements d'extraction, effets matrices et performances du processus d'extraction	62
9.3	Cas d'une modification de méthode (non liée à l'étape de mesure ou relative au matériel) pouvant impacter l'étape de mesure	63
9.3.1	Exemple d'une analyse des risques pour un automate sans réactif dédié	64
9.3.2	Extrait de DVM pour un automate sans réactif dédié	65
9.3.2.1	Vérifications à effectuer	65
9.3.2.2	Exemple de conclusion	66
9.4	Stratégie spécifique de validation pour une méthode adaptée	66
9.4.1	Exemple de DVM pour une méthode adaptée	67
9.5	Cas des méthodes multiparamétriques	69
9.5.1	Exemple de dosage des IgE spécifiques par méthode immuno-enzymatique automatisée	69
9.6	Cas des processus complexes	70
9.7	Cas des « paramètres calculés »	71
9.7.1	Exemple de calcul du risque lié aux marqueurs sériques de la trisomie 21	71
9.7.2	Exemple de l'examen de dosage des bilirubines	75
9.8	Cas des tests unitaires simples (TUS)	75
9.8.1	Exemple d'un TUS réalisé sur un seul site	75



9.8.2	Exemple d'un TUS réalisé sur plusieurs sites	76
10	EXEMPLES DE SYNTHÈSES DE VÉRIFICATION / VALIDATION DE MÉTHODES.....	78
10.1	Exemple portant sur la détermination de la concentration des spermatozoïdes.....	79
10.2	Exemple portant sur la vitalité des spermatozoïdes.....	90
10.3	Exemple portant sur la calcémie (processus simple – méthode quantitative).....	103
10.4	Exemple portant sur la recherche d'anticorps érythrocytaires (Dépistage)	112
11	TESTS STATISTIQUES A L'USAGE DE LA VÉRIFICATION/VALIDATION DE MÉTHODES	136
11.1	Répétabilité, Fidélité intermédiaire : détermination de l'intervalle de confiance du CV	136
11.1.1	Qu'est-ce qu'un intervalle de confiance ?	136
11.1.2	Détermination d'un intervalle de confiance	137
11.2	Choix du ou des tests statistiques adaptés	139
11.3	Les tests paramétriques et épreuves de normalité.....	140
11.4	Valeurs aberrantes	143
11.4.1	Principe du test de Grubbs	143
11.4.2	Exemple.....	144
11.5	Comparaison de deux CV	145
11.5.1	Principe.....	145
11.5.2	Exemples.....	145
11.6	Comparaison de deux moyennes	146
11.6.1	Comparaison de 2 moyennes de CIQ m_A et m_B obtenues à partir de deux échantillons de n_A et n_B valeurs (> 30 pour les deux échantillons)	147
11.6.2	Comparaison de 2 moyennes de CIQ m_A et m_B obtenues à partir de deux échantillons de n_A et n_B valeurs avec au moins un des échantillons < 30	147
11.6.3	Comparaison d'une moyenne observée à une moyenne théorique.....	149
11.7	Comparaison de deux séries de résultats (séries appariées)	150
11.7.1	Test t des différences	150
11.7.1.1	Principe.....	150
11.7.1.2	Exemple de comparaison en utilisant un test t des différences	151
11.7.2	Test de concordance entre deux instruments	152
11.7.3	Droites de régression	154
11.8	Comparaison de n séries de résultats (n opérateurs ou n analyseurs).....	156
11.9	Vérification des concordances	159
11.9.1	Principe.....	159
11.9.2	Exemple.....	160
11.10	Comparaison de deux pourcentages observés sur deux échantillons (variable qualitatives).....	161
11.10.1	Principe	161
11.10.2	Exemple	161



12	BIBLIOGRAPHIE	163
12.1	Références légales et réglementaires	163
12.2	Références normatives générales	163
12.3	Documentation Cofrac / EA	164
12.4	Validation des méthodes	164
12.5	Validation des méthodes en biologie médicale.....	165
12.6	Sites Internet	167
13	LISTE DES MEMBRES DU GROUPE DE TRAVAIL	168

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



AVANT-PROPOS

*L'objectif de la présente révision de ce guide technique d'accréditation est d'explicitier la stratégie du processus de vérification/validation de méthodes pour **une meilleure appropriation** par les laboratoires. La stratégie se fonde sur une **analyse des risques permettant de définir des critères pertinents d'évaluation des performances des méthodes** au regard d'un contexte qui peut être plus ou moins complexe. Comme tous les guides techniques, celui-ci ne contient aucune exigence de méthodologie et de calcul mais des approches illustrées au travers **d'exemples non exhaustifs** pour guider au mieux les laboratoires dans la démonstration des performances de leurs méthodes et ce pour réaliser des prestations de qualité qui satisferont les besoins des patients et des cliniciens.*

Dans tous les cas, la démarche des laboratoires doit être motivée par le service médical rendu en vue d'une prise en charge adaptée du patient.

Les approches contenues dans ce guide sont le fruit de la réflexion collégiale de biologistes médicaux issus de laboratoires privés et publics, de membres des instances de la section Santé humaine (Comité de Section et Commission d'Accréditation), de représentants des sociétés savantes, des ordres professionnels (ordre des pharmaciens section G), d'un représentant de fournisseurs de DM-DIV et d'évaluateurs techniques (cf. liste présentée dans le chapitre 13 du présent document).



1 OBJET

La norme NF EN ISO 15189 définit les exigences particulières concernant la qualité et la compétence, pour les laboratoires de biologie médicale ("LBM"). Quant à la norme NF EN ISO 22870, elle définit les exigences concernant la qualité et la compétence pour les examens de biologie médicale délocalisés (EBMD).

Le présent guide technique explicite les exigences du paragraphe portant sur le processus analytique et les thématiques associées aux normes NF EN ISO 15189 version 2012 et NF EN ISO 22870:2017 ainsi qu'à la norme NF EN ISO 15189 version 2022 concernant la vérification / validation des méthodes en biologie médicale, en se fondant sur les bonnes pratiques dans ce domaine et les performances communément observées et acceptées (état de l'art). Le laboratoire peut compléter ces informations à partir des recommandations proposées par la SFBC, le GFHT, la SFM, l'ANPGM, l'INCA, ...

Ce guide ne se substitue pas aux exigences et/ou normes applicables au sein du laboratoire. Les approches qu'il contient et que le laboratoire est libre d'appliquer, sont celles reconnues par le Cofrac comme étant appropriées pour répondre aux exigences des normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870, ainsi qu'aux documents Cofrac SH REF 02 et SH REF 08. Dans tous les cas, il appartient aux laboratoires de démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire pleinement aux exigences normatives, sur la base des éléments développés dans le présent document.

Ce guide s'adresse :

- aux laboratoires de biologie médicale accrédités ou en démarche d'accréditation
- aux fournisseurs de dispositifs de diagnostic *in vitro* (DM-DIV) pour comprendre et accompagner les laboratoires dans leur démarche ;
- 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 d'Accréditation Santé Humaine).

Le terme "laboratoire" utilisé dans le texte désigne le laboratoire de biologie médicale. Cela étant, il peut être utile aux laboratoires réalisant des analyses dans un cadre médico-légal, les laboratoires de l'EFS exerçant des activités de qualification biologique des dons de sang, les cabinets d'anatomie et de cytologie pathologiques (ACP) ainsi que tout autre laboratoire réalisant des analyses de biologie humaine.



2 REFERENCES ET DEFINITIONS

2.1 Références

Les références bibliographiques sont rapportées dans le chapitre 12 du présent document.

2.2 Définitions

Matrice : milieu faisant l'objet de l'examen/analyse (sérum, plasma, sang total, urine, LCR, tissu, ...).

Mesurage : obtention expérimentale d'une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur. Les mesurages ne s'appliquent qu'aux propriétés quantitatives.

Technique : Ensemble de procédés reposant sur des connaissances scientifiques et destinés à la production.

Automate et automate référent : machine capable de produire des résultats d'analyses. L'automate référent est celui auquel se réfère la structure en cas de comparabilité de plusieurs automates.

Méthode : ensemble ordonné de manière logique de principes, de règles, d'étapes qui constitue un moyen pour parvenir à un résultat. Exemple : couple automate/réactif, méthode manuelle de décompte d'éléments figurés, ...

Méthode quantitative : méthode dont le résultat fournit une valeur numérique d'une grandeur constituée d'un nombre et d'une référence (10%, 22 mmol/L, ...) ou d'un ratio.

Méthode qualitative : méthode dont le résultat fournit un attribut ou une propriété d'une analyse que l'on ne peut pas exprimer quantitativement. Exemples : identification macro et/ou microscopique, résultats binaires (présence/absence, positif/négatif, ...).

Méthode reconnue : méthode faisant l'objet de norme, d'instructions issues de consensus international ou de réglementation. Les méthodes commercialisées qui utilisent des couples automate/réactifs dédiés qui correspondent à des DM-DIV marqués CE au titre de la réglementation en vigueur sont considérées comme des méthodes reconnues.

Méthode non reconnue : méthode adaptée ou développée par la structure (cf. SH REF 08).

Vérification de méthode : confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées sont satisfaites.

Validation de méthode : confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue sont satisfaites.

Processus analytique : ensemble des étapes qui aboutissent à l'obtention de résultats d'examens.

Dans le cadre d'une approche processus, les données d'entrée du processus analytique proviennent de l'étape pré-analytique et les données de sortie seront utilisées pour le processus post-analytique (interprétation des résultats de l'examen de biologie médicale, transmission des données...).



Les examens de biologie médicale peuvent être constitués d'un seul processus appelé « processus simple », comme le dosage des protéines totales dans le sérum ou de l'enchaînement de plusieurs sous-processus, appelé « processus complexe », comme le cas de l'ECBU.

Exemples :

- processus simple : dosage des protéines totales

Examen	Principe de la méthode	Technique automatisée
Dosage des protéines totales	Spectrophotométrie (biuret)	Automate commercialisé avec ses réactifs dédiés

- processus complexe : diagnostic biologique d'une infection urinaire

Examen	Principe de la méthode	Techniques manuelles	Techniques automatisées
ECBU	Mise en culture en vue du dénombrement bactérien	Oeses calibrées	Ensemenceurs
	Recherche, identification et numération d'éléments cellulaires, germes bactériens et autres éléments	Examen direct microscopique avec ou sans préparation	Analyse d'images ou cytométrie en flux
	Recherche, identification de germes bactériens et de cellules ¹	Examen microscopique et coloration : Gram...	Examen microscopique et coloration : Gram...
	Recherche, identification de germes bactériens et/ou bactéries spécifiques : identification bactérienne	Détermination phénotypique : - morphologie - caractérisation Biochimique : colorimétrie - séro-agglutination - immuno-enzymologie - immunofluorescence Biologie moléculaire	- Caractérisation biochimique (spectrophotométrie) - Spectrométrie de masse - Biologie moléculaire
Etude de la sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme standard, détermination des CMI	- Méthode de diffusion en milieu gélosé, inhibition de croissance en présence de concentration d'antibiotiques - Biologie moléculaire - catégorisation SIR ou CMI ...	- Inhibition de croissance en milieu liquide en présence de certaines concentrations d'antibiotiques, après incubation - Biologie moléculaire - catégorisation SIR ou CMI ...	

Répétabilité : conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période. La répétabilité représente la variabilité de l'instrument de mesure.

¹ Pour les laboratoires exécutant cette étape



Fidélité intermédiaire : conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période étendue, mais qui peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier. La fidélité intermédiaire représente la variabilité de la méthode. Ce terme est parfois appelé improprement reproductibilité intralaboratoire, en particulier si ce paramètre est calculé à partir de mesures réalisées sur des équipements identiques en miroir.

3 DOMAINE D'APPLICATION

Le domaine d'application du présent guide concerne le cadre spécifique de la « validation » des méthodes en biologie médicale. Il est important de préciser que la grande majorité des laboratoires **adoptent des méthodes reconnues (portée flexible standard A)**. Dans ce cas, la « validation » correspond à une vérification des performances du système analytique (analyseur et réactif), lors de la mise en application (routine) dans le laboratoire. Cette vérification permet de confirmer la fiabilité des résultats obtenus (« aptitude à l'emploi »), en fonction des objectifs définis pour satisfaire les besoins cliniques. Cette vérification correspond à un des éléments de la maîtrise du processus analytique (cf. document SH REF 02, §5.5.2), et **s'applique à l'ensemble des examens de la portée définie**.

Les laboratoires peuvent également employer des **méthodes adaptées** ou développées en interne (**portée flexible étendue B**). Dans ce cas, le laboratoire évalue, pour sa validation, l'ensemble des critères de qualité de la méthode susceptibles d'en démontrer la maîtrise.

En lien avec le document SH REF 08 rév. 06 §7.1.1, les modifications non liées à l'étape de mesure et relatives au matériel annexe ne sont pas considérées comme des adaptations de méthode lorsqu'elles n'ont pas d'impact sur l'étape de mesure (portée flexible standard A).

Ce document propose des approches pour chaque cas :

- la vérification sur site pour les méthodes adoptées (portée de type A),
- les vérifications pour les modifications sans impact sur l'étape de mesure (portée de type A),
- la validation pour les méthodes adaptées ou développées (portée de type B).

Il aborde également la gestion de la portée flexible incluant notamment la maîtrise des phases pré-analytique, analytique et post-analytique.

Pour rappel, seule la **phase analytique est envisagée** en termes de « validation » de méthode. La phase pré-analytique, essentielle, est abordée notamment au travers de la maîtrise des risques dans le présent document, ce qui n'exclut pas la réalisation d'essais dans certains cas (type de conservateur, ...). Les laboratoires doivent prendre cette phase pré-analytique en considération et mettre en place des dispositions satisfaisant aux exigences d'accréditation et **a minima respecter les instructions des notices d'utilisation si elles sont spécifiques au fournisseur ou en valider les adaptations**.

Il appartient au biologiste médical de se référer à la documentation technique du fournisseur (notices, fiches techniques, références bibliographiques, ...). Il évalue et apprécie ces informations à la lueur de recommandations ou de textes réglementaires, des attentes du prescripteur, des critères de performance proposés (SFBC, GFHT, EFLM Biological variation...).
Ce travail d'expertise est une partie intégrante du métier de biologiste médical. La vérification / validation proprement dite est ensuite effectuée. Le champ et la profondeur de cette évaluation dépendent des circonstances et de chaque cas particulier. Elle est initiale, puis se poursuit dans le temps (changement de lots de réactifs [si effet de lot connu], extensions analytiques, maintenance lourde, changement de version de logiciel, ...).



4 MODALITES D'APPLICATION

Le présent guide technique d'accréditation est applicable à compter du 1er mai 2023. 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 vérification / validation des méthodes.

Dans ce document, les formes verbales suivantes sont utilisées.

Le terme « **doit** » exprime une exigence. Les exigences correspondent à la retranscription des exigences de la norme d'accréditation, du prescripteur ou de la réglementation, ou relèvent des règles d'évaluation et d'accréditation du Cofrac.

Le terme « **devrait** » exprime une recommandation de bonne pratique. L'organisme est libre de ne pas suivre la recommandation s'il peut démontrer que les dispositions alternatives qu'il met en œuvre satisfont les exigences d'accréditation.

Le terme « **peut** » exprime une permission ou une possibilité. La possibilité est généralement employée pour indiquer des moyens de satisfaire une exigence donnée, que l'organisme est libre d'appliquer ou non.

5 MODIFICATIONS APORTEES A L'EDITION PRECEDENTE

L'objet principal de cette révision est d'intégrer les exigences normatives par une approche basée sur une analyse des risques permettant de définir des critères pertinents d'évaluation des performances des méthodes correspondant aux besoins des laboratoires. Des précisions ont été apportées sur la vérification des niveaux de performances et les méthodes de calcul. En plus d'exemples de dossiers de vérification/validation de méthodes, des exemples de méthodologies d'analyses des risques conduisant à des adaptations du dossier de vérification / validation de méthodes ont été développés. Enfin, l'annexe sur les tests statistiques aborde les bases de la réflexion pour choisir le test statistique le plus adapté au plan expérimental et l'illustration de l'utilisation de ces tests par des cas pratiques des tests statistiques.

Afin d'en faciliter la lecture, aucune marque de révision n'est indiquée.

6 PROCEDURES ET ENREGISTREMENTS

6.1 Maîtrise de la documentation – méthodologie

L'élaboration de documents de vérification / validation est importante car si beaucoup d'informations et de résultats sont collectés, ceux-ci doivent faire l'objet d'une exploitation statistique des données et d'une synthèse dans un dossier cohérent et clair, avec une acceptation formelle par un responsable désigné qui valide opérationnellement la technique.

Au préalable à cette déclaration d'aptitude, le laboratoire identifie les informations suivantes :

- Besoins du laboratoire (utilisation prévue de l'examen)
- Processus simple/complexe
- Analyse des risques globale et/ou spécifique (pré, per, post-analytique)
- Documentation fournisseur
- Etude bibliographique
- Type de méthode - reconnue (vérification)/adaptée ou développée (validation)
- Critères de performance attendus définis (état de l'art, données EFLM biological variations, sociétés savantes, ...)



- Echantillothèque
- Existence de CIQ/EEQ – modalités de comparaison inter-laboratoires/intersites

Le dossier de vérification / validation (comprenant notamment les données sources, telles que les tickets analyseurs, les feuilles de paillasse de travail, les documents d'enregistrement et/ou d'observation.) sera conservé pendant toute la durée d'utilisation de la méthode et sera archivé conformément aux exigences d'accréditation (cf. SH REF 02 §4.13).

Conformément à la procédure de vérification / validation (cf. §6.2), le dossier contient les items suivants :

- Présentation du processus analytique (étape(s), méthode(s), éléments à vérifier/valider),
- Maîtrise des risques spécifique si nécessaire,
- Détermination des niveaux de performances (paramètres) à vérifier (cf. §8.6),
- Détermination des spécifications ou limites acceptables (objectifs à atteindre) de ces critères (cf. §8.6),
- Revue bibliographique,
- Plan d'expérience et mise en œuvre expérimentale dans le laboratoire (cf. §8.6),
- Compilation et traitement statistique des données obtenues (cf. chapitre 11 du présent document),
- **Conclusion et décision** quant à la validité opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées.

Le document SH FORM 43 (synthèse de la vérification / validation) est mis à la disposition des laboratoires sur le site internet du Cofrac pour la constitution de leurs dossiers. Si des documents de synthèse internes aux laboratoires sont utilisés, ceux-ci doivent comporter *a minima* les points abordés dans le document SH FORM 43.

6.2 Procédure de vérification / validation de méthodes

Afin de respecter les exigences des normes NF EN ISO 15189 & 22870, le laboratoire doit rédiger une procédure générale de vérification / validation des méthodes précisant sa démarche et conserve les données expérimentales établies sur site. Cette procédure aborde les étapes suivantes :

- 1) Modalités de description du processus analytique : le laboratoire décrit, du prélèvement au compte-rendu, étape par étape, phase pré-analytique et prétraitement compris, les différentes composantes de la méthode (manuelle/automatique, processus simple/complexes, ...).
Le processus intègre les notions d'expression des résultats (unités, résultat brut versus calcul ; cas de TQ/TP/INR) et de disponibilité de la valeur des signaux mesurés (DO, RLU, ratio, ...);
- 2) Définition du mesurande : le laboratoire identifie le triptyque analyte, matrice et unité. Pour la réalisation d'un dosage d'un analyte dans différentes matrices, une vérification/validation de méthode adaptée à chaque matrice (urine, sang, LCR, ...) doit être conduite ;
- 3) Choix de la méthode : le choix doit tenir compte des performances analytiques de la méthode, qu'il convient de décrire ;



- 4) Analyse de la bibliographie : afin de définir les critères attendus de performance, en rapport avec la pertinence clinique, et les limites acceptables. Une bibliographie précise et étayée est préférable plutôt qu'une bibliographie très détaillée sans en extraire les éléments essentiels ;
- 5) Analyse des points critiques spécifiques de la méthode et/ou de l'examen si nécessaire et la maîtrise des risques associée : le laboratoire doit présenter l'ensemble du processus, les risques encourus et les éléments de leur maîtrise. Tout risque non maîtrisé fait l'objet d'une revue à rapporter dans le protocole de vérification / validation (cf. étape n°7) ;
- 6) Décision du type de méthode - vérification (méthode reconnue)/validation (méthode adaptée ou développée) - pour chaque méthode/étape/sous-processus (cf. SH REF 08) ;
- 7) Définition du protocole de vérification / validation sur site en fonction des critères définis à l'étape n°4 : Un plan d'expérience adapté et statistiquement valide est nécessaire. Le laboratoire définit les critères de performance à vérifier pour déclarer la mise en service de la méthode. C'est dans ce protocole que l'on trouve toutes les justifications concernant les vérifications faites qui sont d'autant plus simples que le laboratoire suit *stricto sensu* les étapes préconisées par le fournisseur ;
- 8) Exploitation statistique des données issues du protocole : c'est lors de cette étape que l'on doit retrouver, pour chaque critère de performance mesuré, sa conformité par rapport aux objectifs préalablement choisis (cf. étape n°4) ;
- 9) Concordance de méthode / d'analyseurs / de modules : lors du changement d'un analyseur, d'une méthode, d'un réactif, ..., le laboratoire doit comparer la nouvelle méthode à celle qu'il remplace.
En cas d'analyseurs en miroir, back-up, EBMD, ..., il est nécessaire d'établir une comparaison afin d'assurer la cohérence biologique des dossiers patients lorsque les mêmes examens sont traités par plusieurs analyseurs.
- 10) Prise en compte des transferts informatiques entre l'automate et le SIL et/ ou le middleware. Les preuves du bon fonctionnement des interfaces doivent être conservées ;
- 11) Conclusion : une conclusion sur l'aptitude de la méthode doit être clairement établie par un biologiste médical avec date et signature. Des commentaires peuvent être faits si besoin pour améliorer la pertinence de ce document.

6.3 Procédure de gestion de portée flexible

De la même manière, l'accréditation pour une portée flexible impose au laboratoire de disposer d'une procédure dite de « gestion de la portée flexible » (ou encore « gestion des changements techniques ») listant l'ensemble des opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement (de méthode, de réactif, d'analyseur, lieu de réalisation, ...) pour une compétence déterminée (ou ligne de portée telle que décrite dans le document SH INF 50). Le laboratoire doit mettre en place une procédure spécifique destinée à maîtriser les changements de méthodes intégrant notamment la vérification / validation de méthodes, la formation et l'habilitation du personnel, les locaux, la gestion des équipements, les contrôles de qualité, ... Cette procédure décrit l'ensemble des étapes en partant du besoin initial du laboratoire (nouvel automate, évolution de méthodes, ...) jusqu'à la mise à jour de la liste détaillée des examens et la communication au Cofrac, avec les responsabilités associées à chacune des étapes (cf. document SH REF 08).



Cette procédure de gestion de la portée flexible est destinée à passer en revue les processus mis en jeu et les responsabilités associées lors de toute modification. Elle renvoie à la procédure de vérification / validation de méthode et comporte *a minima* la maîtrise des éléments suivants :

- Achats (cahier des charges, ...),
- Processus pré-analytique (prélèvement, conditions de transport, tubes, ...),
- Revue des contrats de prestations,
- Processus analytique,
- Liste des méthodes analytiques employées,
- Formation/habilitation/réévaluation du personnel et responsabilités (notamment pour le processus de validation de méthodes),
- Conditions environnementales,
- CIQ, EEQ,
- Informatique (connexion et paramétrage),
- Processus post-analytique :
 1. Intervalle de référence et interprétations,
 2. Validation des résultats,
 3. Biothèque et rajouts d'examens
 4. Gestion du compte-rendu
- Intégration des processus suivants dans le programme d'audit interne et la revue de direction :
 1. Revue des méthodes révisées
 2. Confirmation et autorisation d'emploi des méthodes reconnues
 3. Ajout de méthodes dans la portée d'accréditation
 4. Adaptation et développement de méthodes
- Information aux clients et au Cofrac

7 ANALYSE DES RISQUES

7.1 Préambule

Pour respecter les exigences normatives portant sur la gestion des risques de la norme NF EN ISO 15189, le laboratoire doit mettre en œuvre une analyse des risques dans le but de réduire et/ou éliminer les risques identifiés. Le laboratoire peut consulter la norme NF EN ISO 22367:2020 « Laboratoire de biologie médicale – Application de la gestion des risques aux laboratoires de biologie médicale » afin d'identifier et de gérer les risques pour les patients, le personnel de laboratoire et les prestataires de service qui sont associés aux examens de laboratoire de biologie médicale.

Les principaux risques dans un laboratoire sont de fournir des résultats à la mauvaise personne, des résultats erronés, des résultats trop tardifs, des résultats inexacts ou des résultats accompagnés d'une interprétation inappropriée pouvant avoir un impact sur le diagnostic, la prise en charge ou le traitement médical du patient.

La gestion des risques de chaque processus comporte plusieurs étapes :

- l'identification des risques potentiels ;
- l'estimation du risque (par exemple : gravité, fréquence, détectabilité) et la détermination du niveau de risque ;
- la maîtrise du risque (mise en place de dispositions, de moyens de maîtrise, ...) ;
- la mesure de l'efficacité des actions mises en œuvre.

Les risques peuvent être identifiés par l'étude minutieuse des processus en mettant en évidence les étapes sensibles, les défaillances ou les incidents lors de leur mise en œuvre.



L'estimation du risque permet de hiérarchiser / prioriser les actions de maîtrise à mettre en place. Le laboratoire peut ainsi établir une échelle de criticité tenant compte notamment de la fréquence, de la gravité et éventuellement la détectabilité des événements indésirables afin de les maîtriser (par exemple la méthode AMDEC). Le laboratoire s'appuie sur des actions préventives destinées à les réduire ou à les éliminer.

L'efficacité des actions mises en œuvre pour la maîtrise des risques est évaluée en particulier à partir de l'étude de l'étendue des non-conformités et des réclamations, des audits internes, de la veille documentaire et scientifique, ...

L'efficacité de l'analyse des risques peut être évaluée, par exemple, à partir des analyses de tendance (contrôles de qualité interne, évaluations externes de la qualité, ...) de manière à établir et mettre en place un mécanisme d'amélioration continue.

7.2 Méthodologie de l'analyse des risques

La maîtrise des risques dans le cadre de la vérification / validation de méthodes consiste à identifier les caractéristiques de la méthode et les étapes critiques de la phase analytique à maîtriser. Les éléments mentionnés dans l'analyse des risques ci-dessous **ne sont pas exhaustifs**. Il appartient au laboratoire de l'adapter en fonction des situations particulières. Une bonne appropriation de l'ensemble des processus pré-analytique, analytique et post-analytique est indispensable avant d'établir le plan de vérification / validation et la stratégie des expérimentations.

La méthode qui a été retenue pour cette analyse des risques consiste en une analyse selon les 5M avec (Cf. schéma 1 : Identification de risques selon la méthode 5M) :

- Matière : l'échantillon utilisé
- Milieu : l'environnement
- Main d'œuvre : le personnel
- Matériel : l'équipement et le réactif
- Méthode : la méthode utilisée

Afin d'identifier les risques du processus de vérification / validation de méthode, le laboratoire recherche les différentes causes. Il est proposé d'aborder les différents points critiques par un questionnement. Ci-dessous sont mentionnés des exemples **non exhaustifs** de questions pratiques.

Matière

La matrice utilisée est-elle validée ou proposée par les fournisseurs ?

Les matrices utilisées sont-elles de natures comparables ? Est-il possible de choisir une matrice représentative ?

Existe-t-il des recommandations concernant la qualité, le volume du prélèvement et le contenant utilisé pour le prélèvement ?

Les prélèvements sont-ils réalisés par du personnel formé ?

Le délai et la température de conservation peuvent-ils avoir un impact sur la stabilité de l'échantillon ?

La taille des cohortes peut-elle être adaptée au regard de la rareté de la matrice ?

La stratégie de contrôles, calibration... peut-elle être adaptée au regard du type de matrice ?



Exemple montrant que l'analyse des risques peut conduire à un **moyen de vérification de la méthode qui est adapté au type de spécimen.**

DOSAGE DE GLUCOSE en lien avec la taille des cohortes					
5M	Points critiques	Echelle de criticité* (non critique, peu critique, critique)	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire	Suivi de la maîtrise du risque
Matière (échantillons)	Sérum ou Plasma	Peu critique	Performance de la méthode de dosage	- Disposition : procédure de vérification des méthodes - Application : tests statistiques robustes avec n≥30	Suivi des CIQ et EEQ
Matière (échantillons)	LCR	Critique	Performance de la méthode de dosage	- Disposition : procédure de vérification des méthodes qui précise la conduite à tenir en fonction des caractéristiques de la matrice - Application : vu l'impossibilité de faire les essais avec des effectifs importants, choix d'un moyen alternatif : dilution des sérums pour être dans une gamme identique à la concentration du	Suivi des CIQ et EEQ
Milieu					
Les conditions environnementales (température, hygrométrie, luminosité, vibrations, stérilité ...) peuvent-elles avoir un impact sur le résultat ?					
Les conditions de conservation des échantillons et des réactifs (enceintes, ...) et de prétraitement des échantillons (centrifugeuse, pipettes, ...) sont-elles maîtrisées ?					

*L'échelle de criticité est à définir par la structure selon une méthodologie qu'il lui faut décrire.

Exemple montrant que l'analyse des risques peut conduire à une précision des éléments à maîtriser selon l'organisation du laboratoire. Ainsi, **le même point critique peut être maîtrisé par des moyens différents.**

TEMPÉRATURE DE CONSERVATION DES PRÉLÈVEMENTS (15/30°C)					
5M	Points critiques	Echelle de criticité* (non critique, peu critique, critique)	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire	Suivi de la maîtrise du risque
Milieu	Dégradation du mesurande	Peu Critique	Température ambiante du site périphérique	Disposition : placer les tubes dans le couloir où la température ne dépasse jamais ces limites ; stock limité 100 tubes.	Audits internes
Milieu	Dégradation du mesurande	Peu Critique	Température ambiante du plateau technique	Mesure de la température avec sonde de surveillance	Alarmes de la centrale de surveillance



Main d'œuvre

Le personnel est-il formé, habilité ?

Est-il nécessaire de mettre en place des critères spécifiques ou une formation spécifique liés au type de matrice, à l'examen, à l'équipement ... ?

Est-il nécessaire de mettre en place une formation spécifique pour les référents techniques ?

Les critères de maintien de compétences du personnel sont-ils adaptés (complexité de la méthode, fréquence, ...) ?

Exemple montrant une analyse des risques mettant un œuvre **un moyen de maîtrise qui est en adéquation avec le point critique identifié.**

COMPÉTENCE DU PERSONNEL sur le poste technique automatisé

5M	Points critiques	Echelle de criticité* (non critique, peu critique, critique)	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire	Suivi de la maîtrise du risque
Main d'œuvre	Compétence pour réaliser les dosages et vérifier analytiquement les résultats	Critique	Habilitation du personnel technique	<ul style="list-style-type: none"> - Mise à disposition des documents utiles - Question spécifique dans le questionnaire d'habilitation « ... » (Avec grille de correction enregistrée dans le SMQ) - Habilitation après réalisation de XX* séries de dosages et de vérification analytique des résultats obtenus sans erreur. 	Maintien des compétences basé <i>a minima</i> sur la présence au poste sans anomalie (entretiens annuels)

* La précision des moyens de maîtrise (XX) se retrouve dans les dispositions.

Matériel

L'installation répond-elle aux exigences des fournisseurs (environnement, qualification ...) ?

Existe-t-il une source potentielle de contamination (inter-réactifs, inter-échantillons...) ?

La nature de l'échantillon a-t-elle une influence sur les performances de l'automate (viscosité, hémolyse, ...) ?

Existe-t-il des procédures dégradées ?

Existe-t-il un planning de maintenances ?

L'équipement nécessite-t-il une connexion/paramétrage informatique ?

Le réactif utilisé bénéficie-t-il d'un marquage CE ?

Les stocks de réactifs/consommables sont-ils gérés (dates de péremption, traçabilité des lots, ...) ?

Est-il nécessaire de reconstituer les réactifs ?



Exemple montrant que l'analyse des risques peut aboutir à un **suivi de la maîtrise du risque adapté** : une revue bibliographique, expérimentale ou les deux. Pourvu que la performance soit établie, le laboratoire peut se baser sur son expérience ou marquage CE (garantie fournisseur).

PERFORMANCE DES RÉACTIFS					
5M	Points critiques	Echelle de criticité* (non critique, peu critique, critique)	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire	Suivi de la maîtrise du risque
Matériel	Performance réactif	Critique	Qualité du réactif, conservation, reconstitution...	Marquage CE	Suivi des fiches techniques
Matériel	Performance réactif	Critique	Qualité du réactif, conservation, reconstitution...	Période probatoire à chaque livraison	Comparaison des performances selon les livraisons, exploitation résultats CIQ
Matériel	Performance réactif	Critique	Qualité du réactif, conservation, reconstitution...	- Marquage CE - Période probatoire à chaque livraison	Suivi des fiches techniques Comparaison des performances selon les livraisons, exploitation résultats CIQ

Méthode
S'agit-il d'une vérification ou d'une validation de méthode ?
S'agit-il d'une méthode qualitative ou quantitative ?
S'agit-il d'un processus simple ou complexe ?
Le principe de la méthode est-il influencé par l'échantillon (nature, volume, dilution ...), par le prétraitement, par les conditions de conservation ... ?
Les méthodes employées sont-elles comparables ?
Est-il pertinent de déterminer la limite de quantification, de détection ?
Composition du/des réactifs ?
Quid des interférences ?

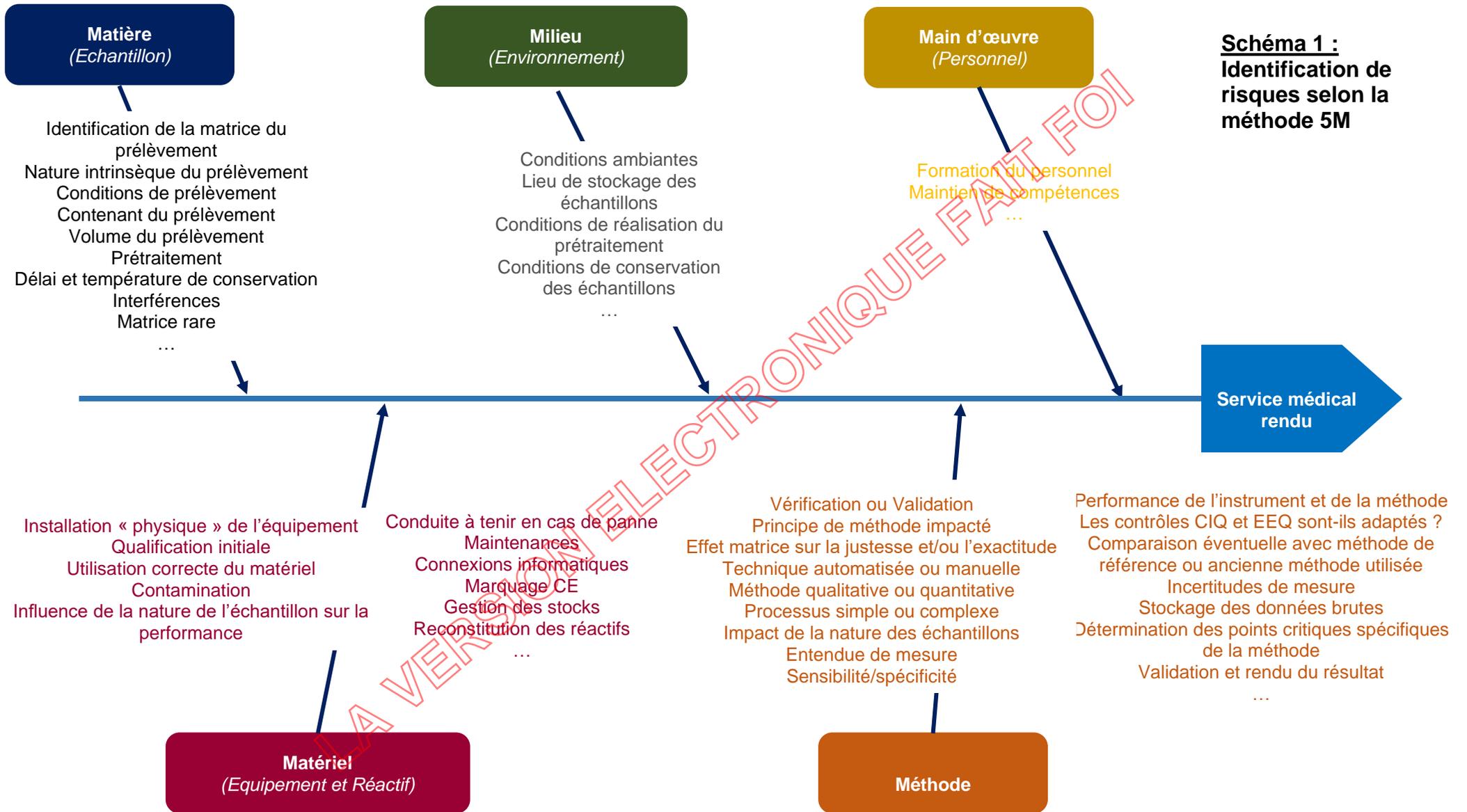


Exemple : montrant que l'analyse des risques **justifie les performances à vérifier/valider**.

MÉTHODE QUALITATIVE PAR RAPPORT À UN SEUIL MESURÉ					
5M	Points critiques	Echelle de criticité* (non critique, peu critique, critique)	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire	Suivi de la maîtrise du risque
Méthode	Interprétation des résultats (digoxinémie)	Critique	Incertitude de mesure	Procédure de détermination des incertitudes	Suivi des incertitudes
Méthode	Interprétation des résultats	Non critique	Incertitude de mesure	- Bibliographie du fournisseur confirmant que l'incertitude au seuil est négligeable au regard du contexte clinique - Expérience antérieure du laboratoire	

Les résultats de l'analyse des risques permettent au laboratoire de dimensionner son plan d'expérimentation en déterminant les critères (reproductibilité, répétabilité, exactitude, ...) à évaluer et les performances associées à ces critères.

Les laboratoires réalisent les analyses des risques de l'ensemble de leurs processus (pré- per post analytique, informatique, ...). En outre les dossiers de vérification / validation de méthodes font apparaître les éléments spécifiques de l'examen (exemples : délais pré-analytiques, composition des réactifs, ...). Cette analyse prend tout son sens pour les analyses qualitatives en particulier pour l'estimation des incertitudes.



**Schéma 1 :
Identification de
risques selon la
méthode 5M**



8 VALIDATION / VERIFICATION SUR SITE DES PERFORMANCES D'UNE METHODE ET METHODES DE CALCUL DES CRITERES DES PERFORMANCES

Le formulaire SH FORM 43 est constitué de plusieurs feuillets :

- les premiers feuillets sont destinés à l'identification du ou des processus à vérifier/valider et à la présentation du processus de vérification / validation,
- les feuillets suivants reprennent les critères de performance que le laboratoire évalue afin de réaliser sa vérification / validation de méthode.

Pour un processus complexe, les feuillets sont dupliqués autant de fois que nécessaire pour aborder chacun des sous-processus.

Le présent chapitre se propose d'illustrer les principales étapes définies dans le §6.2 et de décrire les principes méthodologiques de calcul ou des recommandations permettant de vérifier les critères de performances.

Le nombre de déterminations à prévoir dépend de la cadence de l'analyseur à valider, du coût des réactifs, ...

En général, l'effectif est de 30 pour permettre d'appliquer les règles statistiques relatives aux grands échantillons. Un nombre d'essais inférieur est argumenté en fonction de critères pertinents (rareté de la matrice, coûts des analyses, durée d'analyse, ...). La valeur statistique des résultats obtenus sera d'autant plus réduite que les effectifs seront faibles. Les calculs et tests employés devront tenir compte de ces effectifs (cf. chapitre 11 du présent document).

La responsabilité de l'élaboration des dossiers de vérification / validation des méthodes et celle de la déclaration d'aptitude des méthodes appartiennent à la direction du laboratoire.

Dans le cadre de son accréditation, le laboratoire doit pouvoir mettre à disposition du Cofrac les éléments suivants :

- la procédure de vérification / validation de méthode décrivant les lignes directrices et les modalités du processus pour la vérification / validation des méthodes ;
- les dossiers de vérification / validation des méthodes. Ces dossiers constituent des enregistrements dont les différentes versions doivent être gérées. Ils comprennent les éléments de preuve de bibliographie, les choix et spécifications, les calculs et les conclusions approuvées sous la responsabilité d'un biologiste médical quant à l'aptitude de la méthode.

Le dossier de vérification / validation peut reprendre des données accumulées par le laboratoire (CIQ, EEQ, ...) avant la demande d'accréditation, seuls les éléments manquants sont complétés par une étude expérimentale.

En cas de modification de technique ou d'un couple analyseur/technique il est souhaitable, dans la mesure du possible, de pouvoir disposer simultanément de la nouvelle et de l'ancienne technique pour pouvoir pratiquer des essais de comparaison en parallèle. En cas d'impossibilité, il est souhaitable de prévoir une échantillothèque adaptée à ces essais afin de pouvoir assurer une comparaison des deux techniques.



8.1 Description du processus

Ce chapitre illustre les étapes à suivre pour constituer les dossiers de vérification/validation et explicite la manière de compléter la synthèse (cf. SH FORM 43).

Le laboratoire décrit l'examen réalisé en termes de sous-processus (voir exemples dans le chapitre 10 du présent document). Les paragraphes « Description de la méthode », « Mise en œuvre », « Evaluation des performances de la méthode » seront dupliqués en fonction des besoins, en cas d'étapes multiples pour un processus complexe.

8.2 Description de la méthode

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	cf. §6.2 du présent guide
Principe de la Méthode :	Cette information peut être retrouvée sous le terme de « principe général des techniques » dans le SH INF 50 (colonne « principe de la méthode »)
Type d'échantillon primaire :	Préciser la matrice : urine, sang total, ADN, tissu congelé/fixé ...
Type de récipient, additifs :	Préciser le type de contenant : tube/additif/présence ou non d'un séparateur, flacon/milieux de transport, écouvillon...
Prétraitement de l'échantillon :	Modalités de prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, acidification, alcalinisation, extraction...):
Unités :	Mode d'expression du résultat (unités, ratio, ...)
Critères d'interprétation² :	Intervalles de référence : origine et définition par critères démographiques ; valeurs seuils, ...
Marquage CE (Oui/Non) :	Préciser ce qui relève du marquage CE
Codage C.N.Q. (s'il existe)³ :	Consulter le site de l'ANSM, pour l'année en cours et pour les années précédentes
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	marque, modèle, référence
Référence du (des) réactif(s) :	référence fournisseur, version notice
Matériau d'étalonnage (références) :	Nature et raccordement métrologique
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Type d'étalonnage (linéaire, non linéaire), préciser le nombre de niveaux et les valeurs des niveaux

8.3 Mise en œuvre

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) formé(s) ayant participé à la vérification / validation de méthode :	Identité des principaux opérateurs du laboratoire
Procédure de vérification / validation - mode opératoire :	Référence et version de la procédure utilisée
Procédure de gestion de la portée flexible :	Référence et version de la procédure utilisée
Période d'étude⁴ :	Préciser Du : xx/xx/xx au xx/Xx/xx Préciser si reprise des résultats antérieurs
Date de 1e utilisation⁵ :	Préciser xx/xx/xx (ex : mise en route de l'analyseur)

Rappel : Dans le cadre de la portée flexible, la vérification / validation précède toujours l'autorisation d'aptitude de la méthode.

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

³ Lorsque les tables de codage de l'ANSM ne mentionnent pas le réactif concerné, le laboratoire indique "non codé par l'ANSM".

⁴ Certains résultats peuvent provenir de périodes antérieures dans le cas d'une méthode déjà utilisée (cf. § 5.5.1.2/5.5.1.3 SH REF 02). Dans ce cas, le laboratoire justifie du maintien des performances de la méthode.

⁵ La date de 1e utilisation peut être antérieure dans le cas d'une méthode déjà utilisée



8.4 Maîtrise des risques

Lorsque le laboratoire identifie des spécificités qui n'ont pas été développées dans l'analyse des risques globale (exemple de risque global : identification des spécimens), il est alors attendu dans le paragraphe 8.4, une maîtrise des risques spécifiques (exemple de risque spécifique d'un examen : délais pré-analytiques, composition des réactifs, ...). Il est possible de présenter les éléments suivant le modèle basé sur une analyse 5M. (cf. § 7.2 du présent document).

8.5 Identification des performances à évaluer

L'identification des critères des performances à évaluer est basée sur l'analyse des risques. Les bonnes pratiques en matière de performances à évaluer sont largement décrites dans les référentiels internationaux. Le laboratoire peut également s'inspirer des guides disponibles (guides internationaux : CLSI, FDA, EFLM, ... ; guides nationaux : SFBC, QUAMIC, GFHC...) afin de déterminer les performances évaluées dans son plan d'expérimentation.

Tableau des principaux critères de performance à évaluer lors d'une vérification / validation de méthode :

CRITERES A EVALUER
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</i>
<i>Justesse/exactitude (approche)</i>
<i>Spécificité/sensibilité analytique</i>
<i>Limite de détection</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir⁶, EBMD) et analyse des discordances⁷</i>
Intervalle de mesure
<i>(Limite de quantification et limites de linéarité)</i>
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)</i>
<i>Contamination entre échantillons (si pertinent)</i>
<i>Robustesse</i>
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>
<i>Intervalle de référence (valeurs usuelles)</i>
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude⁸ de la méthode ou du système analytique.

Le choix des critères et les modalités d'évaluation (essai et/ou étude bibliographique) résultent de l'analyse des risques.

Le dossier de vérification / validation peut renvoyer à d'autres documents (bibliographie, notices fournisseurs, documents internes au laboratoire, etc.), correctement référencés et accessibles.

⁶ Appareils en miroir : privilégier les appareils utilisant des techniques de principes analytiques identiques sinon il est possible d'utiliser des codes examens différents pour le même paramètre ou d'utiliser un facteur de correction (pour les techniques linéaires) de manière transitoire. Une stratégie d'uniformisation des techniques pour un même paramètre est privilégiée lorsqu'elle répond aux besoins des usagers.

⁷ Par exemple : étude des faux positifs et des faux négatifs.

⁸ En cas de dépassement des spécifications choisies *a priori* par le laboratoire, celui-ci justifie l'acceptation des écarts pour pouvoir conclure à l'aptitude de la méthode et l'enregistre.



La trame du SH FORM 43 ou des documents internes développés par les laboratoires est destinée à répondre aux différents cas rencontrés en biologie médicale. Les laboratoires seront attentifs au choix des critères pertinents à rapporter, sachant que l'ensemble des critères présentés dans SH FORM 43 reste une proposition à adapter à chaque examen.

Le choix des essais repose sur l'assurance du service médical rendu. Exemples : la limite de quantification de certains éléments ou encore la limite de détection d'une molécule peuvent se justifier dans certains contextes. **Un argumentaire justifiant de l'absence d'essai est attendu.**

8.6 Vérification des niveaux de performances et méthodes de calcul

Le laboratoire établit les niveaux de performance obtenus de sa méthode. Il les compare aux données de référence attendues dont il dispose (fournisseur, bibliographie, sociétés savantes, ...) et conclut quant à l'acceptabilité de sa méthode en fonction de ses besoins vis-à-vis du critère testé. Les échantillons utilisés sont précisés.

Les niveaux de performances requis sont établis au regard de leur intérêt pour une prise en charge adaptée du patient.

8.6.1 Vérification / validation d'une méthode quantitative

8.6.1.1 Evaluation de la répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même **échantillon dans les conditions suivantes** : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales.

Lorsque la matrice influence l'étape de mesure, ce calcul est répété pour **chacune des matrices** (sérum, urine, LCR, ...) soumises à analyse, en utilisant des échantillons biologiques ou des échantillons du contrôle interne de qualité (CIQ). Pour un même analyseur, ce calcul est effectué pour **chaque analyte** à mesurer et à **plusieurs niveaux de concentration**.

Il peut être nécessaire de réitérer des essais de répétabilité pour vérifier le bon fonctionnement du système notamment après une intervention importante (panne, maintenance, ...).

Les résultats obtenus sont comparés aux CV annoncés par le fournisseur et/ou à d'autres critères (sociétés savantes...).

REPETABILITE							
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁹)	Conclusion ¹⁰
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, ...)		Niveaux testés					

Argumentaire de la conclusion :

⁹ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, EFLM, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

¹⁰ Conforme/non conforme



Méthode de calcul :

Il est recommandé d'utiliser au minimum 2 niveaux de concentration, en choisissant, si possible, un niveau proche de la (des) zone(s) décisionnelle(s). Ces niveaux sont choisis en fonction des valeurs physiopathologiques. Le nombre de déterminations à prévoir dépend de la cadence de l'analyseur à valider, du coût des réactifs, ... En règle générale, l'effectif est de 30 pour une interprétation statistique optimale. Un nombre d'essais inférieur est argumenté en fonction de critères pertinents (rareté de la matrice, coûts des analyses, durée d'analyse, ...). La valeur statistique des résultats obtenus est d'autant plus réduite que ces effectifs sont faibles (les calculs et tests employés tiennent compte de ces effectifs). Toute valeur écartée est justifiée.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$CV (\%) = \frac{(s)}{(m)} \times 100$$

Le CV calculé permet une évaluation de la répétabilité de la méthode exprimée en %. La définition et le mode d'expression de la fidélité figurent dans la norme ISO 5725-2. Lors de la vérification, le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement choisi (fournisseurs, sociétés savantes, ...).

En pratique :

- Choix du CV des limites acceptables de répétabilité :

- CV du fournisseur : les CV qui figurent sur les fiches techniques sont des données indicatives relatives utilisées pour le dossier de marquage CE selon la réglementation en vigueur. Ces CV ne sont pas systématiquement des consignes car parfois obtenus dans des conditions environnementales particulières. Il est donc conseillé de s'adresser au fournisseur qui peut fournir un CV des limites acceptables.
- CV des matrices déjà validées/vérifiées.
- Une approche théorique établit une relation entre la répétabilité (R) et la fidélité intermédiaire (Fi) : $R \times 1,3 = Fi$ (publication ABC 57 n°6 de novembre – décembre 1999). Cette approche est à utiliser avec précaution car le CV de répétabilité ne montre pas toujours cette relation avec le CV de la fidélité intermédiaire. A l'inverse, en l'absence de spécifications de répétabilité, le laboratoire pourra utiliser cette relation : $Fi \times 0,75 = R$.
- Sources bibliographiques mentionnant un CV des limites acceptables de répétabilité.
- Les données d'expérimentation, propres du laboratoire, obtenues avec un équipement révisé et conforme peuvent servir de référence si et seulement si le CV obtenu répond effectivement aux besoins du laboratoire.

- **Choix de valeur :** Le choix des valeurs étudiées devrait tenir compte des seuils de décision clinique.



- **Pertinence :**

- La répétabilité est utile pour valider/vérifier le processus analytique instrument / méthode / réactif elle sert aussi de référence en cas d'incident de l'instrument ou de modification du système analytique (exemple : changement d'une cellule de mesure, revalidation après intervention curative ou panne etc...). Dans le cadre d'une méthode adaptée/développée, quand elle est techniquement réalisable, la répétabilité est un élément essentiel pour apprécier la stabilité de la méthode.
- Sur la base d'une analyse des risques, le laboratoire peut également déterminer si la répétabilité d'une matrice de référence (type CIQ) peut servir d'élément documentaire de validation/vérification d'une autre matrice (Par exemple : Au regard des caractéristiques chimico-physique et du principe de méthode, peut-on se référer aux performances de répétabilité obtenu pour le glucose dans la matrice plasma pour le DVM du glucose d'une ponction articulaire ?)
- Dans le cadre d'une méthode reconnue, sur la base d'une analyse des risques, il est possible de focaliser les répétabilités sur les paramètres représentatifs dits « sentinelles ».

8.6.1.2 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

Il est souhaitable que les niveaux testés pour évaluer la fidélité intermédiaire soient identiques à ceux testés en répétabilité (cf. établissement de la robustesse §8.6.1.10).

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, ... Il permet notamment de paramétrer les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques (delta-check, critères de repasse...).

Lorsque les résultats obtenus sont supérieurs aux limites de référence / admissibles préétablies, le laboratoire vérifie si les différences observées, compte tenu du nombre de valeurs et du niveau de concentration des échantillons, sont significatives et les confronte à l'impact sur la décision médicale.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ¹⁰)	Conclusion ¹¹
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, ...)		Niveaux testés					

Argumentaire de la conclusion :



Méthode de calcul :

Classiquement, la fidélité intermédiaire est évaluée à l'aide des coefficients de variation calculés à partir des résultats des CIQ. L'essai est réalisé au cours de séries successives, en général 1 à 2 par jour, d'échantillons de Contrôle Interne de Qualité (CIQ) quotidiens.

La fidélité intermédiaire est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et à deux niveaux minimums. Une autre stratégie peut être employée et justifiée par le laboratoire sur le plan statistique.

Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité, avec calcul de la moyenne (m), de l'écart-type (s) et du coefficient de variation (CV) sur les valeurs expérimentales de chaque série ; le CV calculé est comparé au CV des limites acceptables de fidélité intermédiaire choisi au préalable (Fournisseur, SFBC, EFLM dont les valeurs peuvent évoluer dans le temps et en fonction des pathologies, ...).

Note : la répétabilité et la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) apparaissent donc comme deux évaluations différentes de la fidélité. Elles dépendent des conditions spécifiées que l'on fait varier. Des résultats d'évaluations proches de ces 2 niveaux de fidélité constituent une manifestation de la robustesse de la méthode (cf. §8.6.1.10).

Rappel :

- Le CIQ valide le processus analytique. Les bornes fournisseurs, si elles sont disponibles sont à considérer comme une référence pour cette évaluation.
- Selon la loi Normale 5% des points de CIQ sont des points compris entre 2S et 3S et 1 point pour 300 est compris entre 3S et 4S. Les points qui ne font partie de la répartition correspondante à la loi Normale ne sont pas rejetés sans argumentation (se référer à l'article « Recommandations pour la mise en place et le suivi des contrôles de qualité dans les laboratoires de biologie médicale », Ann Bio Clin 2019 ; 77 (5) : 577-97).

En pratique :

- **Choix des valeurs de CIQ :** il devrait, dans la mesure du possible, tenir compte des seuils de décision clinique (par exemple : proche du cut-off en sérologie ou zone grise pour les marqueurs cardiaques).
- **Choix des niveaux :** les niveaux souhaitables devraient être proches du ou des seuils décisionnels et si possible représentatifs de l'intérêt clinique de l'examen et ou adaptés à la population ciblée par le laboratoire.
- **Nombre de valeurs :** le CV de fidélité intermédiaire d'un nouveau dossier de vérification / validation de méthodes peut être celui établi lors d'une période relativement courte d'évaluation des performances analytiques avant l'adoption de l'examen. La fidélité intermédiaire est suivie et appréciée sur du plus long terme de façon à inclure un maximum de variations (par exemple : lots de réactifs, lots de CIQ, calibrations, personnel utilisateur, facteurs externes variables ...)



8.6.1.3 Justesse

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie).

Dans les laboratoires, les matériaux de référence certifiés sont peu utilisés en pratique courante ; il est donc difficile de parler *stricto sensu* de « valeur vraie » et par là-même de justesse.

Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la « valeur vraie ». L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ).

Dans certains domaines (pharmacologie, toxicologie) l'utilisation de matériaux non certifiés, raccordés au SI soit par raccordement interne soit par raccordement externe est un moyen acceptable pour approcher la justesse.

La valeur assignée peut être biaisée, et devrait, idéalement, être déterminée grâce à une méthode de référence dont les résultats sont traçables au SI ou aux étalons internationaux.

La connaissance de la valeur vraie repose actuellement sur les valeurs assignées associées aux échantillons de contrôle. Ce sont des valeurs consensuelles (moyenne de l'ensemble des participants (si les seuils de décision pour l'examen concerné sont standardisés selon recommandations HAS, ...) ou un consensus, ou moyenne par groupe de pairs en fonction des méthodes, des analyseurs ou des fournisseurs).

La commutabilité des échantillons, c'est-à-dire leur capacité à se comporter comme des échantillons réels (échantillons de patient) quelle que soit la méthode utilisée, doit être prise en compte. En effet, les effets de matrice engendrés par les différents traitements subis par les échantillons de contrôle durant leur préparation (lyophilisation, congélation, ajout de conservateur, surcharge, mélange, ...) peuvent être à l'origine de biais qui ne sont pas retrouvés avec des échantillons patients.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite ¹⁰	Conclusion ¹¹
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion :

Méthode de calcul :

La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire), établie avec des échantillons de CIQ, à la valeur cible attendue (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs, ou la valeur assignée), assimilée à la valeur « vraie » (v) de l'échantillon testé.



Elle est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

Le concept de justesse et les méthodes d'évaluation du biais sont développés dans la norme ISO 5725-4.

Le Z-Score n'apporte pas à lui seul une idée de la justesse mais il informe sur la position du résultat du laboratoire par rapport à un groupe d'utilisateurs (pairs, méthodes...).

Rappel :

Une justesse est obtenue avec une valeur de référence constituée par :

- Un matériau de référence certifié (MRC) ;
- Un étalon raccordé au SI ;
- Un raccordement à une valeur consensuelle (par exemple : externalisation CIQ,....).

Pour certaines techniques, la mise en place d'un CIQ externalisé ou l'utilisation d'un MRC n'est pas toujours possible. Dans ce cas, l'absence de justesse dans le dossier de méthodes est argumentée.

8.6.1.4 Exactitude

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. Comme la justesse, l'exactitude devrait être vérifiée à partir d'une valeur de référence mesurée à partir d'une méthode de référence. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité ou l'échange inter-laboratoires d'échantillons.

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

Le plan de participation aux EEQ prend en compte le nombre de participants.

Il est rappelé qu'une analyse des résultats obtenus lors des campagnes d'EEQ est nécessaire à l'octroi ou au maintien de l'accréditation (cf. SH REF 02).

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons ¹¹	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite ¹⁰	Conclusion ¹¹

Argumentaire de la conclusion :

¹¹ les échantillons testés correspondent aux EEQ/CNQ



Pour la méthode de calcul :

Le laboratoire peut établir l'inexactitude d'une méthode à partir des résultats des EEQ (analysés une seule fois) en comparant la valeur trouvée à la valeur cible attendue (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs), assimilée à la valeur « vraie » (v) de l'échantillon testé. L'écart observé quantifie l'inexactitude. L'évaluation de l'inexactitude est d'autant plus pertinente que le nombre d'échantillons d'EEQ est élevé.

L'inexactitude est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

Avec : x : valeur trouvée pour l'EEQ et v : valeur cible

Ces valeurs permettront un calcul d'une valeur moyenne et de sa dispersion nécessaire pour le calcul d'incertitude.

Rappel :

La norme ISO 5725 utilise deux termes « justesse » et « fidélité » pour décrire l'exactitude d'une méthode de mesure. La « justesse » se réfère à l'écart entre la moyenne arithmétique d'un grand nombre de résultats d'essai et la valeur de référence vraie ou acceptée. La « fidélité » se réfère à l'écart entre les résultats d'essai.

La norme ISO 3534 propose une autre approche d'estimation de l'exactitude par le biais du profil d'exactitude.

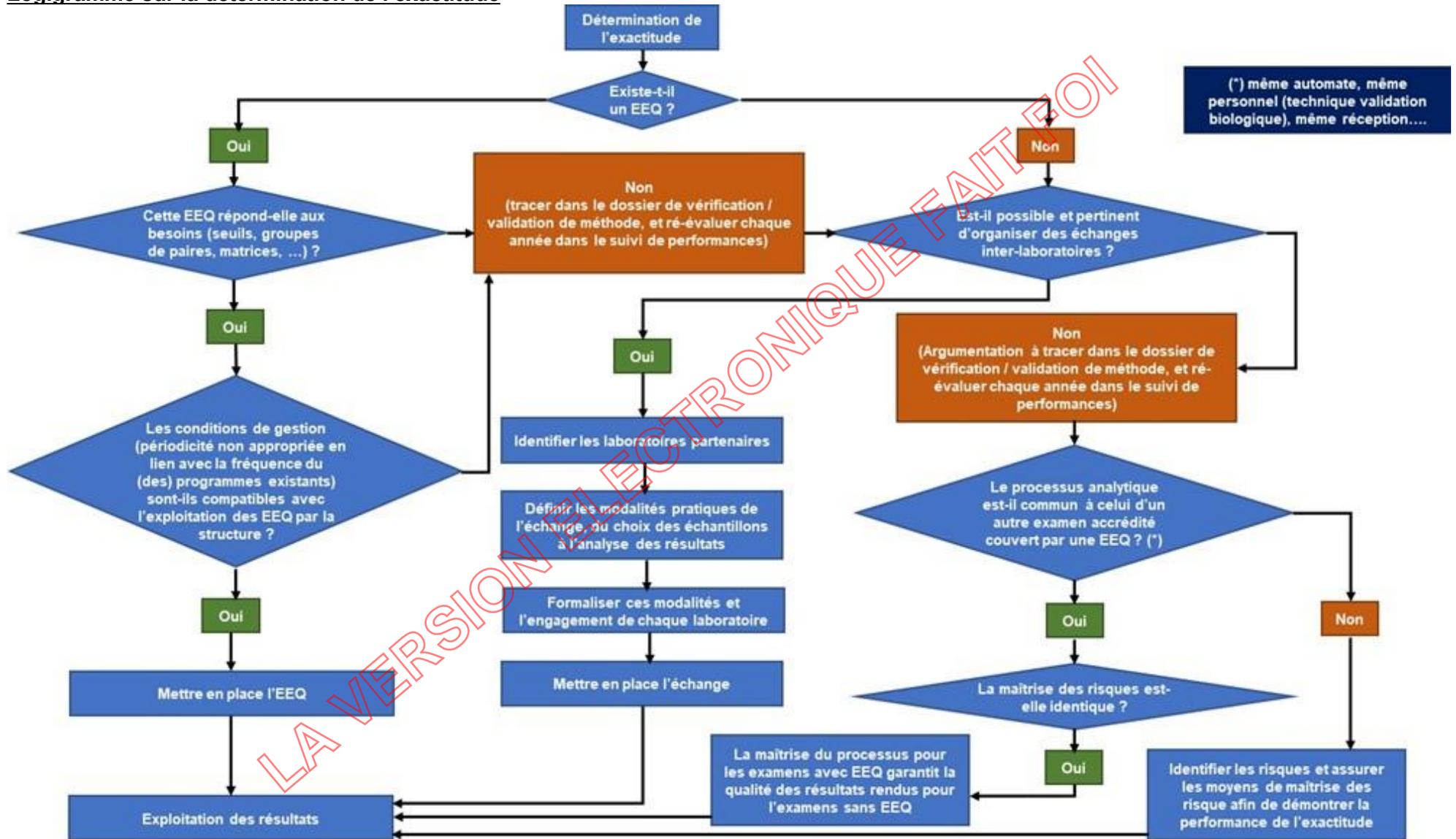
Une approche recevable peut être l'approche statistique adossée aux retours d'EEQ. Dans ce cas, le calcul des z-scores prend en compte la dispersion des résultats autour d'une valeur assignée. Les limites de recevabilité à ± 2 en z-scores correspondent à un niveau de significativité suffisant (Intervalle de confiance à 95%) pour statuer sur l'existence ou pas d'un biais d'exactitude. Le postulat sous-jacent est qu'il y a une distribution normale des résultats dans l'exercice d'EEQ avec un nombre suffisant de participants.

En pratique :

- L'inexactitude est calculée avec des valeurs d'EEQ. Or, il n'est pas toujours possible d'obtenir des EEQ dans la matrice dosée. Si la matrice de l'échantillon n'a pas d'impact sur la méthode initialement validée, alors la matrice de référence de l'EEQ peut être utilisée.
- En cas d'absence d'EEQ, il est possible d'appliquer le logigramme ci-dessous. Le choix du laboratoire partenaire pour l'organisation de la CIL peut se porter si possible sur un ou plusieurs laboratoires accrédités de préférence utilisant la technique ou équivalent ou une autre technique reconnue.
- Il n'est pas rédhibitoire de faire partie d'un groupe de pairs réduit. L'utilisation du groupe utilisant plusieurs techniques est envisageable et peut conduire à une comparaison inter-laboratoire.
- En cas d'absence d'EEQ, il existe d'autres moyens tels que :
 - o La confrontation avec la clinique (par exemple : sexe fœtal, rhésus fœtal, IgE spécifiques, Test d'activation, Bilharziose...)
 - o Le raccordement direct au SI (par exemple : poudre de référence avec un certificat d'analyse ...)
 - o L'utilisation d'un étalon OMS
 - o L'utilisation de matériaux de référence (par exemple pour les : métabolites, des médicaments, ...)



Logigramme sur la détermination de l'exactitude





8.6.1.5 Incertitude de mesure

L'évaluation de l'incertitude de mesure est une exigence de la norme NF EN ISO 15189. De plus, les composantes d'incertitude de la phase analytique pour chaque mesurande doivent être établis. Un calcul d'incertitude doit en outre être déterminé pour les paramètres quantitatifs (cf. SH REF 02). Le laboratoire peut suivre les lignes directrices pratiques pour l'estimation de l'incertitude de mesure du document Spécification technique XP ISO/TS 20914:2020.

La démarche est de définir le mesurande et d'analyser le processus de mesure :

- identifier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure ;
- identifier, parmi ceux-ci, ceux dont l'influence est considérée comme non significative, en précisant les raisons de cette décision (preuve ou élément connu)
- apporter la preuve de la maîtrise des facteurs qui ont une influence significative sur les résultats.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau 1 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau 2 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau xxx en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) :

Méthode de calcul :

Le document SH GTA 14 a été rédigé pour aider les laboratoires à procéder à la détermination de l'incertitude de mesure des résultats.

L'incertitude doit être réévaluée régulièrement. La périodicité peut être définie en fonction d'un délai ou la survenue d'un évènement particulier (dérive du biais d'inexactitude, CV de fidélité intermédiaire, vieillissement d'un automate, ...). Elle est à évaluer en fonction des besoins cliniques et l'interprétation biologique du dossier patient. Elle est confrontée aux exigences de performance du laboratoire qui peuvent être calculées à partir de données de sociétés savantes ou de publications faisant autorité, et tenant compte des fidélités et biais limites.

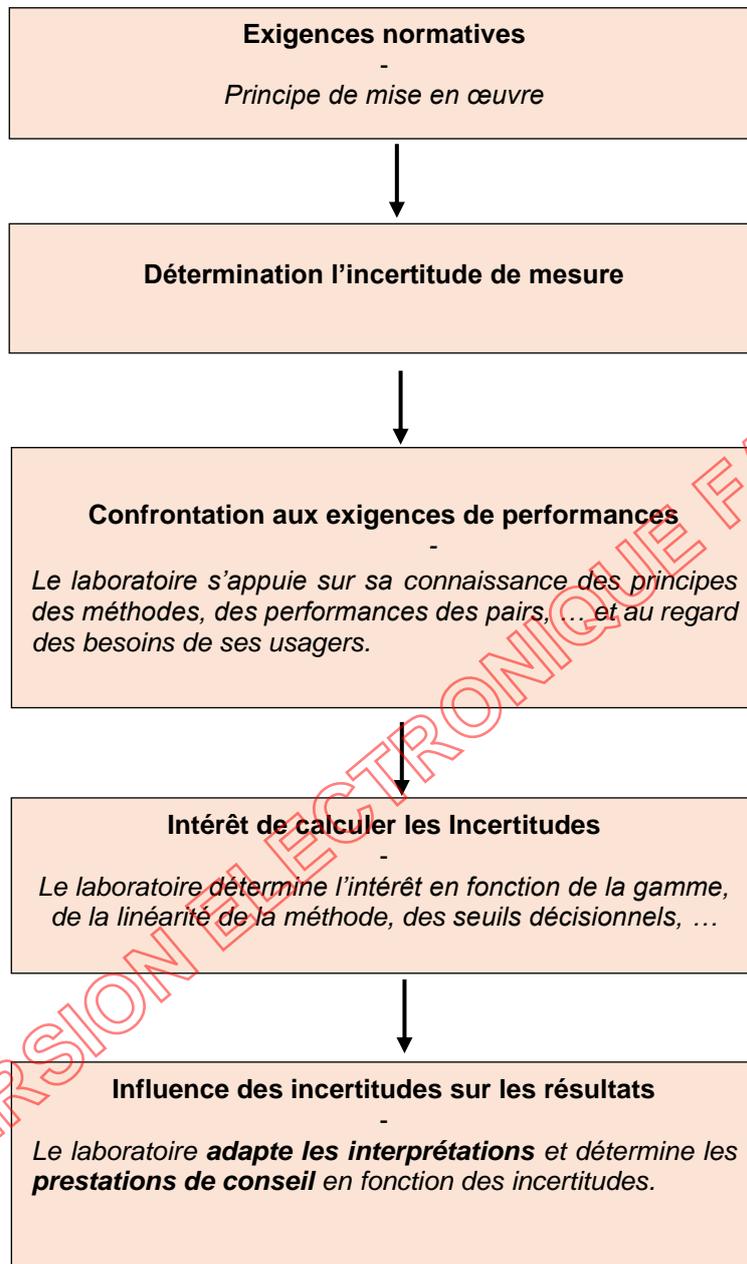
Rappel :

- Pour les résultats avec un seuil décisionnel, le laboratoire définit sa propre incertitude.
- L'incertitude peut également être liée à la variabilité inter-opérateurs (ex : table de Rümke en hématologie).

Le résultat de l'incertitude est pris en compte dans l'interprétation voire dans la prestation de conseil (cf. schéma des étapes de détermination et utilisation des incertitudes de mesure).



Etapes de détermination et utilisation des incertitudes de mesure :



8.6.1.6 Comparaison de méthodes

Dans le cadre d'appareils en miroir, la comparabilité des résultats doit être assurée, lors de la vérification ou la validation initiale, et de façon continue (cf. NF EN ISO 15189 :2012 § 5.6.4 et NF EN ISO 15189 :2022 §7.3.7.4).

Différents exemples de comparaison de méthodes entre des analyseurs en fonction des changements sont développés dans le chapitre 9 du présent document.



Si des différences significatives sont observées, le biologiste médical formalise la conduite à tenir :

- Rejet de la méthode si elle ne correspond pas au cahier des charges initial,
- Utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction (attention aux problèmes d'interprétation des résultats de comparaisons inter-laboratoires avec les EEQ ou les CIQ externalisés),
- Information des cliniciens prescripteurs,
- Adaptation des intervalles de référence (en dernier recours si la méthodologie de calcul des intervalles est maîtrisée)

Remarques :

- Après établissement du graphique des différences (différences observées en fonction du niveau de concentration), les valeurs discordantes éventuelles devront être exploitées par le laboratoire afin de mener une analyse des causes et une analyse d'impact sur les divergences constatées entre les 2 méthodes testées.
- Changement d'analyseur : en cas d'impossibilité d'évaluer le nouvel analyseur en parallèle du précédent (par exemple manque de place pour positionner les 2 analyseurs dans le laboratoire), le laboratoire établit dans sa procédure de gestion de portée flexible les opérations réalisées *a minima* avant d'effectuer des examens pour les patients.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références bibliographiques
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Appareils en miroir : préciser les références des appareils comparés
Nombre de mesures :	Préciser le nombre de mesures
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Préciser les valeurs minimum et maximum de l'étendue des mesures
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres rectangles, moindres carrés, passing et bablok ...
Equation de la droite de régression :	$Y = ax + b$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Indiquer le nombre de déviants après les avoir vérifiés et documentés

Argumentaire de la conclusion :

Méthode de calcul :

Pour comparer les résultats d'une méthode Y (à tester) avec ceux d'une méthode X (utilisée dans le laboratoire ou prise comme référence), on analyse au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré et répartis si possible selon les recommandations de l'article « Quality specifications and allowable limits for validation of methods used in clinical biochemistry (p.685-95), 1999 ».

Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés en simple par les 2 méthodes, dans un délai le plus court possible. Les résultats sont examinés au fur et à mesure, et il est vérifié si les discordances (écart entre les deux méthodes) sont jugées supérieures aux limites préétablies calculées comme suit :

$$\text{Limites de suivi} = \pm \sqrt{(3\sigma_{FI \text{ technique testée}})^2 + (3\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}})^2}$$

Avec σ_{FI} : écart-type de la fidélité intermédiaire (FI) obtenue à partir des CIQ.

Si $\sigma_{FI \text{ technique testée}} = \sigma_{FI \text{ technique de comparaison}} = \sigma$



Alors Limites de suivi = $\pm 4.24 \sigma$ pour chaque niveau de concentration (cf. figure 1)

Pour chacun des couples retenus x_i (méthode X) et y_i (méthode Y) :

- Calculer les différences $x_i - y_i$
- Calculer les rapports y_i / x_i

Etablir les graphiques des différences, $(x_i - y_i)$ fonction de x_i et (y_i / x_i) fonction de x_i , et reporter les limites retenues en valeur absolue ou relative sur ces graphiques (cf. figures 1, 2 et 3 suivantes).

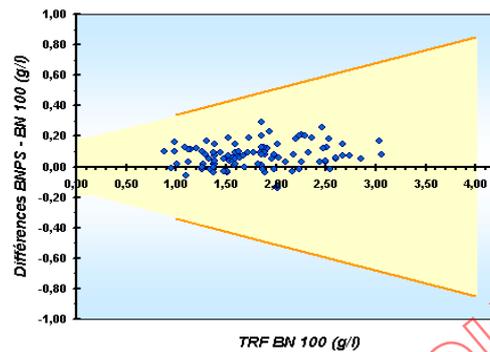


Figure 1

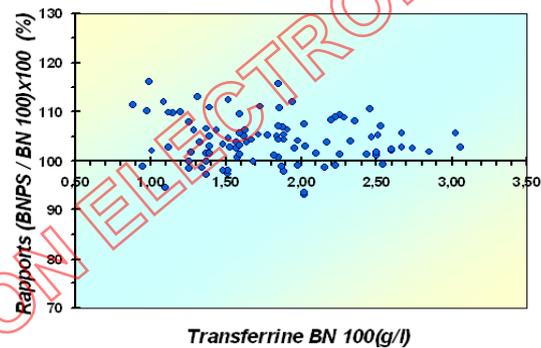


Figure 2

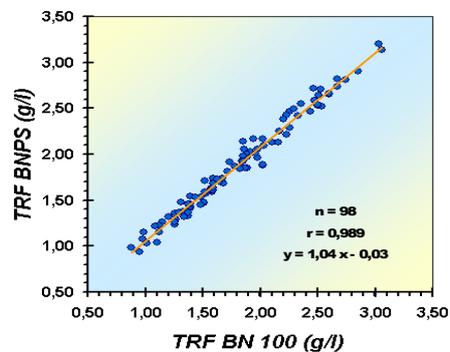


Figure 3



Noter le nombre d'échantillons discordants identifiés, et rechercher la cause de la discordance si elle subsiste après contrôle (aspect, fibrine, hémolyse, ...) et faire une analyse d'impact en fonction de la clinique, l'état de l'art... (Cf. Chapitre 9 du présent document).

Le calcul du coefficient de corrélation ne s'applique qu'à des variables indépendantes pour démontrer un lien entre deux variables x et y. Ce n'est pas le cas lors d'une comparaison de techniques. **La valeur du coefficient de corrélation n'a donc pas d'intérêt pour la comparabilité des deux méthodes.** Les données pertinentes sont apportées par l'équation de la droite de régression dont la pente et l'ordonnée à l'origine exprimeront la similitude des méthodes comparées (similitude optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0). Il est possible de comparer la pente obtenue à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 à l'aide d'un calcul statistique.

8.6.1.7 Etendue de mesure

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité.

Limite de détection : Il s'agit du plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions (en chromatographie, la limite de détection peut être déterminée comme étant égale au triple de l'écart-type obtenu à partir du signal correspondant à la ligne de base mesuré 10 fois).

L'étude de la limite de détection est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés entre les blancs et les échantillons.

Limite de quantification : La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue.

La limite de quantification est la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon de patient.

Limite de linéarité

Après la dilution d'un échantillon de concentration très élevée, les résultats obtenus permettront de vérifier l'existence d'une relation linéaire entre les dilutions effectuées et les concentrations observées (s'assurer de l'adéquation du diluant nécessaire et des pipettes utilisées).

La limite supérieure de linéarité et la limite de quantification permettent de définir le domaine de mesure de la méthode.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)

Argumentaire de la conclusion :



Méthode de calcul :

Limite de détection :

Pour l'estimer, on peut effectuer 30 mesures répétées des blancs (matrice dépourvue de l'analyte à doser, « calibrateur » zéro, diluant) dans une même série, et on calcule l'écart-type (S_b) exprimé en concentration de ces 30 mesures.

Une autre méthode d'estimation est de calculer le rapport signal/bruit.

La limite de détection peut être calculée selon la formule suivante en absence de bruit de fond :

$$\text{Limite de détection} = 3 \times S_b$$

Pour les méthodes qualitatives, la limite de détection correspond au seuil de positivité.

Limite de quantification :

La limite de quantification peut être estimée selon la formule suivante en absence de bruit de fond :

$$\text{Limite de quantification} = 10 \times S_b$$

La limite de quantification peut également être évaluée à l'aide de dilutions d'un étalon ou de l'échantillon de Contrôle Interne de Qualité le plus bas (différent de 0) avec le diluant, selon le schéma : 100 + 0 ; 90 + 10 ; 10 + 90 ; 0 + 100 soit 11 échantillons mesurés chacun 10 fois dans une série unique.

On calcule, pour chaque série de mesures des différentes dilutions, l'écart-type (s), le Coefficient de Variation (CV) et l'écart de la moyenne (m) à la valeur théorique (réalisation d'un profil de « précision » ou profil de fidélité). A partir de la courbe des CV en fonction des concentrations (courbe d'Horwitz), est déterminée la concentration correspondant généralement à un CV de 10 % et représentant la limite de quantification.

8.6.1.8 Interférences et spécificité analytique

Une méthode « sélective » ou « spécifique » permet le dosage d'un analyte sans interférence dans une matrice complexe. Des substances dites « interférentes » altèrent le signal de mesure pouvant entraîner des résultats erronés.

Il peut être nécessaire d'établir un plan d'expérimentation en fonction des interférences les plus probables. Dans le cas d'une méthode adaptée/développée, une étude expérimentale pertinente est effectuée afin d'établir l'influence de substances présentes dans la matrice et potentiellement interférentes.

La surveillance des interférences est à réaliser de façon continue (recherche active).

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)	
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Turbidité	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Bilirubine, ictère	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Médicaments	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge
...	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge

Argumentaire de la conclusion :



Les recommandations :

La présence dans les liquides biologiques de substances endogènes (bilirubine, hémoglobine, lipoprotéines, ...) ou exogènes (médicaments) peut être à l'origine d'interférences et conduire à des résultats erronés. L'influence de ces substances est variable en fonction des examens et des méthodes de mesure. Un protocole d'évaluation de ces influences est proposé par la SFBC.

Ce protocole consiste à évaluer l'influence de la substance interférente en surchargeant avec celle-ci un échantillon de concentration connue.

Exemple pratique : le pourcentage de récupération nommé test de surcharge

Le pourcentage de récupération permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse. Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié (Cf) et la concentration initiale mesurée du même échantillon non fortifié (Ci), divisée par la concentration de la substance ajoutée (Ca). Ce rapport tient compte de la transformation chimique qui s'est produite, s'il y a lieu. Un minimum de cinq essais est demandé pour l'évaluation d'une méthode d'analyse.

Méthode de calcul de la récupération :

Dans la zone quantifiable de la méthode, analyser cinq échantillons réels. Ajouter une concentration d'au moins 50 % et d'au plus 100 % de la concentration réelle de la substance à doser.

$$\text{Récupération (\%)} = (C_f - C_i) / (C_a) * 100$$

Avec un seuil d'acceptabilité fixé à 10%.

Il est envisageable, par exemple pour une validation de dosage des protéines dans un liquide articulaire par une méthode automatisée non validée par le fournisseur, d'ajouter à un échantillon de liquide articulaire de concentration connue, une quantité de sérum de concentration connue et de calculer le taux de récupération ou de taux de recouvrement.

Ce test permet en effet de valider l'effet matrice et participe à l'évaluation de la justesse de la méthode.

8.6.1.9 Contamination

Il existe de nombreuses sources ou possibilités de contaminations, il appartient au laboratoire de procéder à une analyse des risques détaillée et documentée qui s'appuie sur une bonne compréhension du système analytique, du processus analytique complet ainsi que les phases pré et post analytiques. Cette approche peut conditionner le plan d'expérimentation et l'exploitation statistique des résultats.

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques, notamment au niveau des systèmes de pipetage des échantillons (contamination inter échantillons) et de distribution des réactifs (contamination inter-réactifs).

Contamination inter échantillons :

Une étude de contamination inter-échantillon est à effectuer pour tous les systèmes automatisés de manière bibliographique ou expérimentale. Elle porte surtout sur les analytes qui peuvent être affectés par ce phénomène en raison des variations physiologiques observées en pratique courante (β -HCG, Antigène HBs, ...).



L'étude est répétée en cas de doute sur le fonctionnement du système automatisé, et en particulier du système de lavage et/ou de décontamination.

Compte tenu de l'importance clinique de certains examens, le niveau de la contamination devrait être proche de zéro ou susciter la définition de règles de revue systématique à chaque fois qu'un échantillon présente une valeur susceptible de contaminer l'échantillon suivant et de produire un résultat erroné.

Contamination inter-réactifs :

Le phénomène de contamination inter-réactifs peut se produire sur un analyseur lorsque le système de distribution est commun à tous les réactifs.

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple : Ag HBS, β HCG) :	Préciser les données fournisseur ou les résultats de l'essai de surcharge
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	Préciser les données fournisseur ou les résultats de l'essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

Méthode de calcul et les recommandations :

Contamination inter échantillons :

Une étude des contaminations inter-échantillons peut être effectuée de la façon suivante : Après rinçage de l'appareil, un échantillon à valeur élevée (ou positif fort) est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne mH) suivi d'un échantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) peuvent être répétées plusieurs fois (5 fois) afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3). La différence statistiquement significative entre les 2 moyennes pourra être établie à l'aide d'un test « t » de Student avant de procéder au calcul du pourcentage de contamination inter échantillons.

Remarque : en technique micro-plaque, assimilable à du quantitatif, il est préférable de disposer les échantillons positifs et négatifs en fonction de la structure du peigne de lavage.

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

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(mB1 - mB3)}{(mH - mB3)} \times 100$$

Compte tenu de l'importance clinique de certains examens, le niveau de la contamination devrait être proche de zéro ou entraîner des règles de « repassage » argumentées.

Remarque : Cette méthode de calcul ne peut pas s'appliquer à des techniques qualitatives. Dans ce cas, il est possible de vérifier, en alternant des échantillons positifs et négatifs, que les échantillons négatifs restent négatifs, il en est de même pour les échantillons positifs.

Contamination inter réactifs :

Une étude de contamination inter-réactifs peut être effectuée de la façon suivante en biochimie (contamination lors de la mesure de l'activité de la LDH par des réactifs ALAT) : Après rinçage de l'appareil, l'activité de la LDH est mesurée n fois (par ex n=10), en série sur un échantillon de sérum. La valeur moyenne de la LDH (évaluée en série) est calculée.



Dans une deuxième étape l'activité de la LDH est établie sur le même sérum mais en alternance (ALAT, LDH, [n fois]). La valeur moyenne de la LDH (évaluée en alternance avec ALAT) est calculée. La différence statistiquement significative entre les 2 moyennes est établie à l'aide d'un test « t » (cf. annexe 3), mettant en évidence une contamination inter-réactifs.

Rappel de quelques exemples de contaminations :

- **Du système analytique :**
 - Aiguille commune à plusieurs dosages ;
 - Lavages spéciaux (détergents, ultrasons, ...) ;
 - Ordre de réalisation des tests ;
 - Pollution (par exemple : cuvette réactionnelle mal vidée ou mal lavée) ;
 - Homogénéisation échantillons avec création d'aérosols.

- **De la phase pré-analytique :**
 - Milieu de transport ou de conservation (par exemple effet aérosol lors du débouchage ou de la centrifugation) ;
 - Cheminement pré analytique (paillasse intermédiaires) ;
 - Pré-traitements (fluidifiants, liquéfiant, acidifiants) ;
 - Centrifugation ;
 - Projections ;
 - Contamination cutanée du préleveur ou du prélevé.

- **De la phase post-analytique :**
 - En cas de rajout d'analyse si le tube est passé sur des systèmes qui potentiellement auraient pu contaminer (aliquotage).

- **Péri-analytiques :**
 - Contamination ambiante (CO₂) ;
 - Contamination environnementale (ex : biologie moléculaire / PCR, "marche en avant") ;
 - Par la qualité de l'eau (osmosée, distillée).

En pratique :

- Le choix des paramètres qui font l'objet d'une expérimentation est basé sur une bonne connaissance du système analytique et des réactifs.
- Les indices statistiques de contamination obtenus sont à interpréter au regard de la signification clinico-biologique.
- Une alternative peut consister à comparer une "série neutre" et une "série contaminée" avec la limite de 2,8 x CV reproductibilité.

Par exemple : Dosage d'HCG à 3 UI/L. Répéter ce dosage 10 à 15 fois pour obtenir une moyenne. Ensuite, on dose un HCG fort en alternance avec cet HCG à 3 UI/L 5 fois de suite. Les 5 faibles qui suivent les forts seront comparés à la première série d'HCG à 3 dont on a déterminé la moyenne. Ils doivent être inférieurs à la limite de 2,8 x CV reproductibilité.



8.6.1.10 Robustesse et stabilité des réactifs

Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Ces variations, faibles, correspondent à l'écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale définie dans la méthode. Certains paramètres peuvent avoir une influence comme par exemple :

- la température d'incubation : vérifier que l'incubateur atteint bien le point de consigne sans dépassement supérieur lors de la stabilisation,
- les effets de bords sur microplaques : vérifier l'influence éventuelle sur la qualité des résultats de la position de l'échantillon en différents emplacements de la plaque,
- la composition d'une phase mobile en CLHP (pH, teneur en solvant, ...).

Stabilité des réactifs

Dans le cas de réactifs fabriqués par le laboratoire, les conditions de stabilité (température, durée de conservation, ...) sont établies. Pour les réactifs correspondant à des DM-DIV, le laboratoire note les préconisations relatives à la stabilité des réactifs définies par le fournisseur (température et durée de conservation avant/après ouverture, conservation embarquée sur l'analyseur, ...).

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Eléments critiques testés (t°, pH, position sur un support, ...)	Préciser les données fournisseur ou essai sur site
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

Les recommandations :

La robustesse :

L'évaluation de la robustesse nécessite d'identifier les paramètres (pH, température, ...) ayant un effet significatif sur la performance de la méthode. L'évaluation de la robustesse n'est indispensable que pour les méthodes développées en interne.

L'évaluation de la robustesse peut être une mesure de la reproductibilité des résultats obtenus dans des conditions opératoires normales, entre laboratoires, entre opérateurs, ..., comparée à la répétabilité de cette même procédure d'analyse appliquée dans des conditions opératoires de type répétabilité (même opérateur, même série). Plus le rapport entre ces deux expressions de la fidélité est proche de 1, plus la méthode sera robuste.

Une alternative pour évaluer la robustesse consiste à appliquer le protocole expérimental de Plackett-Burman. Les laboratoires peuvent se reporter aux références bibliographiques pour exemples de calcul (Young, Eurachem, Plans d'expérience SFSTP).

La stabilité des réactifs :

Dans le cadre d'une validation de méthode, une évaluation de la stabilité des réactifs est à réaliser. Elle consiste à évaluer par exemple la stabilité des réactifs « sensibles » ou « embarqués » à bords des analyseurs.



Dans ce cas, on peut analyser un étalon de niveau de concentration élevée en tant qu'échantillon inconnu à intervalle régulier entre J1 et Jn. Le nombre d'analyses entre ces deux dates est fonction de la durée de conservation attendue pour obtenir un minimum de 10 résultats.

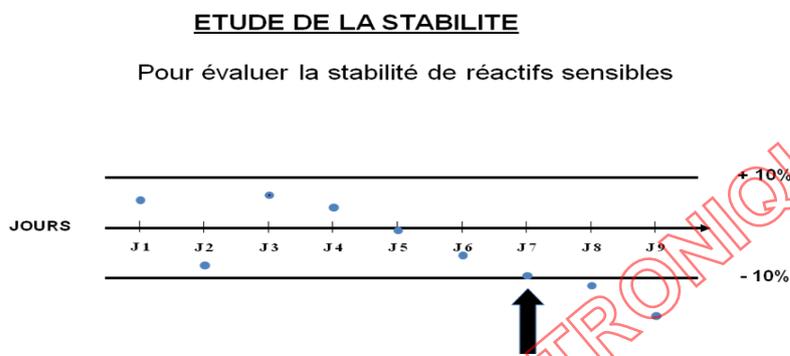
Des limites de stabilité théoriques (Lst (en %), par exemple $\pm 10\%$) adaptées à chaque analyte (en rapport avec limites acceptables pour le CIQ par exemple) sont établies.

Les valeurs correspondant à (+ Lst) en % du taux théorique de l'étalon utilisé sont calculées.

Chaque mesure de l'étalon v devrait être comprise dans l'intervalle [v – Lst (%) ; v + Lst (%)].

La limite de durée de stabilité est obtenue comme suit :

La limite de durée de stabilité correspond à la dernière valeur de l'étalon comprise dans l'intervalle [v – Lst %; v + Lst %].



8.6.1.11 Intervalle de référence et/ou valeurs seuils

L'intervalle de référence et les seuils de décision médicale sont définis et documentés par le laboratoire, en fonction de l'âge, du sexe, ... et devront être adaptées à l'usage des résultats par les cliniciens en pratique courante.

Dans le cas d'un développement de méthode, le laboratoire peut être amené à définir ses propres intervalles de référence ou les seuils de décision médicale correspondants.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Préciser les données fournisseur ou les résultats des essais pratiqués

Argumentaire de la conclusion :

Méthode de calcul :

Si la distribution de la population est gaussienne, le calcul peut se faire de la manière suivante :

- après une période d'utilisation permettant d'obtenir un nombre de valeurs significatif (n > 100),
- à partir de patients exempts de pathologie (si possible),
- en écartant les valeurs aberrantes,
- en écartant toutes les valeurs > m + 2s et < m – 2s,



- en recalculant la moyenne (moyenne tronquée) m_t et l'écart-type (écart-type tronqué) s_t à partir des valeurs ainsi retenues,

Les valeurs de référence seront données par l'intervalle [$m_t - 2s_t$; $m_t + 2s_t$].

Les valeurs de référence (ou intervalle de référence) peuvent également être déterminées par d'autres méthodes statistiques notamment non paramétriques (CLSI).

8.6.1.12 Déclaration d'aptitude

Une conclusion argumentée, à partir des limites acceptables définies au préalable, doit finaliser l'acceptation de la méthode (par une personne compétente et habilitée à cet effet, cf. NF EN ISO 15189 :2012 §5.5.1.3 et NF EN ISO 15189 :2022 §7.3.2 et 7.3.3).

DECLARATION d'APTITUDE	
Conclusion :	
Autorisée par :	
Signature	

Rappel : La confirmation des performances de la méthode est nécessaire dans la pratique quotidienne. Pour maîtriser pleinement une méthode, l'utilisation, la gestion et le suivi des contrôles internes de qualité (CIQ) et des évaluations externes de la qualité (EEQ) sont indispensables. Leur exploitation statistique permet de vérifier et de confirmer notamment la fidélité et la justesse de la méthode.

8.6.2 Vérification/Validation d'une méthode qualitative

Dans le cadre d'une technique qualitative, la vérification/validation expérimentale est plus réduite, et s'appuie fortement sur des études de risques (méthode des 5M), sur l'habilitation des opérateurs, ou sur l'étude des performances des Evaluations Externes de la Qualité ou d'un échange inter-laboratoires d'échantillons.

Le laboratoire établit les critères de performance de la méthode utilisée. Il les compare aux limites acceptables dont il dispose (fournisseur, bibliographie, sociétés savantes, ...) et conclut quant à l'acceptabilité de sa méthode en fonction de ses besoins vis-à-vis du critère testé. Toute discordance avec les performances annoncées par le fournisseur ou avec les performances de la précédente méthode sera investiguée.

8.6.2.1 Variabilité inter-opérateurs

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur la vérification de la compétence des opérateurs (habilitation). Des critères objectifs pourront être établis, par exemple, par l'intermédiaire d'une analyse de la robustesse.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS	
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion :



Les recommandations :

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Le laboratoire peut utiliser la variabilité inter-opérateurs (CV) et la comparer à la variabilité intra-opérateur d'un référent. Un rapport proche de 1 montre la concordance obtenue pour n opérateurs (cf. robustesse - §8.6.1.10). La notion de concordance pour des résultats non chiffrés (exemple : présence/absence) tient compte de la prise en charge du patient et l'impact clinique.

Une autre possibilité pour quantifier la variabilité inter-opérateurs est l'analyse de variance appliquée aux résultats obtenus par les n opérateurs (cf. analyse de variance - §11.8).

8.6.2.2 Sensibilité, spécificité analytiques, justesse et fidélité

Les concepts de sensibilité et de spécificité sont utilisés pour les tests dichotomiques (oui/non, positif/négatif, etc.). Les sensibilités/spécificités s'entendent d'un point de vue analytique et ou diagnostiques. Dans les deux cas, la détermination du seuil est cruciale pour séparer les populations. Le laboratoire peut se référer aux données bibliographiques ou établir lui-même les performances pour obtenir le meilleur service médical.

La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif. La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif.

A partir des VP (vrais positifs), FP (faux positifs), VN (vrais négatifs) et FN (faux négatifs), il est possible de calculer une approche de la fidélité et de la justesse d'une méthode, **lorsque le recrutement est suffisant** et qu'une **méthode de référence / diagnostic définitif est disponible** :

$$Fidélité (\%) = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$Justesse (\%) = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \times 100$$

Une méthode qualitative est d'autant plus fidèle et juste que les valeurs obtenues seront proches de 100 lorsqu'elles sont exprimées en %.

En microbiologie, en particulier pour les tests d'identification ou les tests de sensibilité aux antimicrobiens, la notion de concordance est préférable aux notions de sensibilité et de spécificité : concordance au genre et à l'espèce pour les identifications, concordance à la classe de catégorisation sensible à dose standard (S), sensible à forte exposition (I) et une catégorie résistante (R).

Remarque : Il est souvent très difficile pour les laboratoires d'obtenir des échantillons positifs (ou négatifs) en nombre suffisant pour vérifier la spécificité et la sensibilité diagnostique d'une méthode en raison d'un recrutement parfois insuffisant (techniques de RAI, de groupage, de sérologies, dépistage du paludisme, des parasitoses digestives, ...). La vérification bibliographique critique prend donc ici toute son importance.



Exemple en pratique :

La surveillance de la dérive d'une méthode de PCR en temps réel peut être réalisée par le suivi du Ct (nombre de cycles qu'il faut pour atteindre de seuil de détection) d'un contrôle interne à une valeur proche du seuil.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion :

8.6.2.3 Incertitude de mesure

Dans le cas des méthodes qualitatives, Le laboratoire procède à une analyse du processus, afin d'établir les éléments de variabilité du processus. Cette analyse doit être réalisée en prenant en compte l'intégralité du processus analytique. Elle consiste :

- à identifier et inventorier tous les facteurs susceptibles d'influencer le résultat, au même titre que dans le cas des méthodes quantitatives ;
- justifier l'influence jugée non significative de certains facteurs ;
- montrer comment sont maîtrisés les facteurs dont l'influence est significative, de manière à minimiser les risques et les erreurs.

A l'issue de cette analyse, une estimation des principales composantes d'incertitude est conduite ainsi que leur impact sur les résultats. S'il persiste des facteurs d'influence significative ne pouvant être totalement maîtrisés, leur impact sur le résultat doit être évalué et le cas échéant faire l'objet d'une information au prescripteur si elle est importante pour la validité des résultats.

Remarque :

Pour les analyses dont le résultat repose sur la détermination de données quantitatives, l'incertitude de mesure peut être estimée (par exemple sur la base d'échantillons négatifs ou positifs autour d'un seuil).

8.6.2.4 Approche de la limite de détection

Le terme « limite de détection » est utilisé pour décrire la plus petite valeur de mesurande dont une procédure analytique peut indiquer la présence avec un niveau de confiance spécifié. Elle est également appelée « concentration détectable minimale ».

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	LD trouvée ou référence bibliographique

Argumentaire de la conclusion :



8.6.2.5 Comparaison de méthodes

Le laboratoire peut comparer les résultats d'une méthode en cours de vérification, soit à la méthode précédemment utilisée, soit à la méthode automatisée (ex : recherche de sang dans les selles, cytologie urinaire, ...). Il évalue alors l'impact des discordances éventuelles.

Lors de la mise en place d'une nouvelle méthode, le laboratoire peut échanger des échantillons positifs/négatifs avec un autre laboratoire pour vérifier la concordance des résultats obtenus avec la méthode en cours de vérification/validation.

8.6.2.6 Interférences

Le laboratoire effectue *a minima* une étude bibliographique des interférences potentielles décrites dans la notice fournisseur. Des essais de surcharge pourront être réalisés.

8.6.2.7 Contamination

Le laboratoire évalue et maîtrise les potentiels cas de contamination inter-échantillons et/ou inter-réactifs (ex : méthodes de biologie moléculaire).

8.6.2.8 Robustesse

Voir tableau de performance en §8.6.1.10.

8.6.2.9 Intervalle de référence et/ou valeurs seuils

L'intervalle de référence et les seuils de décision médicale sont définis et documentés par le laboratoire, en fonction de l'âge, du sexe, ... et devront être adaptés à l'usage des résultats par les cliniciens en pratique courante. En outre, le laboratoire définit une conduite à tenir en cas de résultats « douteux » (ni positifs, ni négatifs).

Voir tableau de performance en §8.6.1.11.

8.6.2.10 Déclaration d'aptitude

Une conclusion argumentée, à partir des limites acceptables définies au préalable, doit finaliser l'acceptation de la méthode.

Les conséquences des vérifications / validations sur le service médical rendu peuvent y être précisées.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : Autorisée par : Signature

Rappel : Comme pour les méthodes quantitatives, la confirmation des performances de la méthode est nécessaire dans la pratique quotidienne. Pour maîtriser pleinement une méthode, l'utilisation, la gestion et le suivi des contrôles internes de qualité (CIQ) et des évaluations externes de la qualité (EEQ) sont indispensables. Leur exploitation statistique permet de vérifier et de confirmer notamment la fidélité et la justesse (ou exactitude) de la méthode.



9 EXEMPLES DE METHODOLOGIE D'ANALYSES DES RISQUES ET ADAPTATION DU DOSSIER DE VERIFICATION / VALIDATION DE METHODES

*Il est rappelé que cette annexe est constituée d'exemples d'analyses de risques et/ou de dossiers de vérification / validation de méthodes partiels dont pourront s'inspirer les laboratoires. Dans tous les cas, **il appartient aux laboratoires de démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire pleinement aux exigences d'accréditation pour le service médical***

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FÔIE



9.1 Stratégie de vérification / validation de méthode pour la comparaison d'automates lors de l'intégration, changement et déplacement d'automates

Ce chapitre identifie les adaptations possibles et pertinentes du processus de vérification / validation de méthode dans le cas d'intégration, de remplacement ou de déplacement d'automates.

9.1.1 Précisions

Dans cette hypothèse, le laboratoire dispose de données antérieures. L'analyse des risques peut se baser sur le dossier de vérification / validation de méthodes initial et sur le suivi de la méthode.

La maîtrise de la comparaison entre les résultats obtenus avec l'ancienne méthode et ceux obtenus avec la nouvelle est l'objectif principal de cette analyse des risques.

Que compare-t-on ?

- Comparaison de résultats d'examens rendus par les automates d'un plateau technique pour lesquels les examens sont réalisés indifféremment sur un groupe d'automates.
- Comparaison de résultats d'examens rendus par des automates entre différents plateaux techniques indépendants mais pour lesquels un même patient est susceptible d'être pris en charge pour un même examen par les différents plateaux techniques du même laboratoire (antériorités et valeurs de références identiques).
- Sur la base d'une analyse des risques basée sur le service médical rendu, la comparaison des résultats n'est pas toujours nécessaire lorsque les automates sont différents (marques, gammes, modèles, séries différentes) et utilisent des principes de méthodes ou des matrices différentes. Les résultats obtenus des différents automates ne seront pas toujours comparables. Toutefois, le laboratoire doit s'assurer que les résultats sont concordants (même interprétation clinique) et différencier les résultats obtenus sur les comptes rendus (gestion des antériorités, codes analyses, valeurs de référence, information aux prescripteurs, ...) ; Les EBMD entrent le plus souvent dans ce cas de figure.

Comment compare-t-on ?

Il existe plusieurs stratégies de comparaison :

- Une des stratégies peut être de définir un automate référent qui est choisi dans le panel des automates disponibles. Le choix de l'automate référent se fait soit de manière indifférenciée, quand la comparabilité des résultats du groupe d'automates concernés du laboratoire peut être prouvée, soit selon les critères de choix argumenté du laboratoire (exemple : l'automate référent pourrait être celui qui présente le biais de justesse ou d'exactitude le plus faible (Biais, Z-Score ou IET) par rapport au groupe de pairs). Il est aussi possible de choisir l'automate qui traite le plus d'examens ou celui qui, en lien avec la stratégie d'EEQ du laboratoire, bénéficie le plus d'évaluations externes.
- Une autre stratégie pourrait être de les comparer deux à deux (comparaison par couple de chaque automate selon la norme NF ISO 5725-6).
- Une autre stratégie pourrait être la comparaison par groupe d'automates (nombre d'automates > 2)

En fonction des stratégies utilisées, il existe plusieurs tests statistiques disponibles (cf. modalités de comparaison ci-dessous).



9.1.2 Analyse des risques

D'une manière générale, la vérification / validation de méthode et la **stratégie de comparaison** devront donner lieu systématiquement à une **analyse des risques structurée, hiérarchisée et suivie** qui devrait tenir compte des éléments développés ci-dessous :

Etape 1 : Analyse documentaire : valeurs usuelles, standardisation, etc...

Lors de l'intégration d'un nouvel automate dans le laboratoire ou de nouveaux automates, il est essentiel que le biologiste intègre dans l'analyse des risques permettant l'élaboration de son plan d'expérience conduisant à la vérification / validation des méthodes, les données du fournisseur et notamment les données issues du ou des dossier(s) de qualification réalisé(e)s par ce dernier. En effet, le fournisseur doit produire un rapport contenant les résultats des tests effectués au laboratoire permettant de valider le bon fonctionnement de chaque analyseur (tests de répétabilité sur les tests les plus sensibles...). La qualification est indispensable avant que le biologiste ne commence les dossiers de vérification / validation de méthodes, qui sont, eux de sa responsabilité. Lors d'un déplacement d'automate, il est recommandé que le laboratoire contacte le fournisseur pour évaluer l'impact du déplacement avec lui.

Etape 2 : Le choix des examens

Analyse des risques : qu'est ce qui a changé ? - Se focaliser sur ce qui est modifié (cf. Exemples dans le tableau au §9.1.3)

En initial, de manière générale, tous les paramètres sont évalués, sauf cas particuliers argumentés (par exemple allergie, ...).

Dans le cadre d'un déménagement d'automate, Il est possible de choisir tous les paramètres ou de choisir un ou plusieurs paramètres représentatifs (sentinelles) en particulier.

Dans le cadre d'une comparaison d'automates, si le laboratoire choisit de limiter les paramètres à explorer il s'assure que les examens choisis sont représentatifs de : l'ensemble des systèmes de pipetage (mono et multi réactifs), des températures d'incubation utilisées, des systèmes de mesure (par exemple différentes longueurs d'ondes utilisées pour les lectures) et des principes réactionnels. Pour des caractéristiques équivalentes le choix entres paramètres prendra en compte également la criticité et la fréquence de l'examen.

Dans le suivi au long cours, Il est possible de choisir tous les paramètres ou de choisir un ou plusieurs paramètres représentatifs (sentinelles) en particulier.

Etape 3 : Outils utilisés pour la validation et le suivi

- CIQ

La stratégie est à définir pour le choix des CIQ pour chaque examen.

L'analyse des résultats de CIQ par rapport aux bornes des CIQ (fournisseurs ou tiers) en s'assurant de détecter des dérives et des décalages.

- EEQ ou méthode alternative

Une analyse des résultats d'EEQ par confrontation aux groupes des pairs est réalisée.

S'il n'y a pas d'EEQ, le laboratoire doit mettre en œuvre d'autres moyens afin de démontrer sa performance en matière d'exactitude. (Cf. 9.6.1.4 et Article D.6221-20 code de la santé publique.)

- Moyennes mobiles patients si pertinent et possible (cet outil peut être difficile à utiliser pour les automates en établissements de soins)



Etape 4 : Critères de performances (exemples dans le tableau au §9.1.3)

Le laboratoire pourra choisir un ou plusieurs critères de performances : performances analytiques (répétabilité/reproductibilité, nombre de points de CIQ rejetés, efforts de calibration, robustesse du paramètre (sigma), interférences, contaminations etc....) selon leur disponibilité et leur facilité d'obtention notamment si l'équipement bénéficie d'un logiciel dédié aux contrôles qualité.

Etape 5 : Modalités de comparaison en initial

- **Matériels** : CIQ, EEQ, échantillons patients, échantillons surchargés ...
- **Paramètres** : en initial, de manière générale, tous les paramètres sont évalués, sauf cas particuliers argumentés (par exemple allergie, ...)
- **Le nombre et les niveaux d'échantillons** : Une réflexion doit être initiée pour que le laboratoire s'assure de couvrir la gamme de mesures, lorsque nécessaire, pertinent et possible. D'autres facteurs sont notamment pris en considération :
 - Les linéarités haute et basse qui sont fixées (bridées) par le logiciel de l'instrument,
 - Les volumes d'échantillon disponibles (LCR, pédiatrie),
 - La conservation des échantillons (Gaz du sang),
 - La variété **et le nombre d'échantillons** disponibles selon le recrutement et la patientèle (âge, sexe, pathologie, ...),
 - **Les valeurs des ratio signal /seuil pour** les techniques semi quantitatives avec un cutt-off, type sérologie **ou les valeurs proches des seuils de décision clinique,**
 - Analyse critique en termes de suivi cinétique **pour les examens**, type marqueurs, séroconversion, ...
 - Etc...
- **Les outils statistiques** : la comparaison de méthode ou de système analytique a pour but de permettre l'interprétation et la prestation de conseil pour le diagnostic, et le suivi des patients.

En fonction des différentes situations (circonstances, comparaison en initial ou en phase de suivi), les méthodes statistiques à privilégier sont différentes. Le tableau ci-dessous reprend quelques **exemples non exhaustifs** :



Circonstance	Eléments à comparer	Précaution	Tests statistiques
Nouvelle méthode introduite au laboratoire	Résultat patients et EEQ passés en double sur ancienne et nouvelle méthode.	Valeur couvrant (si possible) la gamme de mesure	Diagramme des différences / des rapports / de BLAND ALTMAN Régression linéaire (et non corrélation)
Phase de suivi - même méthode utilisée sur 2 équipements ; Méthode récente sur un des équipements Echantillons : n < 30	CIQ, Comparaison de moyenne par niveaux de contrôles.	Distribution normale à vérifier* Variances non différentes	Comparaison des moyennes / Test t de Student Après Comparaison des variances / Test f de Snedecor ou Fisher-Snedecor ? Si n trop petit ou normalité non vérifiée tests non paramétriques : test de Wilcoxon
Phase de suivi et en initial - même méthode même équipement selon un facteur d'influence (Ex Pneumatique) ; Echantillons : n < 30	Série appariée de résultat patients : étude des différences	Valeur couvrant (si possible) la gamme de mesure ; Distribution normale des différences à vérifier *	Test t des différences
Phase de suivi - même méthode utilisée sur 2 équipements ; Méthode éprouvée (analyse de tendance à long terme) Echantillons : n ≥ 30	CIQ, Comparaison de moyenne par niveaux de contrôles ou de patients.	Si n ≥ 30 l'hypothèse de normalité n'est plus nécessaire	Comparaison des moyennes / test t de Student OU Comparaison de la différence aux limites de suivi norme ISO 5725-6 :1994 : 2.8 écart-type du CV de reproductibilité consolidé (a minima le CV le plus péjoratif, CV90 ou CV50, CV élargi...)
Phase de suivi - même méthode utilisée sur plus de 2 équipements ; Méthode éprouvée (analyse de tendance à long terme) Echantillons : n ≥ 30	CIQ, Comparaison de moyenne par niveaux de contrôles ou de patients	Si n ≥ 30 l'hypothèse de normalité n'est plus nécessaire	Analyse des variances par niveau de CIQ Comparaison au f de la variable de Fischer-Snedecor
Phase de suivi - même méthode utilisée sur plus de 2 équipements ; Méthode éprouvée.	EEQ, résultats patients à contrôler Moyenne de CIQ par niveaux	Distribution normale à vérifier* sauf si n ≥ 30 Le facteur d'étendue est fonction du nombre d'analyseur, il doit être capé pour interprétation médicalement justifiée.	Comparaison de la différence aux limites de suivi norme ISO 5725-6 :1994 Différence exprimée par n automates : Vmax-Vmin 1) à la première étape, on compare la différence obtenue au 2,8 SD du CV de reproductibilité consolidé 2) si première étape n'est pas validée, on utilise le facteur d'élargissement du tableau de la Norme 5725 à la place du 2,8. Par exemple pour 4 systèmes comparés le facteur d'élargissement est à 3,6 alors Vmax- Vmin inf ou égale à 3, 6- x SD (Cf. Tableau 1 – Facteurs d'étendue critique) 3) Troisième étape, si l'étape 2 montre un résultat supérieur au facteur d'élargissement x SD, rechercher l'impact clinique (TCL, RCV ETa etc)

*Pour vérifier la distribution normale le laboratoire peut utiliser l'aspect des histogrammes ou des tests tel que le coefficient d'aplatissement ou le coefficient d'asymétrie facilement accessible sur Excel.



Etape 6 : Modalités de comparaison en continu (confirmation au long cours) et indicateurs de suivi

- **Matériels** : CIQ, EEQ, échantillons patients, échantillons surchargés
- **Paramètres** : en fonction de l'analyse des risques, dans le suivi au long court, Il est possible de choisir tous les paramètres ou de choisir un ou plusieurs paramètres représentatifs (sentinelles) en particulier : criticité clinique, robustesse des méthodes, représentativités des techniques analytiques (cf. Tableaux d'exemples ci-dessous)
- **Outils statistiques** : (cf. tableau ci-dessus de l'étape 5). La mise en œuvre d'un suivi continu de la comparabilité pourra être réalisé de différentes manières ou de plusieurs manières complémentaires :
 - Comparaison de point à point par couple de systèmes (Norme 5725-6 §4.1.2)
 - Comparaison de n systèmes (5725-6 §5.2)
 - Comparaison de 2 moyennes de CIQ
 - Comparaison du nombre de points de CIQ "rejetés" ou repassés
 - Comparaison des résultats de justesse (CIQ) et d'exactitude (EEQ)
 - Comparaison de résultats de patients

Le choix d'une méthode ou de la combinaison de plusieurs méthodes dépend des moyens dont dispose le laboratoire et de la puissance statistique de chaque méthode.

En cas de différence analytique significative, l'absence de différence cliniquement significative doit être mise en évidence à l'aide d'un critère sélectionné, par exemple, conformément à la hiérarchie de la conférence de consensus de Milan (2014) :

- 1- Approche clinique
- 2- Approche variation biologique (RICOS, EFLM biological variation database)
- 3- Approche état de l'art qui répertorie les performances actuelles des automates.

- **Autres indicateurs de suivi**
 - les analyses rétrospectives de la fréquence des études d'impact avec impacts cliniques significatifs,
 - la détection des tendances,
 - le monitoring des performances en lien avec l'évolution des besoins des usagers...

La comparabilité en continu s'inscrit également dans le cadre du suivi des indicateurs. La fréquence du suivi des comparabilités repose sur une argumentation documentée. Sa mise en œuvre régulière est en adéquation avec la pertinence clinique et avec le risque sur les résultats pour le patient.

Une dérive peut amener à remettre en cause l'analyse des risques et à prendre les mesures efficaces pouvant conduire à la révision du DVM.



Tableau 1 extrait du §5.2.2.1 de la norme NF ISO 5725-6:1994

Tableau 1 — Facteurs d'étendue critique, $f(n)$

n	$f(n)$	n	$f(n)$
2	2,8	25	5,2
3	3,3	26	5,2
4	3,6	27	5,2
5	3,9	28	5,3
6	4,0	29	5,3
7	4,2	30	5,3
8	4,3	31	5,3
9	4,4	32	5,3
10	4,5	33	5,4
11	4,6	34	5,4
12	4,6	35	5,4
13	4,7	36	5,4
14	4,7	37	5,4
15	4,8	38	5,5
16	4,8	39	5,5
17	4,9	40	5,5
18	4,9	45	5,6
19	5,0	50	5,6
20	5,0	60	5,8
21	5,0	70	5,9
22	5,1	80	5,9
23	5,1	90	6,0
24	5,1	100	6,1

NOTE — Le facteur d'étendue critique $f(n)$, est le fractile 95 % de la distribution de $(x_{\max} - x_{\min})/\sigma$ où x_{\max} et x_{\min} sont les valeurs extrêmes dans un échantillon de taille n d'une distribution normale d'écart-type σ .

Note 1 : Les critères de comparaisons analytiques basés sur l'utilisation de l'écart type ou le CV nécessitent une attention particulière car plus l'écart type choisi est faible plus l'hypothèse d'absence de différence significative est difficile à obtenir. L'utilisation d'un critère trop restrictif ou peu adapté pourrait conduire à un nombre important de "fausses" alertes sans pertinence significative.

On peut par exemple utiliser un CV long terme ou un CV 90 (CV au 90ième percentile d'un groupe de pairs).

Note 2 : Moyens pour détecter et suivre les performances analytiques : Comparaison des performances analytiques des analytes (par exemples : CV, biais, Eta Erreur Totale admissible, Sigma, incertitude, fréquence de calibration.)





Les objectifs de performance retenus par le laboratoire devraient être cohérents par rapport aux besoins du clinicien afin de garantir une prise en charge adaptée du patient dans le contexte. Des approches basées sur l'erreur Totale admissible, le RCV (référence change value), le TCL (Total change Limit) ou d'autres peuvent être choisies en fonction des cas de figure et de leur pertinence.

Note 3 : Exemple simple de suivi de la comparabilité de plusieurs automates.

Cette méthode simple est basée sur les CIQ en mettant en place (carte de contrôle ou logiciel) des limites acceptables communes aux différents analyseurs qui réalisent l'examen.

Etape 1 :

- **Détermination des limites acceptables** : la différence entre les valeurs des points de CQI de deux systèmes pour un examen ne doit pas dépasser 2,8 SD obtenus à l'aide d'un CV consolidé.
- La valeur maximale – la valeur minimale est inférieure à $2,8 \times SD$ (NF ISO 5725-6:1994) (cette valeur ne pourra en aucun cas dépasser les limites de concordance clinique telle que l'Erreur totale admissible, TCL, RCV etc...).
- **Mise en place** sur la carte de contrôle ou au niveau du logiciel de suivi des CQ de la moyenne et des limites basses et hautes des CQI.
- **Point de vigilance** : Naturellement l'écart type choisi doit être adapté au suivi des performances analytiques sans mettre en péril la capacité de détection de tendance. Par exemple si les points de CQ évoluent constamment au-delà de 1 écart type de l'objectif commun.
- **Sécurité** : Lorsqu'une confrontation aux groupes des pairs est disponible, il est recommandé de confirmer ces valeurs avec celles du groupe des pairs (moyenne sensiblement identiques, Ratio des CV inf à 1,5 par exemple et z-score)

Si le suivi de la comparabilité se fait sur plus de 2 systèmes réalisant un même examen, un **facteur d'élargissement** pourra être utilisé en seconde intention (NF ISO 5725-6:1994 CH 5.2.2.1 tableau 1)

Extrait :

Pour 3 systèmes : 3,3

Au niveau des valeurs de CQI, la différence $V_{max} - V_{min}$ est donc significative si elle dépasse $3,3 \times$ écart-type du CV de fidélité intermédiaire réel.

Pour 4 systèmes 3,6

Pour 5 systèmes 3,9

Pour 6 systèmes 4,0 et pour 7 systèmes 4,2 etc.

La même vigilance est à apporter au calcul de cette valeur limite, en veillant à ce que cet objectif soit inférieur à l'indicateur d'impact clinique potentiel. Par **exemple** en se limitant aux bornes du fournisseur du CQI.

Etape 2 :

- **La fréquence de suivi** de la comparabilité des résultats patients réalisés sur plusieurs systèmes analytiques est conditionnée par la criticité biologique du paramètre, de sa « capacité » ou robustesse et les contextes particuliers.



- **Le suivi peut ensuite se faire directement sur le Levey-Jennings :**
L'ensemble des points de CQI évoluent à l'intérieur de ces limites et aucune moyenne n'évolue au-delà de 1 écart-type.

Exemple conforme :



Etape 3 : Utilisation de la stratégie du consensus de Milan en cas de dépassement pour la recherche de l'étude d'impact clinique appliquée aux dossiers patients concernés.



9.1.3 Stratégies de comparaison lors de l'intégration/changement de nouveaux automates et de déplacement avec démontage ou impact technique

	Intégration/changement de nouveaux automates (*) <i>Exemple : ajout d'un nouvel automate au sein d'un parc d'automates pré-existant</i>	Déplacement avec démontage ou impact technique prévisible (*) <i>Exemples : déplacement d'automate nécessitant un démontage ou déplacement considéré comme critique à confirmer avec le fournisseur</i>	Déplacement sans impact technique (*) <i>Exemples : déplacement d'automates pour EBMD ou déplacement sur roulettes</i>
Etape 1 Analyse documentaire	Analyse des données bibliographiques et données fournisseurs , notamment les différents systèmes de pipetage, de mesure, les différents types de techniques mise en œuvre, la criticité médicale des paramètres et les performances ... Comprendre l'approche des fournisseurs pour la détermination des cut off pour les techniques avec ou sans zone grise (sérologie, biologie moléculaire) Gestion du changement à réaliser dans tous les cas		
Etape 2 Choix des examens	En validation initiale : tous les paramètres En validation au long cours : sur tous les paramètres ou sur un échantillonnage représentatif établi par une analyse des risques	Tous les paramètres font l'objet d'une analyse des risques, sur tous les paramètres ou sur un échantillonnage représentatif établi par l'analyse des risques	Du fait des connaissances antérieures acquises quant aux performances du (des) automate(s), les essais peuvent être réalisés sur un échantillon représentatif de paramètres établi sur la base d'une analyse des risques (exemple un paramètre par module et par méthode, paramètres les plus critiques, ...). En validation au long cours : sur tous les paramètres ou sur un échantillonnage représentatif établi par une analyse des risques
Etape 3 Outils utilisés	Cf. les étapes 3 et 5 de l'analyse des risques ci-dessus.		



Guide Technique d'Accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes de Biologie médicale

<p>Etape 4 Critères de performances</p>	<p>Avant mise en production :</p> <ul style="list-style-type: none">- Répétabilité (n=10 à 30 sur 2-3 niveaux disponibles, le nombre de répétition à réaliser sera fonction de l'activité du laboratoire) sauf pour les paramètres dont les données de répétabilité ont été recueillies dans le dossier de qualification par le fournisseur si disponibles- Reproductibilité : n=15 au minimum, 2 à 3 niveaux selon analyse des risques (volume, coût, conditionnement du réactif ...)- Incertitude de mesure : méthode CQI/EEQ ou CQI /étalon lorsque ces données sont disponibles (alternative de première intention), ou à défaut une estimation de l'intervalle de confiance (2 x ET de reproductibilité)- Si pertinent : contamination, limites de détection, de quantification et limite supérieure de linéarité, interférences, ... : selon analyse des risques	<p>Avant mise en production :</p> <ul style="list-style-type: none">- Répétabilité (n=10 à 30 sur 2-3 niveaux disponibles, le nombre de répétition à réaliser sera fonction de l'activité du laboratoire)- Reproductibilité : n=15 au minimum, 2 à 3 niveaux selon analyse des risques (volume, coût, conditionnement du réactif, délai ...)- Autres critères de performance connus et définis avant déplacement ne seront pas à refaire avant mise en production	<p>Avant mise en production :</p> <ul style="list-style-type: none">- Répétabilité par le fournisseur ou le laboratoire (n=10 à 30 sur 2-3 niveaux disponibles, le nombre de répétition à réaliser sera fonction de l'activité du laboratoire). <p>Le laboratoire devrait demander au fournisseur les tests de qualification.</p>
<p>Etape 5 Modalités de comparaison en initial</p>	<p>*Comparaison sur la base d'échantillons patients / CIQ / EEQ / autres (n =30 dans la mesure du possible, sinon argumenter le nombre de comparaisons réalisées) avec résultats de l'automate référent ou autre stratégie de comparaison (voir chapitre spécifique : étape 5 de l'analyse des risques)</p>	<p>Comparaison de méthode : nombre représentatif d'échantillons couvrant la gamme de mesures, résultats avant déménagement/après déménagement sur la base d'échantillons patients / CIQ / EEQ</p>	<p>Comparaison de méthode si nécessaire selon l'analyse des risques : nombre représentatif d'échantillons couvrant la gamme de mesures, résultats avant déménagement/après déménagement sur la base d'échantillons patients / CIQ / EEQ</p>
<p>Etape 6 Comparaison en continue Et Suivi de performances</p>	<p>Comparaison des performances analytiques à long terme comme :</p> <ul style="list-style-type: none">Paramètres statistiques de suivi des EEQ (Inexactitude)JustesseCalcul des incertitudes de mesureComparaison des CVComparaison des "moyennes patients mobiles", si pertinentComparaison du nombre de calibrations, du nombre de points de CQ rejetés (DPMO) ... (Cf chapitre étape 6 analyse des risques)		

(* **Dans l'urgence**, lors d'un échange standard d'automate (remplacement par un automate identique en tout point) ou lors d'un déplacement d'automate, les étapes 2 et 4 peuvent être décalées dans le temps, en choisissant selon une analyse des risques pertinente (basée sur l'expérience) les paramètres et critères de performances à valider en premier intention : choix des paramètres sentinelle et sensibles, critères de performances les plus critiques (répétabilité et comparaison sur des paramètres les plus sensibles et/ou les plus critiques...)



9.2 Cas d'une vérification/validation d'une méthode intégrant une matrice rare

9.2.1 Principe

Le principe est de commencer par une analyse de l'impact de cette matrice « rare » par rapport à la matrice qui a fait l'objet de la vérification initiale.

Si les caractéristiques physico-chimiques ou autres (viscosité, pH...) de cette matrice n'influencent pas directement le principe de méthode et que la gamme de mesure est comparable, il n'est pas utile de refaire de manière exhaustive le dossier expérimental.

Le laboratoire est alors amené à réaliser les vérifications adaptées pour compléter la vérification initiale. Par exemple, le laboratoire effectue un test de répétabilité et compare la performance de cette répétabilité aux résultats obtenus au moment de la vérification initiale. En l'absence de différence significative, les liquides sont considérés comme comparables.

Dans le cas des matrices dont la rareté ne permet pas d'effectuer la totalité des vérifications, le laboratoire peut choisir de compléter son dossier de vérification au fur et à mesure du déroulement de son activité.

Il s'agit par exemple :

- d'une étude des interférences qui est réalisée à l'occasion de certains prélèvements particulièrement chyleux ou hémolysés,
- d'une étude de la contamination qui est réalisée à l'occasion de l'obtention de certains spécimens aux concentrations particulièrement élevées.

Sans changement du principe de méthode (points de calibration, prise d'essai, ...) le laboratoire revendique une portée identique à celle de la vérification / validation initiale.

Si le laboratoire est amené à faire une préparation du prélèvement pour que les caractéristiques de la matrice soient équivalentes à celles de la matrice validée précédemment, le laboratoire réalise les vérifications appropriées de sa méthode de préparation. C'est le cas par exemple d'une dilution de liquide de ponction, d'une extraction d'acide nucléique ou d'une fluidification d'expectoration.

Une vérification préalable du prétraitement devrait être réalisée, par exemple en utilisant des échantillons de concentration connus enrichis avec l'additif, ainsi qu'une surveillance particulière continue de manière à objectiver l'absence d'influence du pré-traitement sur l'étape de mesure.

Comme ces préparations ne constituent pas à elles seules une méthode, qu'elles ne sont pas spécifiques d'une famille et qu'elles ne fournissent pas de résultats, elles n'impliquent pas systématiquement le passage d'une portée flexible standard (portée A) en portée flexible étendue (portée B).

Toutefois, le laboratoire met en place les dispositions adaptées pour que la possibilité de préparer ces spécimens soit intégrée dans le cadre de la gestion de la portée, par exemple dans la procédure de validation/vérification des méthodes.

9.2.2 Exemples de matrices rares

- 1) Examen quantitatif : dosage des protéines dans le liquide ascite
- 2) Examen qualitatif : estimation des cellules et recherche et identification des cristaux dans le liquide articulaire.

- **Liquide céphalo-rachidien :**

Même viscosité que les urines, concentrations attendues du même ordre de grandeur que dans les urines. Des CIQ sont disponibles.



- **Liquide amniotique :**

Il a même viscosité que les urines, les concentrations attendues sont fonction des paramètres à doser. La stratégie de CIQ est à argumenter en fonction des concentrations attendues des mesurandes.

- **Liquides de dialyses :**

Si les caractéristiques physico-chimiques des liquides de dialyse se rapprochent de l'urine, les valeurs recherchées sont proches de celles du sang. Par conséquent, il est légitime de comparer les critères de performance (CV) obtenus sur liquides de dialyse avec ceux obtenus dans le sang.

- **Liquide d'ascite, pleural ou péricardique :**

Ces liquides ont les mêmes caractéristiques que le sang.

- **Liquides articulaires :**

Compte tenu de la viscosité importante de ce liquide par rapport au sérum, l'impact sur le pipetage devrait être maîtrisé. La répétabilité permet d'estimer l'impact de la viscosité. Les concentrations (glucose, protéines, acide urique) sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans une matrice sanguine.

- **Liquide péritonéal :**

La viscosité se rapproche de celle des urines. Le laboratoire vérifie si les concentrations mesurées sont de l'ordre de celles mesurées dans le sang (ce qui n'est pas le cas d'un liquide de dialyse ou d'ascite).

L'absence d'impact de la viscosité est vérifiée à l'aide d'une répétabilité dès lors que les critères de vérification de méthode sont proches de celles constatées dans le sérum.

- **Liquide de kyste :**

La viscosité semble un élément qui impacte significativement la prise d'essai. Les concentrations (amylase par exemple) sont parfois en dehors des limites de linéarité. La vérification devrait être particulièrement soignée au regard de ces risques.

9.2.3 Exemples de moyens pour vérifier/valider une méthode intégrant une matrice rare

- **3 moyens non spécifiques :**

Rappel : dans le cas où une étape de préparation de l'échantillon est nécessaire, la vérification couvre l'étape de préparation de l'échantillon.

- « **Approche par dilution** » : afin de vérifier l'absence d'effet matrice (par exemple pour valider des matrices riches en inhibiteurs, sur une matrice rare contenant naturellement l'analyte à mesurer) - Procéder par dilutions successives d'un échantillon avec une autre matrice, typiquement celle pour laquelle la méthode est déjà validée et dont l'effet matrice est absent. L'objectif étant de faire progressivement tendre la composition de la nouvelle matrice vers celle de la matrice documentée. Après dosage des échantillons dilués, en tenant compte du facteur de dilution et après vérification de l'effet de la dilution



(par exemple dilution au $\frac{1}{2}$ = résultat au $\frac{1}{2}$), en traçant la fonction reliant la concentration mesurée à la concentration théorique doit être une droite de pente 1 (0,8 à 1,2). Cette approche est toutefois limitée par la sensibilité de la méthode à valider et est conditionnée par une différence de concentration de l'analyte entre l'échantillon de la matrice à valider et l'échantillon servant de diluant.

- « **Méthode des ajouts** » : Procéder par ajout successifs, sur une matrice vierge de l'analyte à mesurer d'étalon de concentration connue et vérifier que l'on retrouve la concentration attendue avec une différence acceptable (biais défini avec matrice de référence).
 - « **Méthode par étalon interne** » (utilisable notamment en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse où l'étalon interne est un analogue deutéré au comportement chromatographique identique à l'analyte) » : Procéder par ajout successifs, dans la matrice à étudier, de concentration connue d'étalon interne et vérifier que l'on retrouve la concentration attendue avec une différence acceptable par rapport à la matrice de référence. La limite conventionnelle de recouvrement est de +/- 20%.
- **Techniques de pharmacologie et de toxicologie :**

En dehors des méthodes citées plus haut, d'autres méthodes peuvent être utilisées durant la phase de développement de la méthode de dosage :

- **Méthode par infusion post colonne** (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) : Cette approche consiste à infuser en continu l'analyte en parallèle de l'analyse chromatographique d'une matrice vierge extraite. Cette méthode permet de visualiser sur le chromatogramme une baisse ou une augmentation de la « ligne de base » qui indique une suppression ou une augmentation de l'ionisation de l'analyse en raison de la présence d'interférents co-élus. L'objectif est de vérifier que les modifications de la ligne de base ne se trouvent pas à proximité du temps de rétention de la molécule à doser. Cette méthode permet en outre d'apporter les modifications appropriées à la méthode chromatographique pour limiter l'influence de l'effet matrice.
- **Méthode par dopage post extraction** : Méthode consistant à comparer la mesure des concentrations d'un échantillon de la matrice vierge à étudier dopée après la phase d'extraction avec une référence (un solvant de comportement neutre également dopé).
- **Un exemple plus détaillé sur le calcul des rendements d'extraction, effets matrices et performances du processus d'extraction est développé ci-après au §9.2.5**



9.2.4 Extrait d'un DVM

Extrait de description de la méthode

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Chimie : AMYLAS AU CT GLU LDH PT TG Urée FR Marqueurs tumoraux : ACE AFP CA125 CA 153 CA199 PSA
Principe de la Méthode :	Technique sur automate R
Type d'échantillon primaire :	Liquide articulaire + pleural + ascite
Type de récipient, additifs :	Aucun additif
Prétraitement de l'échantillon :	Traitement en cas de liquide visqueux : Hyaluronidase poudre : <ul style="list-style-type: none">- Référence H3884 fournisseur- A conserver à -20°C Prétraitement pour la viscosité : <ul style="list-style-type: none">- Recueillir le liquide dans un tube à hémolyse- Mettre une « pointe » de poudre- Laisser agir pendant 30 minutes sous agitation- Centrifuger 10 min à 2000 tours/min
Unités :	Identique à celles du sang
Critères d'interprétation :	Données bibliographiques (notamment d'après Grancher et al. Editions BioMérieux 2006)
Marquage CE (Oui/Non)	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	/
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Analyseur 1, Analyseur 2 et Analyseur 3
Référence du réactif :	Idem sang
Matériau d'étalonnage (références) :	Idem sang
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Idem sang

Explication du lien de la matrice rare avec la matrice habituelle

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :

LIQUIDES DE PONCTION

La matrice des LIQUIDES (articulaire, ascite et pleural) n'est pas reconnue par le fournisseur ROCHE ; la validation de méthode reste néanmoins en portée A (comme le SANG) car le laboratoire s'est assuré de la même couleur, même viscosité et même pH que le sang :

- pour la couleur : pas ou peu de différence avec le sang
- pour la viscosité : un pré-traitement pour les liquides visqueux est réalisé à l'aide de HYALURONIDASE (cf chapitre "DESCRIPTION DE LA METHODE")
- pour le pH : il est sensiblement le même que le sang (1 à 2 de différence maximum) et le pré-traitement par la HYALURONIDASE n'influence pas ou peu le pH



Extrait d'un exemple de répétabilité pour des paramètres de biochimie

	Glucose			LDH			Protéines		
	Liquide Articul. Glucose	Liquide Ascite Glucose	Liquide Pleural Glucose	Liquide Articul. LDH	Liquide Ascite LDH	Liquide Pleural LDH	Liquide Articul. Protéine	Liquide Ascite Protéine	Liquide Pleural Protéine
N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Moyenne	1,78	1,22	0,82	294,27	4069,73	786,73	43,56	50,59	42,41
CV calculé	0,6	0,7	0,7	0,5	2,3	0,4	0,5	0,5	0,6
Critère EFLM	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9	2,3	2,3	2,3
Acceptation	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

La répétabilité des paramètres biochimiques et marqueurs tumoraux dans les liquides (articulaire, ascite et pleural) est inférieure aux données de la EFLM pour le sang.

Extrait d'un exemple d'effet matrice (méthode de dilution pour les protides)

PROT [g/l]	CV _{repro} automate	Cw EFLM	Différence significative			
	1,65	2,8	9			
	Sang 1 Pour mélange	Liq. Articulaire	Sang 2 Pour mélange	Liq. Ascite	Sang 3 Pour mélange	Liq. Pleural
Dosage Pur		46,1		50,2		42,4
Mélange Sang + Liq	74,5	61,2	74,7	62,3	72,4	57,8
% effet		1%		0%		1%
Conclusion		Pas d'effet matrice		Pas d'effet matrice		Pas d'effet matrice

Les performances des dosages de protides dans le liquide articulaire, le liquide d'ascite et le liquide pleural sont comparables à celles du sang. Aucun effet de matrice n'est retrouvé pour les protides dans ces matrices.

Exemple d'incertitudes de mesure

Dans le cas du dosage des protides, les performances d'incertitude de mesure sont assimilées à celles du sang car les domaines de mesure sont équivalents (cf. rapport de chaque paramètre dans le sang).

9.2.5 Guide pour le calcul des rendements d'extraction, effets matrices et performances du processus d'extraction.

3 préparations différentes sont à réaliser (le volume final doit être identique)

- A : Dopage des molécules d'intérêt et des étalons internes dans la phase mobile (si possible).
- B : Extraction de la matrice puis dopage des molécules d'intérêt et des étalons internes.
- C : Dopage des molécules d'intérêt et des étalons internes dans la matrice puis extraction.

Pour l'estimation finale, chaque série est réalisée au moins 5 fois, plusieurs quantités sont habituellement testés (idéalement faibles, moyennes et fortes). Les séries sont à reproduire en condition de répétabilité ou de fidélité intermédiaire en fonction de la robustesse *a priori* de la méthode.



Le rapport S_B/S_A = effet matrice

Le rapport S_o/S_B = rendement d'extraction

Le rapport S_C/S_a = performance du processus (parfois estimé à l'aide des deux précédents calculs)

Les signaux S à utiliser sont souvent les aires chromatographiques des molécules d'intérêts A_m pour des rapports non normalisés ou les réponses instrumentales (A_m/A_{EI}) pour calculer les rapports normalisés.

Si l'étalon interne est un analogue isotopique, il est inutile de calculer ses rapports propres. S'il ne s'agit pas d'un analogue isotopique, il peut être utile de les étudier pour choisir le meilleur candidat étalon interne.

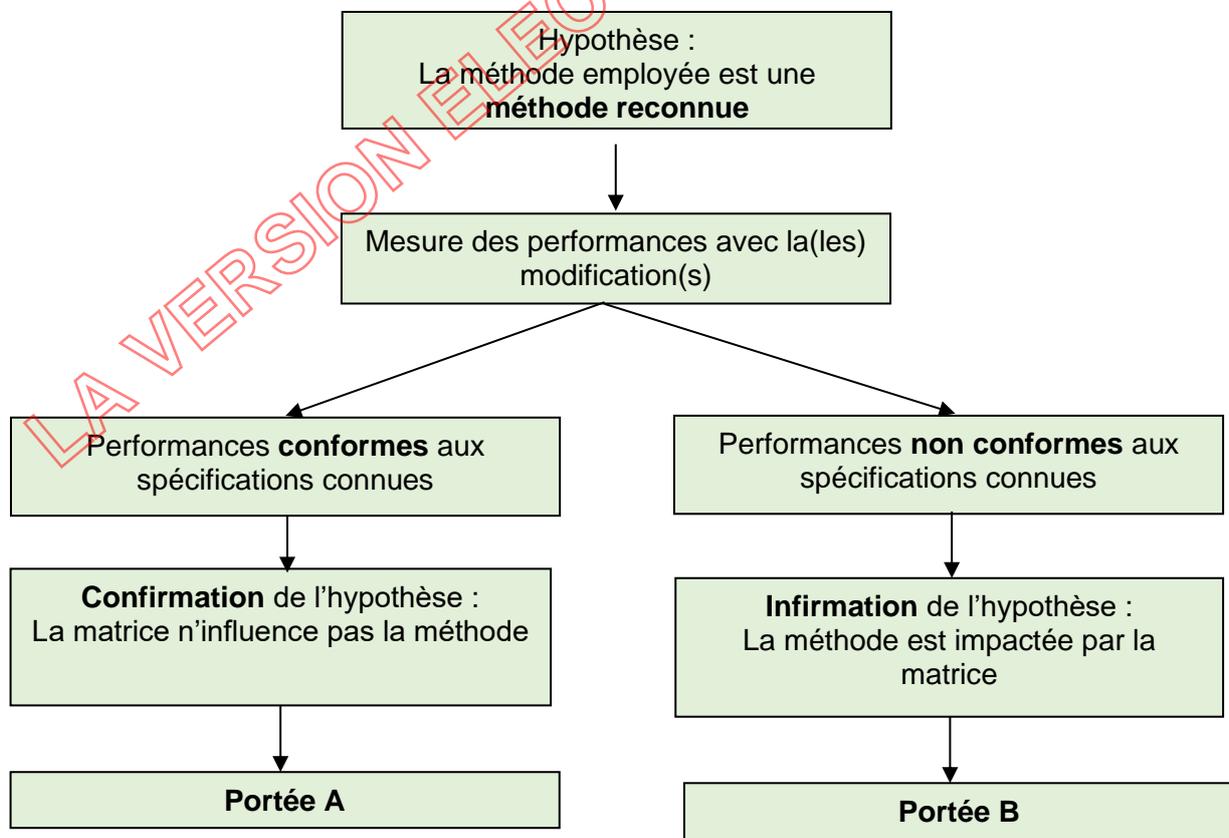
9.3 Cas d'une modification de méthode (non liée à l'étape de mesure ou relative au matériel) pouvant impacter l'étape de mesure.

Dans le cadre des modifications non liées à l'étape de mesure et celles relatives au matériel annexe (cf. SH REF 08), des réflexions sont à mener pour déterminer si la modification impacte ou pas la phase analytique et donc la nature de la portée flexible (A ou B) qui s'applique.

Dans un premier temps, le laboratoire établit une analyse des risques liée à cette modification. Cette analyse aboutit à la détermination des moyens appropriés à mettre en place afin de maîtriser ce changement.

Dans un second temps, il met en œuvre les moyens appropriés qui reposent sur des essais et/ou une approche bibliographique.

Si, à l'issue de la mise en place de ces moyens, le laboratoire met en évidence un impact sur l'étape de mesure, la modification est alors considérée comme une adaptation de la méthode et le laboratoire se doit de revendiquer une portée B (cf. logigramme ci-dessous).





9.3.1 Exemple d'une analyse des risques pour un automate sans réactif dédié

Rappel : selon le règlement européen 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, **le laboratoire doit justifier de la mise en service d'un dispositif modifié.** Il doit justifier dans sa documentation que les besoins spécifiques du groupe cible de patients ne peuvent pas être satisfaits ou ne peuvent pas être satisfaits ou ne peuvent l'être au niveau de performances approprié par un dispositif équivalent disponible sur le marché.

La première étape consiste à déterminer les moyens à mettre en œuvre pour maîtriser le changement de réactif.

Description du contexte de l'exemple choisi	<p>Examen : Dosage du Méthotrexate</p> <p>Description de l'adaptation ou du développement entrepris : Méthode utilisant un couple automate / réactif de deux fournisseurs différents.</p> <p>Justification de l'adaptation ou du développement entrepris : Le fournisseur n'ayant pas commercialisé de réactif, il préconise l'utilisation de réactifs adaptés pour fonctionner sur l'automate. Le réactif est marqué CE et l'automate également. La méthode de lecture des densités optiques réactionnelles est simplement automatisée sur l'automate. Le réactif ne subit aucune transformation et conserve donc toutes ses caractéristiques. L'utilisation à bord de l'automate est paramétrée en fonction des données de la fiche technique du fournisseur de réactif, (conservation, stabilité, ration réactif / échantillon, etc.)</p>		
Analyse des risques liée à ce réactif			
PERSONNEL			
	Risques potentiels	Applicable à l'exemple (Oui/Non), si oui, merci de préciser les raisons	Impact Min / Maj
	Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que le personnel qui élabore et conduit le plan de validation ne dispose pas d'une compétence spécifique et ne soit pas en nombre suffisant est-il avéré ?	non	
	Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que le personnel qui met en œuvre les tests de validation ne dispose pas d'une compétence spécifique et ne soit pas en nombre suffisant est-il avéré ?	non	
	Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que le personnel qui approuve les performances de la méthode ne dispose pas d'une compétence spécifique et ne soit pas en nombre suffisant est-il avéré ?	non	
	Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que le personnel qui met en œuvre la méthode ne dispose pas d'une compétence spécifique et ne soit pas en nombre suffisant est-il avéré ?	non	
PRINCIPE DE MESURE			
	Risques potentiels	Applicable à l'exemple (Oui/Non), si oui, merci de préciser les raisons	Impact Min / Maj
	Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que les performances analytiques et cliniques du principe de mesure soient impactées est-il avéré ?	<p>Oui Tests de précision, de justesse et de corrélation avec la méthode de référence à vérifier in situ – si performances = celles fournisseur, portée A, sinon, portée B (Cf. logogramme plus haut)</p>	Majeur



MATERIEL ET OUTILS (= risques liés aux moyens-ressources matérielles)		
Risques potentiels	Applicable à l'exemple (Oui/Non), si oui, merci de préciser les raisons	Min / Maj
Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que le laboratoire ne dispose pas des ressources matérielles suffisantes pour mener à bien son adaptation ou son développement est-il avéré ? (Ex : accès à la bibliographie, traitement statistique des informations, etc...)	non	
MATIERE (REACTIFS / ECHANTILLONS)		
Risques potentiels	Applicable à l'exemple (Oui/Non), si oui, merci de préciser les raisons	Min / Maj
Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que les performances des réactifs soient impactées est-il avéré ? (Ex : pas d'appui sur fiches techniques, tests incomplets...)	non	
Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que l'emballage du réactif soit incompatible avec le système analytique est-il avéré ?	non	
Dans le cadre du changement proposé dans cet exemple, le risque que la matrice de l'échantillon diminue les performances de la méthode est-il avéré ? (Ex : caractéristiques chimiques, physiques interagissant avec le principe de mesure...)	non	
MILIEU / ENVIRONNEMENT		
Risques potentiels	Applicable à l'exemple (Oui/Non), si oui, merci de préciser les raisons	Min / Maj
Dans le cadre de votre exemple y-a-t-il un risque que l'environnement ne soit pas approprié à l'adaptation ou au développement de la méthode (Exemple : Locaux inadaptés, moyens logistiques liés au management du projet insuffisants, modalités de conservation, préparation des réactifs, et/ou échantillons inadéquates, environnement du traitement des données inapproprié, etc ...)	Oui En cas de requalification post-intervention de l'automate, il faudra vérifier le maintien de l'adéquation des performances du réactif avec l'automate.	Majeur

9.3.2 Extrait de DVM pour un automate sans réactif dédié

9.3.2.1 Vérifications à effectuer

Les vérifications ont été déterminées au regard de l'analyse des risques réalisée préalablement en tenant compte en particulier des risques majeurs identifiés.

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE	
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Dosage du Méthotrexate	
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)	

DESCRIPTION DU PROCESSUS			
	Etapes et éléments à vérifier (argumentation)	Essais A/NA Bibliographie B/NA	Modalités de vérification/validation :
Methotrexate	Précision intra-lot : Répétabilité	A*	<input checked="" type="checkbox"/> Répétabilité
	Précision inter-lots : Fidélité intermédiaire et robustesse seront établies : autant que possible, les calibrations et les lots de réactifs seront modifiés et les maintenances effectuées.	A*	<input checked="" type="checkbox"/> Reproductibilité
	Variabilité inter opérateurs : Technique automatisée déjà vérifiée par ailleurs. Une action manuelle concerne le remplissage des cassettes réactif.	NA	<input type="checkbox"/> Variabilité inter-opérateurs



La variabilité inter-opérateurs est prise en compte dans la fidélité intermédiaire et la maîtrise des risques.		
Justesse ; pas de CQI externalisé	NA	<input type="checkbox"/> Justesse
Exactitude	A	<input checked="" type="checkbox"/> Exactitude
Sensibilité et spécificité analytique : Voir fiche technique	B	<input checked="" type="checkbox"/> Sensibilité et spécificité analytique
L'incertitude de mesure sera évaluée au regard des premiers résultats des EEQ puis revue ultérieurement après avoir obtenu un nombre de résultats d'EEQ suffisant	A	<input checked="" type="checkbox"/> Incertitudes
Etendue de mesure : Voir fiche technique + vérification des alarmes automate si dépassement du domaine de mesure. Dilution automatique recommandée sera vérifiée (cf. préconisations dans la fiche technique).	A B	<input checked="" type="checkbox"/> Etendue de mesure
Comparaison des méthodes : un nombre significatif d'échantillons va permettre de comparer cette méthode avec la méthode de référence	A*	<input checked="" type="checkbox"/> Comparaison de méthodes
Les indices HIL (hémolyse, ictère, lipémie) sont mesurés systématiquement pour chaque échantillon. Aucune spécificité liée à l'utilisation de ce réactif.	NA	<input type="checkbox"/> Interférences
Aucune spécificité liée à l'utilisation de ce réactif.	NA	<input type="checkbox"/> Contamination
Respect des recommandations fournisseur : -Gestion automatisée des stocks -Surveillance des températures de stockage par la centrale de température. -Stabilité des réactifs à bord de l'automate gérée automatiquement.	B	<input checked="" type="checkbox"/> Robustesse et fiabilité des réactifs
Valeurs de références : Voir fiche technique	B	<input checked="" type="checkbox"/> Intervalle de référence
*Risques majeurs issus de l'analyse préalable		

9.3.2.2 Exemple de conclusion

DECLARATION d'APTITUDE
<p>Les performances obtenues avec ce réactif sont satisfaisantes au regard des performances décrites par les sociétés savantes et au regard des méthodes similaires utilisant des couples automates/réactifs dédiés. La portée A est justifiée.</p> <p>Toute modification par rapport aux matériels et méthodes décrites dans ce dossier fait l'objet d'un complément à ce dossier de vérification (par exemple en cas de changement de composition du réactif ou de maintenance majeure sur l'automate).</p> <p>Méthode conforme utilisée à partir du JJ/MM/AAAA Autorisée par : Dr BIO le jj/mm/aaaa</p>

9.4 Stratégie spécifique de validation pour une méthode adaptée

Il est rappelé que les adaptations doivent se faire dans le respect de la réglementation (exigences générales en matière de sécurité et performances fixées dans l'annexe I, article 5.5 du règlement européen 2017/746) ; elles ne sont privilégiées par rapport à l'emploi de DM-DIV marqués CE que si le laboratoire démontre qu'elles sont justifiées par un meilleur service médical.



Approche chronologique

Le laboratoire peut développer une stratégie basée sur un plan de développement de la méthode, caractérisé par l'approche chronologique suivante :

- 1) Privilégier une analyse des risques et documentaire (publications...) préalable toujours dans le contexte d'utilisation clinico-biologique de l'examen ;
- 2) Définir les critères de performance ou dispositions permettant de maîtriser ces risques ;
- 3) Etablir les performances souhaitées pour ces critères ;
- 4) Formaliser le protocole de validation, en veillant bien à ne pas se limiter au seul contenu du SH FORM 43 en fonction de l'analyse des risques et documentaires ;
- 5) Faire les essais ;
- 6) Compléter l'analyse des risques de la méthode en fonction des résultats obtenus des essais de validation.

Tous les paramètres de performances analytiques doivent être appréciés en reflet de l'utilisation réelle de la méthode analytique. En effet, si un niveau de performance requis n'est pas obtenu, le laboratoire en tient compte dans son interprétation et sa prestation de conseil.

9.4.1 Exemple de DVM pour une méthode adaptée

Adaptation du dosage du rétinol plasmatique par chromatographie (laquelle) (BM-BB02) par rapport à la méthode du fournisseur en modifiant la calibration en 1 point versus calibration en 6 points par dilution du calibrant fournisseur dans albumine et dilution au 1/2 systématique des échantillons patients dans albumine.

- 1) Justification de l'adaptation de la méthode au regard des besoins des usagers : Le laboratoire s'appuie sur la bibliographie récente qui indique que la carence en vitamine A correspond à un dosage inférieur à 0,35µg/L et que la quantification d'un surdosage excessif est inutile. Ceci implique d'être performant au seuil et de connaître la limite de quantification.
- 2) Le laboratoire établit les critères de performance :

- 1. Répétabilité
- 2. Fidélité intermédiaire
- 3. Variabilité inter-opérateurs
- 4. Justesse
- 5. Exactitude
- 6. Sensibilité et spécificité analytique
- 7. Limite de quantification

- 8. Incertitudes
- 9. Etendue de mesure
- 10. Comparaison de méthodes
- 11. Interférences
- 12.1. Contamination inter-échantillon
- 12.2. Contamination inter-réactif
- 13.1. Robustesse
- 13.2. Stabilité
- 14. Intervalles de référence
- 15. Discordances



- 3) Les niveaux de performances sont spécifiques et ils sont justifiés.

Exemple : Le critère de performance de reproductibilité est égal à 15% ("15% R.S.D"), issu de Peters FT et al. Validation of new methods. Forensic Science International 165 (2007) 216–224) car le CVw et CVg RICOS ont été déterminés chez des patients sains, après analyse des publications.

- 4) Le protocole est mis en œuvre, y compris sur l'étendue de mesure :

Exemple :

ETENDUE DE MESURE	
Limite supérieure de linéarité	<p>Application de Peters FT et al. Validation of new methods. Forensic Science International 165 (2007) 216–224 et des recommandations du SH GTA 04 rev 01:</p> <p>* "Lower limit of quantification" pour la limite de quantification: dilution successive du CIQ level I dans de l'Albumorm 5g/100 mL au 1/10e, 1/12e et 1/15e et 10 déterminations de chaque niveau, critères retenus CV% et biais inférieurs à 20%</p> <p>Au 1/15ème, soit 0,10 µmol/L le CV obtenu est de 6,0% et le biais moyen de 12,3%. Aucun intérêt clinique de quantifier plus bas, la limite de quantification retenue est donc de 0,10 µmol/L</p> <p>* "Lower limit of quantification (LLOQ)" pour la limite de linéarité :</p> <p>1) Surcharge à 10 µmol/L à partir d'une solution éthanolique d'alpha-rétinol à 1 mg/mL dans de l'Albumorm 5g/100 mL (soit 5,7 µL dans 2 mL)</p> <p>2) puis dilution au 9/10e jusqu'au 5/10e dans de l'Albumorm 5g/100 mL et 10 déterminations de chaque niveau, critère retenus CV% et biais inférieurs à 20%</p> <p>Pour la surcharge à 10 µmol/L, le CV obtenu est de 6,5% et le biais moyen de -6,1%. Aucun intérêt clinique de quantifier plus haut (toxicité au-delà de 4,5 µmol/L), les dilutions inférieures ne présentent pas de CV ou biais > 20%, la limite de linéarité retenue est donc de 10 µmol/L</p>
Commentaire	Intervalle de mesure déterminé : 0,1 à 10 µmol/L
Conclusions	Caractéristiques analytiques compatibles avec les pratiques du quotidien, convient aux besoins du laboratoire

- 5) L'analyse des risques de la méthode est complétée en fonction des résultats obtenus des essais de validation.

Extrait :

ANALYSE DES RISQUES					
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise	Niveau de maîtrise
Méthode	Seuil de carence	F1 x G5 = 5	Incertitude au seuil	Calcul de l'incertitude	5/5



9.5 Cas des méthodes multiparamétriques

Certaines méthodes multiparamétriques peuvent bénéficier d'un DVM commun. C'est le cas de méthodes immunoenzymatiques pour la recherche de certains allergènes (AB01) en portée A mais également de méthodes multiplex en bactériologie (MG05).

L'analyse des risques comporte une base commune liée à la technologie et des spécificités liées à chaque paramètre. La notion de paramètres sentinelles permet d'apprécier globalement les risques liés à la technologie.

Les spécificités liées à chaque paramètre peuvent être abordés à travers des études bibliographiques et/ou expérimentales.

Le laboratoire peut constituer son DVM de la manière suivante :

- 1) Le laboratoire justifie sa démarche en se basant par exemple sur la description de la méthode, mais également sur la bibliographie.
- 2) Il réalise ses essais avec des paramètres « sentinelles » ou avec l'ensemble des paramètres.
- 3) Pour les paramètres qui ne seraient pas évalués directement, il s'assure de la maîtrise de la méthode par différents moyens : prise en compte des fiches techniques, possibilité de s'apercevoir des dérives de méthode et prise en compte des alertes ANSM.

9.5.1 Exemple de dosage des IgE spécifiques par méthode immuno-enzymatique automatisée

- 1) Justification de la démarche basée sur la bibliographie :
 - Pour une accréditation raisonnable et efficace des tests biologiques en allergologie. Sarrat A. et al. ; Groupe de travail « accréditation IgE » du Réseau des Biologistes de l'Allergie des centres hospitaliers « AllergoBioNet ». Ann Biol Clin (Paris). 2013; 71 (3) : 325-32
 - Accreditation of allergen specific serum immunoglobulin E in view of EN ISO 15189; Lambert C. et al. ; Groupe de travail « accréditation IgE » du Réseau d'Immuno-Allergologie Biologique Hospitalière « AllergoBioNet » Allergy. 2015;70(2):180-6
- 2) Les performances communes sont établies avec un nombre de spécificités réduit (e1, t3, d1) dans un DVM « classique » :

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs	Moyenne (kUA/L)	Ecart-type (kUA/L)	CV (%)	CV optimum fournisseur (%)	CV retenu : SFBC (%)	Conclusion
CIQ (e1) niveau 1 - bas	30	2,64	0,140	5,3	4	12	Conforme
CIQ (t3) niveau 2 - moyen	30	8,69	0,633	7,3	5	12	Conforme
CIQ (d1) niveau 3 - haut	30	23,76	1,611	6,8	5	12	Conforme



3) La gestion des autres spécificités figure dans l'analyse des risques.

MAITRISE DES RISQUES (extrait)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (réactifs)	Composition des réactifs	++++	Connaissance des différents antigènes (peptides, protéines, glycoprotéines, mélanges...)	Fiches fournisseurs
	Performance prévue des réactifs	++	Acceptation à réception des réactifs	Revue des données de performance fournisseur, Marquage CE
	Suivi des performances des réactifs	+++	Suivi des alertes	Veille de réactovigilance fournisseur et ANSM Suivi des EEQ
	Spécificité/sensibilité des réactifs (exemples : lait de vache, arachide, venin d'hyménoptère...)	+++	Bibliographie	Procédure « Interprétation et prestations de conseil »

9.6 Cas des processus complexes

Un processus analytique est dit complexe quand plusieurs étapes s'enchainent, que chacune puisse donner lieu à un résultat ou pas. Chaque étape correspond à un sous-processus.

Exemples :

- Enchaînement d'étapes qui ne peuvent être dissociées ou qui ne donnent pas de résultats en tant que tel. Il s'agit, en général des étapes de pré-traitement. Exemple de la biologie moléculaire en microbiologie avec un premier sous-processus de lyse cellulaire, un second d'extraction et un troisième d'amplification.
- Articulation de plusieurs DVM simples, qui correspond à une check-list associée à une maîtrise des risques spécifiques à l'examen : exemple de l'ECBU en microbiologie avec un premier sous-processus, l'examen direct, un second, l'ensemencement et la culture, un troisième l'identification et le dernier, l'antibiogramme
- Certains processus complexes comportent des sous-processus intermédiaires non rendus mais qui contribuent à l'interprétation. C'est le cas du pH qui contribue à l'analyse des cristaux urinaires.

Dans ces cas, le laboratoire peut rédiger autant de DVM que de sous-processus. Il peut également ne formaliser qu'un seul dossier en s'inspirant du modèle de formulaire SH FORM 43.

L'analyse des risques peut être globale ou propre à chaque sous-processus lorsque les risques sont différents et spécifiques à chacun.



Outre les aspects purement techniques, le risque se situe dans la cohérence de l'organisation documentaire et dans la cohérence avec la procédure de vérification / validation de méthode.

9.7 Cas des « paramètres calculés »

Pour certains examens, la méthode comporte un calcul. Le cas échéant, une vérification de certaines performances peut s'avérer nécessaire. Cette démarche est justifiée par le service médical rendu.

Que vérifier ?

- La méthode de calcul

Dans le cas d'un calcul complexe ou d'un logiciel, une vérification du paramétrage peut s'avérer nécessaire. En l'absence de changement, il est inutile de refaire la vérification. Mais une nouvelle vérification est utile devant une source de régression (modification de paramétrage, changement de version). Il est alors utile de réaliser la vérification des calculs via un test de jeu de données.

- La maîtrise d'un logiciel

Certains calculs utilisent des données multiples intégrées dans un logiciel. L'analyse des risques liés au logiciel de calcul et la comparaison des méthodes constituent des éléments d'intérêts (ex : calcul du risque lié aux marqueurs sériques de la trisomie 21).

Pourquoi vérifier ces performances ?

Pour les analyses comportant un calcul comme pour les autres, l'incertitude de mesure aux seuils décisionnels peut être utile à l'interprétation ou encore à la prestation de conseil. (Ex : ratio du TCA à certains niveaux pour lesquels des décisions cliniques ou biologiques seront prises).

9.7.1 Exemple de calcul du risque lié aux marqueurs sériques de la trisomie 21

Le dossier présente une analyse des risques du logiciel (cf. extrait ci-dessous).

Le dossier présente également les performances à estimer (cf. extrait sur le critère comparaison ci-dessous).



MAITRISES DES RISQUES DU LOGICIEL						
5M	Points critiques	Échelle de criticité ⁱ			Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
		F	G	C		
Milieu	Environnement électrique	1	3	3	Fluctuations électriques	Mise sur prises onduleur de l'automate et des 2 PC ayant le logiciel
	Détérioration du matériel	1	4	4	Accès de la pièce contenant l'ordinateur central et sécurité	Pièce fermée par digicode tous les jours hors horaires d'ouverture du secteur
Matériel (équipements : PC, imprimantes, réseau et logiciel)(ts)	Logiciel	2	3	6	Conformité du logiciel Télemaintenances Accès au logiciel	Utilisation du logiciel d'évaluation des risques marqué CE, spécifiquement adapté aux réactifs utilisés (arrêté du 23 juin 2009) Mise à jour de la dernière version par le fournisseur et suivi via la liste des équipements critiques La mise en place d'une nouvelle version est tracée dans le cahier de vie de l'automate. Jeu de données réalisé à chaque changement de version logiciel (Fiche analyse) Traçabilité des interventions auprès de la DSN par bastion Wallix Droits d'accès limité aux besoins des différents types d'utilisateurs
	Equipements (PC, imprimantes)	1	3	3	Evolutivité des matériels et correspondance avec les besoins du laboratoire	Procédure achats Rédaction dans le CCTP d'Appels d'Offres
	Informatique embarquée	2	4	8	Fonctionnement du système ou des connexions informatiques	Vérification de la conformité du logiciel de calcul de risque via un jeu de données à tester (Fiche analyse) Vérification de l'intégrité des données transmises (saisie du dossier jusqu'à l'édition des comptes rendus) par le biologiste (Fiche analyse) Traçabilité des contrôles de la justesse de la transmission informatique (Mode opératoire) et tracé dans le formulaire dédié
	Réseau	2	4	8	Support viable de sauvegarde des données Connexion bidirectionnelle efficace entre logiciel et l'automate	Procédure informatique Sauvegarde automatique des données brutes automatiques sur le réseau du laboratoire de façon quotidienne sur serveur dédié et sur le disque « C » du PC maitre Traçabilité des contrôles de la justesse de la transmission informatique (Moe opératoire) et tracé dans le formulaire dédié Connexion bidirectionnelle via une étiquette code barre spécifique reconnue par le logiciel Procédure dégradée en cas de coupure informatique



MAITRISES DES RISQUES DU LOGICIEL						
5M	Points critiques	Échelle de criticité ⁱ			Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
		F	G	C		
	...					

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



Guide Technique d'Accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes de Biologie médicale

Calcul du risque					
Référence échantillon	Méthode A	Méthode B	Concordance clinique		Trimestre concerné
			Oui	Non	
1	5811	9221	x		
2	10000	10000	x		
3	10000	10000	x		
4	5109	2779	x		
5	3774	5915	x		
6	10000	10000	x		
7	5595	6060	x		
8	7318	10000	x		
9	10000	10000	x		
10	2780	1980	x		
11	921	569	x		
12	10000	10000	x		
13	10000	10000	x		
14	661	558	x		
15	1110	755	x	X	2e
16	4674	2555	x		2e
17	10000	10000	x		
18	5667	6113	x		
19	2575	4422	x		
20	9407	10000	x		
21	3210	2120	x		
22	10000	10000	x		
23	10000	10000	x		
24	10000	10000	x		
25	10000	10000	x		
26	10000	10000	x		
27	658	976	x		
28	10000	10000	x		
29	1013	1788	x		
30	10000	10000	x		
31	10000	10000	x		
32	8157	7219	x		
33	23	28	x		2e
34	1260	2229	x		2e
35	10000	16218	x		2e
36	920	670	x		
37	485	232	x		
38	10000	10000	x		
39	888	82	x		
40	10000	10000	x		
41	10000	10000	x		
42	4859	10000	x		
43	10000	10000	x		
44	1301	1114	x		
45	990	2505	x	X	
46	7945	5064	x		
47	10000	10000	x		
48	10000	10000	x		
49	964	1018	x	X	
50	5441	9615	x		
51	923	968	x		
52	344	159	x		
53	814	449	x		
54	9634	10000	x		
55	10000	10000	x		
56	10000	10000	x		
57	8489	10000	x		
58	9304	10000	x		
59	10000	10000	x		
60	102	169	x		
61	10000	10000	x		
62	3360	4454	x		
63	1246	1468	x		2e
64	781	1196	x	X	2e
65	1010	927	x	X	
66	2933	2970	x		
67	9134	10000	x		
68	760	345	x		
69	10000	10000	x		
70	547	697	x		
71	6664	7390	x		
72	2187	1410	x		
73	5835	10000	x		
74	10000	10000	x		
75	10000	10000	x		
76	2120	1750	x		
77	6761	10000	x		
78	10000	10000	x		
79	10000	10000	x		
80	4409	2772	x		
81	267	453	x		2e
82	121	137	x		
83	2806	2134	x		
84	208	342	x		
85	10000	10000	x		
86	10000	10000	x		
87	7394	4991	x		2e
88	9604	10000	x		
89	3144	6176	x		
90	1258	971	x	X	
91	10000	8500	x		
92	609	471	x		
93	2896	5042	x		2e

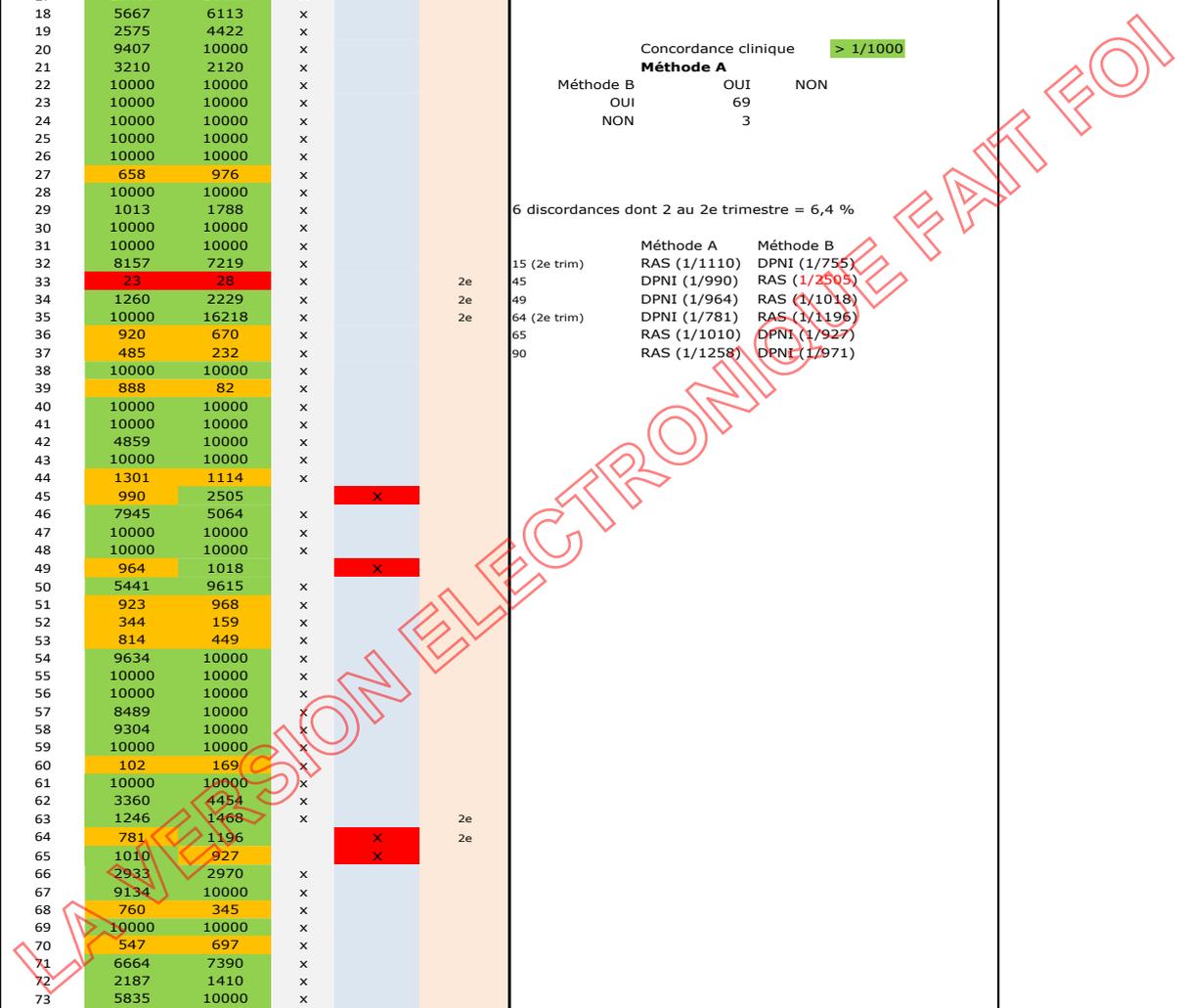
Concordance clinique **< 1/50**
Méthode A
Méthode B OUI NON
OUI 1
NON

Concordance clinique **entre 1/50 et 1/1000**
Méthode A
Méthode B OUI NON
OUI 17
NON 3

Concordance clinique **> 1/1000**
Méthode A
Méthode B OUI NON
OUI 69
NON 3

6 discordances dont 2 au 2e trimestre = 6,4 %

	Méthode A	Méthode B
15 (2e trim)	RAS (1/1110)	DPNI (1/755)
45	DPNI (1/990)	RAS (1/2505)
49	DPNI (1/964)	RAS (1/1018)
64 (2e trim)	DPNI (1/781)	RAS (1/1196)
65	RAS (1/1010)	DPNI (1/927)
90	RAS (1/1258)	DPNI (1/971)





En termes de performances, il est également important aussi dans ce cadre de vérifier l'absence de fluctuations importantes du pourcentage de dossiers à risque mis en évidence par le laboratoire par le suivi d'indicateurs qualité définis.

9.7.2 Exemple de l'examen de dosage des bilirubines

Certains examens résultent de calculs comme, le calcul la bilirubinémie directe à partir des dosages de bilirubine totale et indirecte. Dans ce cas, le laboratoire s'assure que les performances annoncées pour la procédure analytique et confirmées pendant le processus de vérification sont appropriées à l'utilisation prévue des résultats d'examen.

Il ne s'agit pas de vérifier la méthode de calcul (en l'occurrence une soustraction) mais de déterminer certaines performances utiles telles que, par exemple, les incertitudes ou les limites de détection de cet examen qui résulte d'un calcul.

9.8 Cas des tests unitaires simples (TUS)

Les tests unitaires simples sont soit manuels (bandelettes urinaires, tests immuno-chromatographiques) soit automatisés. Les risques liés à ces tests unitaires simples sont liés non seulement aux spécificités techniques des méthodes, mais également aux aspects organisationnels du laboratoire dans laquelle ils sont mis en œuvre : techniques différentes, utilisateurs variés, plusieurs sites ...

Le dossier de vérification d'un TUS fait apparaître à la fois les spécificités liées aux méthodes et les spécificités organisationnelles.

9.8.1 Exemple d'un TUS réalisé sur un seul site

La vérification ne fait pas apparaître d'éléments spécifiques à l'organisation.
Extrait du DVM :

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE		
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Bandelette urinaire		
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : 6)		
DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1 : Recherche de nitrites	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire (essai) <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs (essai) <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude (essai) <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique (biblio) <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes(biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence (biblio)



Sous-processus 2 : glycosurie ...	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification : <input type="checkbox"/> 14. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 15. Fidélité intermédiaire (essai) <input checked="" type="checkbox"/> 16. Variabilité inter-opérateurs (essai) <input type="checkbox"/> 17. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 18. Exactitude (essai) <input checked="" type="checkbox"/> 19. Sensibilité et spécificité analytique (biblio) <input type="checkbox"/> 20. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 21. Etendue de mesure (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 22. Comparaison de méthodes (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 23. Interférences (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 24. Contamination (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 25. Robustesse et fiabilité des réactifs (biblio) <input checked="" type="checkbox"/> 26. Intervalle de référence (biblio)
...

9.8.2 Exemple d'un TUS réalisé sur plusieurs sites

Cet exemple est celui d'un laboratoire multisites qui utilise sur plusieurs sites des bandelettes urinaires pour détecter une leucocyturie. Dans ce cas, les vérifications des performances de la méthode sont réalisées sur un site et l'absence de dérive de la méthode est vérifiée sur l'ensemble des sites.

ARGUMENTAIRE DU DOSSIER DE VERIFICATION
<p>La bandelette urinaire permet de doser</p> <ul style="list-style-type: none">- pH, nitrite, corps cétoniques, protides, glucose et leucocytes <p>Contexte organisationnel :</p> <ul style="list-style-type: none">- Le plateau technique est le site référent qui réceptionne chaque lot et chaque expédition de bandelettes pour l'ensemble du laboratoire et les répartit aux sites secondaires- Réalisation des bandelettes urinaires sur les sites secondaires dans un contexte d'urgence et/ou après le passage du dernier coursier. <p>Conséquence :</p> <ul style="list-style-type: none">- Le site référent a pour mission de vérifier la méthode pour l'ensemble du processus- Les variabilités en lien avec les sites secondaires (variabilité inter opérateurs, transport inter sites des bandelettes, conservation des bandelettes sur les sites secondaires) sont maîtrisées à travers des comparaisons réalisées sur les sites secondaires



MODALITES DE VERIFICATION			
Risques liés à la méthode		Modalité de vérification	
- Reproductibilité	Sur le site « principal »	Fidélité intermédiaire	10 passages de contrôles
- Justesse		Exactitude	3 EEQ
- Comparaison avec méthode optique		Comparaison sur plusieurs urines pendant une durée déterminée	10 échantillons passés en parallèle sur les 2 méthodes
- Limite de détection		Etude bibliographique	Fiche technique
Risques liés à l'organisation du laboratoire		Modalité de vérification	
- Comparaison inter opérateurs	Sur chaque site « secondaire »	Comparaison entre les opérateurs avec des urines fraîches et avec les CIQ	2 urines par opérateur et sur chaque site
- Conservation des bandelettes sur les sites		Passage des CIQ selon une stratégie définie : a minima mensuels et à chaque ouverture et fermeture de coffret sur le site secondaire	1 passage CIQ par site
- Transports inter sites		Comparaison des résultats des patients traités à la fois sur le site référent et le site secondaire	Les 10 échantillons passés sur le site référent sont répartis et traités en parallèle sur les sites secondaires

NB : La stratégie de vérification de méthode pour un TUS réalisé en multisites n'a pas vocation à remplacer la stratégie de participation aux EEQ et CIQ.



10 EXEMPLES DE SYNTHÈSES DE VÉRIFICATION / VALIDATION DE MÉTHODES

*Il est rappelé que cette annexe est constituée d'exemples d'analyses de risques et de dossiers de vérification / validation de méthodes dont pourront s'inspirer les laboratoires. Dans tous les cas, **il appartient aux laboratoires de démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire pleinement aux exigences d'accréditation pour le service médical rendu.***



10.1 Exemple portant sur la détermination de la concentration des spermatozoïdes

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre : Concentration des spermatozoïdes (ÉCHANTILLON – ÉJACULAT)
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS	
Etapes et éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification / validation :
Concentration des spermatozoïdes (ÉCHANTILLON – ÉJACULAT)	Etude expérimentale sur 3 niveaux : 30 passages <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité
	Etude expérimentale sur 2 niveaux : 30 passages <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire
	Comparaison inter technicien selon la méthode décrite dans l'OMS 2010 <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs
	<input type="checkbox"/> 4. Justesse
	EEQ Biologie Prospective 2017 <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude
	<input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique
	Méthode LT CV Biologie prospective 2016 <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes
	Documents fournisseur <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure
	Réalisée sur 20 échantillons : Makler/Malassez <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes
	<input type="checkbox"/> 10. Interférences
	<input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination
	<input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs
	Selon l'OMS 2010 <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

Argumentaire (le cas échéant) :



SOUS-PROCESSUS 1 : Concentration des spermatozoïdes (ÉCHANTILLON – ÉJACULAT)
Portée A <input checked="" type="checkbox"/> ; Portée B <input type="checkbox"/> (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Comptage microscopique sur cellule calibrée
Principe de la Méthode :	Méthode Manuelle de type Quantitatif - Microscopique
Type d'échantillon primaire :	Sperme (éjaculat, état frais)
Type de récipient, additifs :	Flacon de recueil stérile (VR2M réf RCSP100)
Prétraitement de l'échantillon :	Attendre la liquéfaction de l'échantillon de sperme (20 à 30 minutes) à température ambiante et homogénéisation
Unités :	Nombre de spermatozoïdes /ml
Critères d'interprétation¹² :	Valeurs de référence : ≥ 15 millions/mL (guide OMS 2010)
Marquage CE (Oui/Non) :	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Cellule de Makler Microscope optique OLYMPUS BX50 (n° F10-MIC-0003)
Référence du réactif :	CIQ Accu-Beads®+ (Hamilton Thorne®)
Matériau d'étalonnage (références) :	/
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	/

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	XXXX XXXX XXXX XXXXX
Procédure de validation/mode opératoire :	Procédure de Gestion de la portée flexible et Vérification / Validation des méthodes
Procédure de gestion de la portée flexible :	Procédure de Gestion de la portée flexible et Vérification / Validation des méthodes
Période d'étude :	Du : 01/03/2015 au 30/03/2017
Date de 1^{ère} utilisation :	Méthodes utilisées dans le LBM depuis 2015

¹² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



MAITRISE DES RISQUES (Le laboratoire adapte les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ¹³	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillon)	Identitovigilance	3X1X2=6	Formation et information du personnel)	Respect des règles d'identitovigilance du laboratoire avec les conduites à tenir en cas de problème et conduite à tenir en cas de non-conformité constatée au cours du processus pré-analytique Procédure - « Réception des échantillons » Procédure - « Réalisation des prélèvements » Procédure - « Traitement d'une demande »
	Préparation du patient	3X1X2=6	Information aux patients et demande d'informations (renseignements cliniques, préanalytiques ...)	Enregistrement - « Instruction de recueil de sperme » Enregistrement – « "Feuille de paillasse Spermogramme » Manuel de prélèvement dématérialisé
	Intégrité du flacon de recueil	3X1X2=12	Utilisation de flacons conformes aux prélèvements de sperme et vérification de l'intégrité à la réception des commandes	Flacon de recueil stérile (VR2M réf RCSP100) Procédure - « Achats »
	Délai et température de transport	3X1X1=3	Information aux patients	Enregistrement - « Instruction de recueil de sperme » Manuel de prélèvement dématérialisé
	Prétraitement	3X1X2=6	Liquéfaction de l'échantillon de 20 à 30 minutes à température ambiante et homogénéisation du prélèvement	Mode opératoire - "Spermogramme-spermocytogramme"

¹³ Criticité=GOD=Gravité X Occurrence X Détectabilité



Milieu	Organisation des locaux et du lieu de travail	3X1X2=6	Locaux inadaptés	<p>Procédure - " Gestion des locaux et sécurité du personnel »</p> <p>Salles de prélèvement dédiées et adaptées</p> <p>Paillasse située à proximité des salles de recueil sur un site entièrement dédiée à l'activité spermologie.</p> <p>Surveillance des zones de stockage et de la pièce technique par des sondes reliées au logiciel Labguard 3.</p>
	Conditions d'hygiène et sécurité	3X2X2=12	Contamination des installations Intrusion Elimination des déchets	<p>Procédure - " Gestion des locaux et sécurité du personnel »</p> <p>L'entretien des locaux est assuré par la Clinique de la Sagesse</p> <p>Procédure - « Confidentialité »</p> <p>- La sécurisation des accès aux différentes zones (dispositif anti-intrusion) est assurée par des digicodes.</p> <p>Procédure – « Elimination des déchets »</p>
Matériel (Equipements)	Cellule de Makler	3X2X2=12	Cellule endommagée (rayée-cassé-mauvais quadrillage)	Observation de la cellule avant de l'utiliser Stockage adapté
		3X1X1=3	Bulle d'air quand chargement de la cellule	Nouvelle goutte
		2X2X2=8	Cellule sale ou mal nettoyée (risque de contamination entre deux patients)	Stockage adaptée à la paillasse de spermologie et nettoyage selon les recommandations du fournisseur entre deux patients
	Entretien et réglages du microscope	3X1X3=9	Révision du microscope (maintenance annuelle) Désinfection et nettoyage mensuels des oculaires avec matériel adapté - Lecture adaptée (X20)	Enregistrement des maintenances dans Kalilab et Désinfection/nettoyage du microscope sur un enregistrement
	Acceptation à réception des consommables et gestion du stock	3X2X1=6	Gestion des stocks avec traçabilité des lots et péremptions	Manuel - « Gestion des Commandes et du stock »
	Informatique du laboratoire (Hexalis)	3X2X2=12	Altération du fonctionnement ou du paramétrage	<p>Procédure - "Maitrise du système informatique"</p> <p>Mode opératoire - « Résolution des problèmes informatiques »</p>



Méthode	Réalisation de la concentration	3X2X1=6	Erreur de lecture	<p>Personnel formé et habilité</p> <p>Procédure - « Recrutement et intégration »</p> <p>Procédure - « Formation »</p> <p>Procédure - « Habilitation »</p> <p>Procédure - « Habilitation spermologie »</p> <p>Enregistrement - « Habilitation spermio PMA»</p> <p>Mise en place d'un CIQ « Accu-beads + » (tous les 3 mois, 2 niveaux)</p> <p>Enregistrement - «Contrôle des performances des opérateurs»</p> <p>Mode opératoire - "Spermogramme-spermocytogramme"</p>
	Procédures à jour	2X2X2=8	Revue des documents qualité	Revue annuelle ou tous les deux ans du système documentaire (Procédure « Rédaction et gestion des documents qualité »)
	Procédures mal appliquées	3X2X2=12	Application correcte des procédures	Réalisation d'audits selon la procédure "Audits qualité" et selon la fréquence définie dans le "Planning des audits "
Main d'œuvre (Personnel)	Habilitation et maintien des compétences du personnel	3X2X2=12	Procédures formation, intégration et habilitation du personnel	<p>Procédure - « Formation »</p> <p>Procédure - « Recrutement et intégration »</p> <p>Mode opératoire - « Habilitation »</p>

LA VERSION ELECTRONIQUE EST PRO



EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : **sperme**

REPETABILITE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/> Cellule de Makler Microscope avec platine chauffante et contraste de phase 15-16/01/2015							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ¹⁴) Ricos minimal	Conclusion ¹⁵
Echantillon 1 Sperme normal : patient n°XA	30	74.73	3.19	4.27	/	15.1	Conforme
Echantillon 2 Sperme bas : patient n°XB	30	2.42	0.40	16.36	/	15.1	Non Conforme
Echantillon 3 Billes de latex : 18 M/mL	30	20.91	0.73	3.49	/	15.1	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Méthode validée en répétabilité pour les niveaux 1 et 3. Pour le niveau 2 (valeur à 2.42M /ml, résultats supérieurs à l'objectif de performance. Cette valeur traduit une oligospermie sévère, ne modifiant pas la conduite thérapeutique à tenir). Conforme et satisfaisant, au regard des spécifications du laboratoire. Acceptable cliniquement.

¹⁴ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

¹⁵ Conforme/non conforme



FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/> Cellule de Makler Microscope avec platine chauffante et contraste de phase Du 15/12/2014 au 23/12/2014 Du 05/01/2015 au 27/01/2015							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴) Ricos souhaitable	Conclusion ⁴
Echantillon n°1 Billes de latex lot 130512351 35 +/- 5	30	39.483	2.18	5.51	/	13.4	Conforme
Echantillon n°2 Billes de latex lot 131411181 18 +/- 2,5 M/mL	30	20.300	1.86	9.16	/	13.4	Conforme

Argumentaire de la conclusion : **CONFORME** - le CV de fidélité intermédiaire est bien inférieur au CV Ricos souhaitable.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateur répond aux besoins du laboratoire. Absence de variabilité inter-opérateur pour la concentration en spermatozoïdes (Cf. Extrait du document « variabilité inter-opérateurs » ci-dessous)

	Somme	N	Moyenne (m)	SD=ecart type	m/se(m)	3*se(m)
MD	52,92	23	2,30	7,80	2,09	3,29
EB	0,88	23	0,04	4,60	0,03	3,29
JG	4,33	17	0,25	2,20	0,23	3,29
IM	3,38	23	0,15	6,90	0,13	3,29
CG	44,08	23	1,92	5,31	1,75	3,29
JFG	0,23	12	0,02	1,95	0,02	3,29

ERMS 5,77 ERMS = Error Root Mean Square

Se(m) 1,10 se(m) = Standard Error

Conclusions OMS : la moyenne d'un technicien doit être inférieure à 3"erreurs standarts" (se(m)) :

La lecture est validée par ce calcul pour les 6 opérateurs confirmant la FIDELITE



JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite ⁴	Conclusion ⁵
Echantillon CIQ niveau 1	/	/	/	/	/	/	/	/
Echantillon CIQ niveau 2	/	/	/	/	/	/	/	/

Argumentaire de la conclusion : Pas de CIQ externalisé

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite ⁴	Conclusion ⁵
2017-1A	26.6	21.6	27.7	23.1	4.0	23.4	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Résultat conforme.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Vrais positifs	/
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion : Non applicable.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode LTCV (%) – Biologie prospective	ET Ricos souhaitable
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	+ / - 6.4 %	37.7 %
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :		
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :		

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Les incertitudes évaluées sont conformes à la spécification définie (Ricos souhaitable). Critère satisfait, adapté aux besoins cliniques.



LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Limite de détection :	/

Argumentaire de la conclusion : [Non applicable](#)

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références 1 et 8 (Bibliographie)
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Comparaison avec cellule de Malassez
Nombre de mesures :	20
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	3 à 170 M/ml
Méthode d'exploitation des résultats :	Diagramme des différences
Equation de la droite de régression :	$Y = 1.107X - 2.807$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	95% de points dans les normes de suivi

Argumentaire de la conclusion : [Bonne commutabilité entre les 2 méthodes.](#)

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
Limite de détection :	/	/
Limite de quantification :	/	/
Limite supérieure de linéarité :	/	/

Argumentaire de la conclusion : [La limite basse est de 0 M/mL. Il n'existe pas de limite haute. Conforme aux attentes du laboratoire.](#)



INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Hémolyse	/
Turbidité	/
Bilirubine, ictère	/
Médicaments	/
...	

Argumentaire de la conclusion : [Non applicable](#)

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG, ...) :	Valeurs de sperme : 5 M/ml et 115 M/ml C = -0.58% - Absence de contamination
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	/

Argumentaire de la conclusion : [Méthode manuelle, le niveau de contamination proche de 0 et le nettoyage de la cellule à chaque comptage, préviennent de la contamination.](#)
[Répond aux besoins du laboratoire.](#)

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t° , pH, position sur un support, ...)	/
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	/

Argumentaire de la conclusion : [Non applicable](#)



INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Valeurs de référence : ≥ 15 millions/mL (guide OMS 2010) Enregistrement "Valeurs de référence pour les spermogrammes et spermocytogrammes et leurs sources bibliographiques"

Argumentaire de la conclusion : Valeurs adaptées à notre méthode et cohérentes (par expérience) à notre population.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du 06/06/2017 (par rapport aux critères de performance préétablis par le laboratoire).
Autorisée par : Dr BIO - biologiste médical et référent du secteur AMP du laboratoire
Signature

Bibliographie :

- Référence 1 : OMS 2010: World Health Organization, « WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen », 2010, 5th ed., 271 pages (SAQ-EX024)
- Référence 2 : « AMP », J. Lansac, F.Guérif, J. Gouneaud
- Référence 3 : A. ABBARA, « Paramètres du spermogramme – Normes de l'OMS », 03 décembre 2010, consulté le 01/12/2012 sur le site internet : http://www.aly-abbara.com/echographie/biometrie/scores/spermogramme_normes_oms.html
- Référence 4 : M. AUROUX, « Spermogramme, spermocytogramme, examens complémentaires », Feuilles de Biologie, 1993, volume 34, n° 192, p.51 à 58
- Référence 5 : Menkveld and Coll., 2001 – Human reprod., 16 :1165-1171
- Référence 6 : Dr.Laurence LEVY-DUTEL, Isabelle BERTHAUT, Laurence BRUNET, Charlotte DUDKIEWICZ-SIBONY, Dr. Carole MINKER, Dr. Jérôme PFEFFER, « Le grand livre de la fertilité », p.80
- Référence 7 : Dr. Alexandra MESNER, Professeur, Catherine POIROT, « Le spermocytogramme en images »
- Référence 8 : « Cahier de formation n°42 » (SAQ-EX025)



10.2 Exemple portant sur la vitalité des spermatozoïdes

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre : Vitalité (ÉCHANTILLON – ÉJACULAT)
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Vitalité (ÉCHANTILLON – ÉJACULAT)	Etude expérimentale sur 2 niveaux (1 niveau >58% et un niveau <58%) 10 passages	Modalités de vérification/validation ¹⁶ : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité
	Etude expérimentale sur 20 spermés avec des vitalités différentes et réalisée par 3 opérateurs par sperme	<input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire
	Comparaison inter technicien selon la méthode décrite dans l'OMS 2010	<input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs
		<input type="checkbox"/> 4. Justesse
	EEQ Biologie prospective et Probioqual 2017 / 2018	<input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude
		<input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique
	Méthode CIQ/EEQ BP et Probioqual 2017/2018	<input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes
	Selon l'OMS 2010	<input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure
	Etude réalisée sur 2 aliquots	<input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes
	Fiche technique document fournisseur	<input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences
	Lame à usage unique	<input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination
	Fiche technique document fournisseur	<input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs
	Selon l'OMS 2010	<input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

¹⁶ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.



SOUS-PROCESSUS 1 : vitalité (ÉCHANTILLON – ÉJACULAT)

Portée A ; Portée B (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte / Mesurande :	Vitalité des spermatozoïdes
Principe de la Méthode :	Evaluation du pourcentage de spermatozoïdes vivants et morts après coloration d'un frottis - colorimétrie
Type d'échantillon primaire :	Sperme (éjaculat)
Type de récipient, additifs :	Flacon de recueil stérile (VR2M réf RCSP100)
Prétraitement de l'échantillon :	Attendre liquéfaction de l'échantillon de sperme (20 à 30 minutes) à température ambiante et homogénéisation
Unités :	%
Critères d'interprétation ¹⁷ :	Valeurs de référence $\geq 58\%$ de formes vivantes (guide OMS 2010)
Marquage CE (Oui/Non) :	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	/
Référence du réactif :	Kit VitalScreen™ référence MT 281 fournisseur JCD
Matériau d'étalonnage (références) :	/
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	/

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	XXXX XXXX XXXX XXXX
Procédure de validation/mode opératoire :	Procédure de Gestion de la portée flexible et Vérification / Validation des méthodes Mode opératoire "Spermogramme-spermocytogramme"
Procédure de gestion de la portée flexible :	ANA-PR001 Gestion de la portée flexible et Vérification / Validation des méthodes
Période d'étude :	Du 30/04/2018 au 15/05/2018
Date de 1 ^{ère} utilisation	Méthode utilisée dans le LBM depuis 2018

¹⁷ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



MAITRISE DES RISQUES				
(Le laboratoire adapte les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ¹⁸	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillon)	Identitovigilance	3X1X2=6	Formation et information du personnel)	<p>Respect des règles d'identitovigilance du laboratoire avec les conduites à tenir en cas de problème et conduite à tenir en cas de non-conformité constatée au cours du processus pré-analytique</p> <p>Procédure - « Réception des échantillons »</p> <p>Procédure - « Réalisation des prélèvements »</p> <p>Procédure - « Traitement d'une demande »</p>
	Préparation du patient	3X1X2=6	Information aux patients et demande d'informations (renseignements cliniques, préanalytiques ...)	<p>Enregistrement - « Instruction de recueil de sperme »</p> <p>Enregistrement – « "Feuille de paillasse Spermogramme »</p> <p>Manuel de prélèvement dématérialisé</p>
	Intégrité du flacon de recueil	3X1X2=12	Utilisation de flacons conformes aux prélèvements de sperme et vérification de l'intégrité à la réception des commandes	<p>Flacon de recueil stérile (VR2M réf RCSP100)</p> <p>Procédure - « Achats »</p>
	Délai et température de transport	3X1X1=3	Information aux patients	<p>Enregistrement - « Instruction de recueil de sperme »</p> <p>Manuel de prélèvement dématérialisé</p>
	Prétraitement	3X1X2=6	Liquéfaction de l'échantillon de 20 à 30 minutes à température ambiante et homogénéisation du prélèvement	<p>Mode opératoire - "Spermogramme-spermocytogramme"</p>

¹⁸ Criticité=GOD=Gravité X Occurrence X Détectabilité



Milieu	Organisation des locaux et du lieu de travail	3X1X2=6	Locaux inadaptés	Procédure - " Gestion des locaux et sécurité du personnel » Salles de prélèvement dédiées et adaptées Paillasse située à proximité des salles de recueil sur un site entièrement dédiée à l'activité spermologie. Surveillance des zones de stockage et de la pièce technique par des sondes reliées au logiciel Labguard 3.
	Conditions d'hygiène et sécurité	3X2X2=12	Contamination des installations Intrusion Elimination des déchets	Procédure - " Gestion des locaux et sécurité du personnel » L'entretien des locaux est assuré par la Clinique de la Sagesse Procédure - « Confidentialité » La sécurisation des accès aux différentes zones (dispositif anti-intrusion) est assurée par des digicodes. Procédure - « Elimination des déchets »
	Température de conservation et d'utilisation des réactifs	2X2X2=8	Non respectée	- Respect des recommandations environnementales transmises par le fournisseur. - Manuel : « Etalonnage des sondes de température et cartographie des enceintes » - Procédure - « Métrologie » - Formation des techniciens à l'utilisation du logiciel Lab-Guard - Procédure - « Surveillance des températures des zones de stockage » - Cf. Notices fournisseurs, fiche de stress, ...
	Contamination inter-échantillons	3X2X2=12	Lames non adaptées	Utilisation de lames à usage unique
	Conditions ambiantes, calme, concentration	2X3X1=6	Poste non adapté	- Séparation si possible, du poste de validation du reste du plateau technique

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



Matériel (Equipements et réactifs)	Equipements divers : Contrôle métrologique des équipements (centrifugeuses, pipette, microscope) Lames dégraissées, lamelles calibrées (22*22) Pointes stériles Entretien et réglage du microscope	3X1X3=9	Equipement non adapté et non contrôlé	<ul style="list-style-type: none">- Contrôles métrologiques effectués annuellement, enregistrés dans Kalilab.- Surveillance de la température des enceintes et température ambiante- Obtention du certificat de conformité des pointes (stérilité) VWR- Désinfection et nettoyage des oculaires avec matériel adapté Enregistrement des maintenances dans Kalilab et Désinfection/nettoyage du microscope sur enregistrement dédié <ul style="list-style-type: none">- Lecture adaptée (X20)
	Acceptation à réception des consommables et gestion du stock	3X2X1=6	Gestion des stocks avec traçabilité des lots et péremptions	Enregistrement des maintenances dans Kalilab et Désinfection/nettoyage du microscope sur enregistrement dédié Gestion du stock dans Kalilab Procédure « Achats » Manuel « Gestion des Commandes et du stock » <ul style="list-style-type: none">- Vérification des péremptions des stocks (page d'accueil Kalilab) par des tâches Kalilab indiquant à tous les acteurs de vérifier.- Respect des recommandations des fiches techniques.
	Conservation des réactifs	1X2X1=2	Qualité et stabilité des réactifs, Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs, Homogénéisation	Fiches techniques fournisseurs et attestation de stress produits. (FT Vital screen TM Référence MT 281 JCD)
	Informatique du laboratoire (Hexalis)	3X2X2=12	Altération du fonctionnement ou du paramétrage	Procédure - « Maitrise du système informatique" Mode opératoire - « Résolution des problèmes informatiques »



Méthode	Utilisation technique manuelle	3X2X1=6	Erreur de lecture	Personnel formé et habilité Procédure « Recrutement et intégration » Procédure « Formation » Mode opératoire « Habilitation » Enregistrement « Habilitation spermologie » Enregistrement « Habilitation spermio PMA » Variabilité inter-opérateurs (tous les 3 mois) Enregistrement « Contrôle des performances des opérateurs » Mode opératoire "Spermogramme-spermocytogramme" Réalisation d'EEQ Mode opératoire « Gestions des contrôles externes »
	Procédures à jour	2X2X2=8	Revue des documents qualité	Revue annuelle ou tous les deux ans du système documentaire (Procédure « Rédaction et gestion des documents qualité »)
	Procédures mal appliquées	3X2X2=12	Application correcte des procédures	Réalisation d'audits selon la procédure "Audits qualité » et selon la fréquence définie dans le "Planning des audits "
	Gestion de la portée flexible (Changement de méthode, de réactif, revue d'une méthode existante ...)	1X2X1=2	Non appliquée	- Enregistrement « Check-list de validation d'une nouvelle technique » - Comparaison inter opérateurs - Réalisation d'audits internes techniques et externes



	Veille documentaire et Réactovigilance	2X1X1=2	Non réalisée	<ul style="list-style-type: none"> - Réception des alertes ANSM par les biologistes et le service qualité - Procédure : « Rédaction et gestion des documents qualité » <ul style="list-style-type: none"> - Mode opératoire « Réacto-vigilance » Déclaration d'une réactovigilance et enregistrement d'une NC.
	Résultats	2X1X2=4	Transmission des résultats	<ul style="list-style-type: none"> - Courrier postal, H'prim médecin, « Mesanalyses.fr » (serveur de résultats patients), - Convention de preuve (réception des résultats par le prescripteur)
		3X3X1=9	Interprétation biologique	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure « Prestations de conseils » - Courrier de la Biologie Médicale-personnalisé envoyés aux prescripteurs - Dossier de validation communiqué à tous les biologistes - Analyse de la cohérence des résultats et des antécédents
		2X2X1=4	Commentaires	<ul style="list-style-type: none"> - Mode opératoire « Spermogramme-spermocytogramme" - Enregistrement « Feuille de paillasse spermogramme » <ul style="list-style-type: none"> - Procédure « Validation biologique » - Harmonisation des avis et commentaires
Main d'œuvre (Personnel)	Habilitation et maintien des compétences du personnel	3X2X2=12	Procédures formation, intégration et habilitation du personnel	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure « Formation » - Procédure « Recrutement et intégration » - Mode opératoire « Habilitation »

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : **sperme**

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Kit VitalScreen référence MT 281 lot n° FP17VI06							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ¹⁹)	Conclusion ²⁰
Echantillon Niveau bas 03/05/2018	10	33.90	1.60	4.71	/	5.79	Conforme
Echantillon Niveau haut 02/05/2018	10	78.27	3.28	4.19	/	5.79	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Pour la répétabilité, les CV (%) obtenus sont inférieurs aux CV (%) limites d'acceptabilité fournis par le RICOS, spécifications minimales.

Conforme et satisfaisant, au regard des spécifications du laboratoire. Acceptable cliniquement.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Kit VitalScreen référence MT 281 lot n° FP17VI06							
Du 30/04/2018 au 15/05/2018							
Echantillons	Nombre d'opérateurs(N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. RICOS)	Conclusion
1	3	72,33	2,25	3,12	/	7.73	Conforme
2	3	64,33	0,76	1,19	/	7.73	Conforme
3	3	29,50	0,50	1,69	/	7.73	Conforme
4	3	60,83	0,58	0,95	/	7.73	Conforme
5	3	28,50	0,29	1,12	/	7.73	Conforme
6	3	79,50	1,80	2,27	/	7.73	Conforme
7	3	45,33	0,29	0,64	/	7.73	Conforme
8	3	34,17	2,57	7,51	/	7.73	Conforme
9	3	67,17	4,65	6,92	/	7.73	Conforme
10	3	67,33	1,76	2,61	/	7.73	Conforme
11	3	55,00	2,65	4,81	/	7.73	Conforme
12	3	70,17	4,80	6,85	/	7.73	Conforme
13	3	65,00	2,29	3,53	/	7.73	Conforme
14	3	40,33	3,06	7,57	/	7.73	Conforme
15	3	85,50	1,00	1,17	/	7.73	Conforme
16	4	66,33	1,53	2,30	/	7.73	Conforme
17	4	53,33	2,08	3,90	/	7.73	Conforme
18	4	72,00	2,65	3,67	/	7.73	Conforme
19	4	73,17	3,51	4,80	/	7.73	Conforme
20	4	30,00	0,50	1,67	/	7.73	Conforme

¹⁹ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

²⁰ Conforme/non conforme



EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Biologie Prospective et Probioqual 2017/2018 Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo %	Cible (même technique) %	Cible (toutes techniques) %	Biais (%) / même technique	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite : RICOS souhaitable	Conclusion
2017 1A	55	56.3	/	-2.3	/	6.9	Conforme
2017 1B	64	64.1	/	-0.16	/	6.9	Conforme
2017 2A	43	44.2	/	-2.71	/	6.9	Conforme
2017 2B	18	17.6	/	2.27	/	6.9	Conforme
2018 1A	71	72	/	-1.38	/	6.9	Conforme
2018 1B	65	66.9	/	-2.84	/	6.9	Conforme
18SP01 (Probioqual 2018)	82	81.57	/	0.52	/	6.9	Conforme

Argumentaire de la conclusion : L'essai d'exactitude est conforme aux limites d'acceptabilité proposées par RICOS souhaitable.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Vrais positifs	/
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion : Non applicable méthode qualitative

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode EEQ/CIQ – Biologie prospective et Probioqual 2017/2018	ET Ricos souhaitable
Quantification de l'incertitude :	11.3%	15.4%

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) :

Les incertitudes évaluées sont conformes à la spécification définie (Ricos souhaitable). Critère satisfait, adapté aux besoins cliniques.



LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Limite de détection :	/

Argumentaire de la conclusion : **Non applicable. Méthode qualitative**

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	OMS 2010
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Etude comparative sur 2 aliquots (Cf. tableau ci-dessous)
Nombre de mesures :	10 échantillons
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	33 à 90 %
Méthode d'exploitation des résultats :	Selon OMS 2010 - Table 2.1 Acceptable differences between two percentages for a given average, determined from replicate counts of 200 spermatozoa (total 400 counted)
Equation de la droite de régression :	/
Diagramme des différences et/ou des rapports :	/

N° dossier	Date	1er aliquot					2ème aliquot					Moyenne des 2 aliquots	≠	Conformité /OMS 2010
		1ier comptage	2ième comptage	Moyenne	≠	Conformité/ OMS 2010	1ier comptage	2ième comptage	Moyenne	≠	Conformité/ OMS 2010			
6912	30/05/2018	76	69	72,5	7	Conforme	73	68	70,5	5	Conforme	71,5	2	Conforme
6914	30/05/2018	83	90	87,5	5	Conforme	84	89	86,5	5	Conforme	87	1	Conforme
6915	30/05/2018	70	78	74	8	Conforme	77	77	77	0	Conforme	75,5	3	Conforme
6919	30/05/2018	68	74	71	6	Conforme	72	78	75	6	Conforme	73	4	Conforme
6921	30/05/2018	76	68	72	8	Conforme	72	72	72	0	Conforme	72	0	Conforme
6908	31/05/2018	78	86	82	8	Conforme	84	76	80	8	Conforme	81	2	Conforme
6910	31/05/2018	75	66	70,5	9	Conforme	67	72	69,5	5	Conforme	70	1	Conforme
6913	31/05/2018	71	80	75,5	9	Conforme	78	75	76,5	3	Conforme	76	1	Conforme
6915	31/05/2018	37	36	36,5	1	Conforme	39	33	36	6	Conforme	36,25	0,5	Conforme
6927	31/05/2018	52	52	52	0	Conforme	51	53	52	2	Conforme	52	0	Conforme
6923	31/05/2018	65	73	69	8	Conforme	66	72	69	6	Conforme	69	0	Conforme
6904	01/06/2018	82	88	85	6	Conforme	83	84	83,5	1	Conforme	84,25	1,5	Conforme

Argumentaire de la conclusion : **Tous les résultats sont conformes les uns par rapport aux autres selon l'OMS 2010. Le laboratoire a donc décidé de réaliser un seul comptage sur un seul aliquot.**



ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
Limite de détection :	/	/
Limite de quantification :	/	/
Limite supérieure de linéarité :	/	/

Argumentaire de la conclusion : [Le domaine de mesures s'étend de 0 à 100% de formes vivantes](#)

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	/
Turbidité	/
Bilirubine, ictère	/
Médicaments	
Autres	<p>Lors du séchage du frottis, des cristaux de nigrosine susceptibles d'interférer avec l'interprétation des résultats se forment.</p> <p>Lors d'une faible concentration en spermatozoïdes dans le liquide spermatique (< 5 Millions/ml) (cas d'une oligozoospermie), la dilution (sperme/Eosine/Nigrosine) est trop forte d'où une lecture longue et aléatoire pour compter le peu de formes vivantes présentes : la vitalité ne sera pas réalisée, le LBM se basera sur la mobilité pour une décision thérapeutique.</p> <p>Cf. Fiche technique - Kit VitalSreen référence MT 281</p>

-Argumentaire de la conclusion : [Répond aux besoins du laboratoire](#)

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG, ...):	Méthode manuelle, lame à usage unique, un échantillon par lame. Pas de risque de contamination. Comme toute technique manuelle, le personnel est sensibilisé au risque d'interversion d'échantillon. Tout est mis en œuvre au niveau organisationnel et au niveau technique.
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	/

Argumentaire de la conclusion : [Répond aux besoins du laboratoire](#)



ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	/
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Réactifs conservés entre 2 et 8°C. Durée de vie après ouverture : se conformer à la date de péremption. Cf. Fiche technique - Kit VitalSreen référence MT 281

Argumentaire de la conclusion : Répond aux besoins du laboratoire

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	≥ 58% de formes vivantes (guide OMS 2010)

Argumentaire de la conclusion : Valeurs adaptées à notre méthode et cohérentes (par expérience) à notre population.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du 05/07/2018 (Par rapport aux critères de performance préétablis par le laboratoire)
Autorisée par : Dr XXXX Signature

Bibliographie :

- Référence 1 : OMS 2010: World Health Organization, « WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen », 2010, 5th ed., 271 pages (32-PMA-7DX-010-xx-BL)
- Référence 2 : A. ABBARA, « Paramètres du spermogramme – Normes de l'OMS », 03 décembre 2010, consulté le 01/12/2012 sur le site internet : http://www.aly-abbara.com/echographie/biometrie/scores/spermogramme_normes_oms.html
- Référence 3 : M. AUROUX, « Spermogramme, spermocytogramme, examens complémentaires », Feuilles de Biologie, 1993, volume 34, n° 192, p.51 à 58
- Référence 4 : Menkveld and Coll., 2001 – Human reprod., 16 :1165-1171
- Référence 5 : Dr. Alexandra MESNER, Professeur, Catherine POIROT, « Le spermocytogramme en images »
- Référence 6 : « Cahier de formation n°42 » (32-PMA-7DX-011-xx-BL)
- Référence 7 : J. AUGER et P. JOUANNET (traducteurs), « Manuel de laboratoire de l'OMS. Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical » - 1993 - Ed° INSERM



10.3 Exemple portant sur la calcémie (processus simple – méthode quantitative)

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) :
CALCIUM TOTAL
Portée A <input checked="" type="checkbox"/> ; Portée B <input type="checkbox"/>
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS DE VERIFICATION / VALIDATION			
Eléments à vérifier (argumentation)	Essai Biblio NA	Modalités de vérification/validation :	
3 Niveaux / 30 passages 2CIQ et un pool	E	<input checked="" type="checkbox"/>	1. Répétabilité
2 Niveaux / 30 passages CIQ par niveau	E	<input checked="" type="checkbox"/>	2. Fidélité intermédiaire
	NA	<input type="checkbox"/>	3. Variabilité inter-opérateurs
CIQ externalisé (Tiq.con ROCHE)	E	<input checked="" type="checkbox"/>	4. Justesse
Estimation sur 6 EEQ	E	<input checked="" type="checkbox"/>	5. Exactitude
	NA	<input type="checkbox"/>	6. Sensibilité et spécificité analytique
Estimation sur 6 EEQ	E	<input checked="" type="checkbox"/>	7. Incertitudes
Fiches techniques fournisseur	B	<input checked="" type="checkbox"/>	8. Etendue de mesure
Sur 41 échantillons patients	E	<input checked="" type="checkbox"/>	9. Comparaison de méthodes
Fiches techniques fournisseur	B	<input checked="" type="checkbox"/>	10. Interférences
Fiches techniques fournisseur	B	<input checked="" type="checkbox"/>	11. Contamination
	NA	<input type="checkbox"/>	12. Robustesse et fiabilité des réactifs
Fiches techniques fournisseur	B	<input checked="" type="checkbox"/>	13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procédera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :



DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Calcium Total
Principe de la Méthode :	Spectrophotométrie NM-BAPTA
Type d'échantillon primaire :	Plasma/sérum
Type de récipient, additifs :	Héparinate de lithium,
Prétraitement de l'échantillon :	Centrifugation : 2000 g à 20°C 10minutes
Unités :	mmol/L
Intervalles de référence ¹ :	90 ans : 2,05 – 2,40 mmol/L 60 - 90 ans : 2,20 – 2,55 mmol/L 18 - 60 ans : 2,15 – 2,50 mmol/L 2 - 12 ans : 2,20 – 2,70 mmol/L 10j - 2ans : 2,25 – 2,75 mmol/L <10jours :1,90 – 2,60 mmol/L
Marquage CE (Oui/Non) :	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	BT
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Analyseur 6000 N°1
Référence du réactif :	CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français
Matériau d'étalonnage (références) :	C.f.a.s (2,74 mmol/L) lot 167252 ver.1 SRM 956 c niveau 2
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Linéaire en 2points : H ₂ O (blanc) et C.f.a.s (2,74 mmol/L)

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	G.G.
Procédure de validation/mode opératoire :	00ANAP01M001
Procédure de gestion de la portée flexible :	00ANAP02
Période d'étude :	22 mai au 10 juin 2014
Date de 1 ^{ère} utilisation :	11 juin 2014

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



MAITRISE DES RISQUES				
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité¹	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)
Matière (échantillons)	Identitovigilance	5	Formation du personnel	Procédure d'identitovigilance du laboratoire 25PREP06M001
	Préparation du patient	1	Information des patients et préleveurs	Instructions de prélèvement 00PREP01D002 (manuel de prélèvement)
	Type de contenants	2	Formation des préleveurs Recommandé Héparinate de Li Acceptable sur tube sec ou gel, Non acceptable EDTA, oxalate, citrate	- Vérification à la réception 245PREP04M001 (réception des échantillons) - Instructions de prélèvement 00PREPP01D003 (fiche technique de prélèvement sanguin) - Critères d'acceptation/de refus 25PREP01D001 v4 (Catalogue des analyses, intranet de l'APHM) - 28GRHP01E002 (fiche de formation et d'habilitation des préleveurs)
	Nature et volume de l'échantillon	1	Contrôle à réception sang	
	Délai et température avant traitement analytique	1	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	
	Interférences	1	Formation des préleveurs Contrôle à réception	
	Prétraitement : centrifugation, ...	3	Conditions de centrifugation : 2000 g à 20°C 10minutes	Critères de centrifugation 25GRMP02M005D001 Vérification annuelle par prestataire externe
	Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	1	Métrologie/suivi des enceintes
Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)		2	Sondes reliées au logiciel Thermocontrol (OceaSoft) (23°C +/- 5°C)	Procédure de suivi des températures 25GRMP02M006 Métrologie des équipements 00GRMP03
Exigences environnementales pour le matériel		1	Suivi des conditions environnementales	Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur Enregistrements des conditions environnementales
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau	5	Mesure de la résistivité / stérilité	Surveillance de la résistivité de l'eau (résistivité > 15 m Ω)
	Surveillance des dérives	5	CIQ/EEQ Maintenance/métrologie des équipements	Enregistrements des maintenances 00GRMP02M001 (utilisation et maintenance des équipements)
	Contamination	2	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Bibliographie

¹ A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;



	Informatique embarquée (paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données)	3	Jeux d'essais Stockage et transmission des données	Enregistrements des jeux d'essai Contrat de maintenance intégrité des données/jeux d'essais 25GRMPO4M001
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	3	Méetrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Fiches fournisseur
	Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks	3	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Marquage CE Contrôlés à la réception Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation) /Gestion des fournitures 00GRMP01
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	4	Méetrologie des pipettes Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Instructions de reconstitution Maitrise métrologique des pipettes 00GRMP03M002 Délai de reconstitution (Recommandations fournisseurs) Température de conservation (recommandations fournisseurs)
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	2	Bibliographie et/ou essai sur site	Documents fournisseur, résultats des essais 00ANAP01 (vérif. Validation de méthode)
	Causes d'incertitude de mesure	2	Calculs	00ANAP05 (évaluation des incertitudes de mesure) Bibliographie (RICOS erreur totale)
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	2	Procédure formation/habilitation du personnel, plan de formation	Enregistrements d'habilitation du personnel Gestion des ressources humaines LBM 00GHP01 Fiches d'habilitation des techniciens 25GRHP01E003 V 7



EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : sérum

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ¹)	Conclusion ²
Sérum PCC1	30	2.145	0.017	0.77	0.8	1.2 (SFBC)	conforme
Sérum PCC2	30	3.321	0.021	0.64	0.8	1.2 (SFBC)	conforme
Sérum Pool	30	1.777	0.018	1.01	0.8	1.2 (SFBC)	conforme

Argumentaire de la conclusion : CONFORME

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ³)	Conclusion ⁴
Sérum PCC1	41	2.17	0.028	1.293	0.8	1.6 (SFBC)	conforme
Sérum PCC2	40	3.365	0.0376	1.118	0.9	1.6 (SFBC)	conforme

Argumentaire de la conclusion : CONFORME

VARIABILITE INTER-OPERATEURS	
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion :

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)								
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeur moyenne Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite ¹	Conclusion ⁵
antillon niveau 1	89	2,171	2,183	-0,50 %	/	-0,87 %	1,7 (SFBC)	conforme
antillon niveau 2	90	3,349	3,384	-1,00 %	/	-0,92 %	1,7 (SFBC)	conforme

Argumentaire de la conclusion : CONFORME

¹ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

² Conforme/non conforme

³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

⁴ Conforme/non conforme

⁵ Conforme/non conforme



EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons BIORAD EQUAS	Valeur Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de paires	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite ¹	Conclusion ²
Cycle 12 échantillon 1	2.09	2.16	2.13	-3.24	-1.88	2.3	Acceptable/ toutes techniques
Cycle 12 échantillon 2	3.14	3.23	3.17	-2.79	-0.95	2.3	Acceptable/ toutes techniques
Cycle 12 échantillon 3	4.03	4.12	4.02	-2.18	0.25	2,3 (SFBC)	conforme
Cycle 12 échantillon 4	1.43	1.46	1.45	-2.05	-1.38	2,3 (SFBC)	conforme
Cycle 12 échantillon 12	3,15	3,22	3,16	-2,17	-0,32	2,3 (SFBC)	conforme
Cycle 13 échantillon 1	3,1	3,11	3,08	-0,32	0,65	2,3 (SFBC)	conforme

Argumentaire de la conclusion : conforme /toutes techniques. Echantillons 1 & 2 > limite acceptable/ groupe de paires mais écart faible sans impact clinique ($\Delta < 0.09$ mmol/L)

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Vrais positifs	/
Faux positifs	
Valeur prédictive négative	
Valeur prédictive positive	

Argumentaire de la conclusion : technique quantitative

INCERTITUDES DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Calculée à partir de la fidélité souhaitable et biais souhaitable (Ricos, 2014)	Exigence fournisseur : 6,3%
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	1.76 ± 0.098 mmol/L ou 1.76 ± 5.587 %	
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	3.365 ± 0.130 mmol/L ou 3.365 ± 3.889 %	

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Incertitude calculée > erreur totale souhaitable RICOS (2,55%). Incertitude de l'ordre de 5% sans impact sur l'interprétation des résultats est désormais intégrée dans la procédure de validation.

Référence : Validation of methods for routine biochemistry analytes at analyzer series module c501 Biochemia medica, 2011, 21, 182-90 : erreur totale 6,3%

¹ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

² Conforme/non conforme, argumentaire de la conclusion



LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Limite de détection :	LD trouvée ou référence bibliographique

Argumentaire de la conclusion : portée A

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications, ...)	Données fournisseur
Méthodes comparées : méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareils en miroir ou back-up, EBMD, ...	Analyseur 1 (ancien appareil du laboratoire) versus Analyseur 2 6000 N°1
Nombre de mesures :	41
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	De 1.4 mmol/L à 4.1 mmol/L
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres rectangles
Equation de la droite de régression :	$y = 0.98x + 0,0$; $r=0.997$
Exploitation des résultats de comparaison (diagramme de différences, concordance catégorielle) :	Diagramme des différences (normes de suivi SFBC)
	Diagramme des rapports

Argumentaire de la conclusion : CONFORME



ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	NA
Limite de quantification :	(Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français) LQ = 0,20 mmol/L
Limite supérieure de linéarité :	(Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français) Limite de linéarité : 5,00mmol/L

Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	(Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français) Pas d'interférence si indice H < 1000 soit 621 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobine
Turbidité	(Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français) Pas d'interférence si indice L < 1000
Bilirubine, ictère	(Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français) Pas d'interférence si indice I < 60 soit 1026 $\mu\text{mol/L}$ de bilirubine
Médicaments	(Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français) Pas d'interférence décrite

Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, <input type="checkbox"/>HCG, ...):	/
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	/

Argumentaire de la conclusion : non pertinent pour le paramètre Ca

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	/
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	/

Argumentaire de la conclusion : non indispensable en portée A

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils (étude expérimentale indispensable en portée B en fonction des données démographiques) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Fiche technique fournisseur CA2 05061482 190 2013-10, V 3.0 Français (cf tableau description de la méthode)

Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire



DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion : méthode conforme répondant aux critères retenus par le laboratoire et utilisée à partir du 11 juin 2014

Autorisée par : AML Biologiste responsable technique
Signature :

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



10.4 Exemple portant sur la recherche d'anticorps érythrocytaires (Dépistage)

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Recherche d'Agglutinines Irrégulières Dépistage (RAID) sur automate XX du site de XX N° série XX Vérification en portée A Vérification initiale réalisée du XX/XX/XXX au XX/XX/XXXX sur le site de XXXX
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Recherche d'Agglutinines Irrégulières Dépistage (RAID) sur automate XX du site de XX N° série XXXX	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.



SOUS-PROCESSUS 1 :
Recherche d'Agglutinines Irrégulières Dépistage (RAID)
sur automate XX du site de XX N° série XX

Portée A ; Portée B (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte / Mesurande :	Dépistage d'anticorps (Ac) circulants dirigés contre des antigènes (Ag) érythrocytaires (via un panel de dépistage) autre que ABO
Principe de la Méthode :	<p>Hémagglutination dans microplaque avec lecture automatisée des agglutinats par caméra.</p> <p>Les hématies-tests du panel pré-magnétisées sont mises en contact avec le sérum ou plasma du patient avec un diluant à la surface d'un gel distribué au préalable dans les puits d'une microplaque où est adsorbée une antiglobuline anti-IgG.</p> <p>Après une incubation de 20 minutes à 37°C, la microplaque est placée sur une plaque aimantée. Les hématies migrent rapidement (à travers le gel) au fond du puits, tandis que les éventuels anticorps libres plasmatiques restent à la surface et n'interfèrent pas avec l'antiglobuline.</p> <p>Après agitation, les hématies libres forment un point au fond du puits (réaction négative), alors que les hématies sensibilisées adhèrent à l'antiglobuline et forment une couche cellulaire plus ou moins grande (réaction positive).</p> <p>L'automate sécurise le lien échantillon – support réactionnel – résultat (lecture automatisée des agglutinats par caméra) et assure la traçabilité des réactifs utilisés.</p>
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Tubes utilisables : - Sang recueilli sur EDTA, citrate ou héparine et sur tube sec.
Prétraitement de l'échantillon : Centrifugation des échantillons (préconisation fournisseur) = 5min – 2500g	Centrifugation pour séparer les phases plasmatiques et globulaire.
Unités :	Pas d'unité : analyse qualitative
Critères d'interprétation²¹ :	Résultat qualitatif exprimé en termes d'intensité de l'agglutinat : réaction sous la forme de croix sur échelle discontinue de valeur, de « - à ++++ » et « ? » pour des résultats « non-interprétables » (anticorps faible, interférences liées à l'échantillon...).
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui

²¹ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



<p>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</p> <p>Ces équipements font l'objet d'étalonnage et de vérification métrologique selon la « Procédure générale de métrologie »</p>	<p>L'automate est un système d'analyse entièrement automatisé.</p> <p>Le logiciel embarqué permet l'obtention du résultat qui est transféré au concentrateur de données puis vers SIL du laboratoire.</p> <p>Instruments intermédiaires :</p> <ul style="list-style-type: none">- Centrifugeuse d'échantillons primaires- Enceinte thermostatée à 5°C +/-3°C pour le stockage des réactifs- Enceinte thermostatée à 5°C +/-3°C pour le stockage des échantillons sanguins après analyse <p>Informatique :</p> <ul style="list-style-type: none">- SIL du laboratoire- Concentrateur de données
<p>Référence du réactif :</p>	<p>Panel d'hématies-tests prêt à l'emploi</p> <p>Supports réactionnels / Diluants</p>
<p>Matériau d'étalonnage (références) :</p>	<p>CIQ comprenant :</p> <ul style="list-style-type: none">- Anti-RH1 (anti-D) de titre ≤ 4- Anti-FY1 (anti-Fya) de titre ≤ 4 <p>Pour le test de contamination : anti-RH1 (D)</p> <p>Pour la limite de détection : anti-RH1 (D) humain</p>
<p>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</p>	<p>Contrôle Qualité Interne (CQI) :</p> <ul style="list-style-type: none">- CQI quotidien (1fois par jour) <p>Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)</p> <ul style="list-style-type: none">- 4 par an pour la RAI



MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Techniciens habilités du laboratoire, stagiaire IUT et cadre médico-technique du laboratoire du site.
Procédure de validation/mode opératoire :	<p>« Procédure de choix et de vérification/validation d'une méthode »</p> <p>« Procédure de choix et validation des méthodes d'analyses au LBM »</p> <p>« Protocole de qualification d'un automate complet en Immuno-Hématologie Erythrocytaire (IHE) »</p> <p>« Protocole de vérification/validation de méthode : Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) dépistage et identification et Epreuve directe de compatibilité (EDC) »</p> <p>« Fiche simplifiée pour la vérification/validation de méthode : RAI (dépistage et identification) »</p> <p>Mode opératoire « RAI : Dépistage d'anticorps anti-érythrocytaires »</p> <p>« Protocole de validation du transfert informatique des résultats d'analyses sur automates vers le logiciel médico-technique »</p>
Procédure de gestion de la portée flexible :	« Procédure de gestion de la portée d'accréditation et de gestion du changement »
Période d'étude :	Sur le site, Validation technique du XX/XX/XXX au XX/XX/XXXX
Date de 1^{ère} utilisation :	Sur le site de XXXX, 1 ^{ère} utilisation le XX/XX/XXXX



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	5	Identitovigilance	Procédure nationale de « Gestion des identités patients »
			Formation et information du personnel	« Procédure d'habilitation du personnel LBM » Procédure de « Prise de poste, suspension et réhabilitation » Fiche « Critères et fiche d'habilitation du personnel IHE » Procédure de « Maintien des compétences du personnel LBM » Fiche de « Maintien des compétences du personnel LBM (hors biologistes) » Procédure de « Gestion des évaluations externes de la qualité au LBM »
			Bons de demande d'examens (prescription) Non-conformité à réception	Mode opératoire d' « Aide à la gestion des non conformités des demandes d'examens et des prélèvements » Mode opératoire de « Réception et enregistrement des demandes d'examens IHE au LBM »
	Préparation du patient	2	Information des patients et préleveurs Définir les modalités de prélèvement.	« Manuel Prélèvement du LBM »
	Type de contenants	3	Formation des préleveurs	Instructions de prélèvement Critères d'acceptation/de refus

²² A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Nature et volume de l'échantillon	3	Contrôle à réception Tube de sang prélevé sur tube EDTA. Echantillons sanguins datant de moins de 72 heures Volume suffisant	« Manuel Prélèvement du LBM » Mode opératoire de « Réception et enregistrement des demandes d'examens IHE au LBM »
	Délai et température avant traitement analytique	3	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	Mode opératoire « Aide à la gestion des non conformités des demandes d'examens et des prélèvements »
	Prétraitement : centrifugation, ...	3	Conditions de centrifugation : Centrifugation de l'échantillon primaire pendant 5 minutes à 2500g	Critères de centrifugation Mode opératoire de « Centrifugation des prélèvements avant analyse »
	Interférences	3	Formation des préleveurs Contrôle à réception	Instruction de formation du personnel « Manuel Prélèvement du LBM » Mode opératoire de « Réception et enregistrement des demandes d'examens IHE au LBM » Mode opératoire d'« Aide à la gestion des non conformités des demandes d'examens et des prélèvements »



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Milieu	<p>Conditions de conservation des échantillons (t°, ...) Conservation des prélèvements – rajout d'examen</p> <p>Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...) Ces équipements ont fait l'objet d'étalonnage et vérification métrologique selon la procédure générale de métrologie</p>	3	<p>Durée de conservation des échantillons après examen Reprise de travaux sur ces échantillons</p> <p>Métrologie/suivi des enceintes Enceintes thermostatées à 5°C +/-3°C pour le stockage des échantillons après analyse et pour le stockage des réactifs</p>	<p>Instructions de conservation : Instruction d'utilisation de l'automate</p> <p>Mode opératoire de « Rappel des travaux non-conformes »</p> <p>Mode opératoire de Gestion des échantillons (conservation et destruction)</p> <p>Procédure « Le circuit de l'achat au LBM »</p> <p>« Procédure de Gestion des Equipements Biomédicaux »</p> <p>« Procédure de Gestion de la Maintenance Corrective des Equipements Biomédicaux »</p> <p>« Procédure de Gestion de la Maintenance Préventive des Equipements Biomédicaux »</p> <p>Contrats de maintenance préventifs et curatifs Certificats d'étalonnage (tachymétrie, gravimétrie, température)</p> <p>Enregistrements métrologiques des enceintes réfrigérées : suivi par le logiciel Labguard</p> <p>Mode opératoire « Qualification des enceintes à températures contrôlées »</p> <p>Mode opératoire « Maintenance et nettoyage du matériel du laboratoire »</p> <p>Mode opératoire « Conduite à tenir en cas de panne d'un matériel »</p> <p>Certificats d'étalonnage (tachymétrie, gravimétrie, température)</p>



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Milieu	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	3	Conditions environnementales (statiques et/ou dynamiques dans le temps) Lecture à la lumière du jour	Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur Instruction d'utilisation de l'automate Enregistrements des conditions environnementales : suivi par le logiciel Labguard. La sonde d'ambiance des laboratoires est programmée sur 21°C +/- 3°C « Grille de qualification opérationnelle des locaux transfusionnels » Procédure « Nature, utilisation et gestion des contrôles internes de qualité au laboratoire »
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau		Mesure de la résistivité / stérilité	Traçabilité des vérifications Non applicable



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (équipements)	Surveillance des dérives	3	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...)	Enregistrements des maintenances Fiche « Opération de maintenance » Mode opératoire « Maintenance et nettoyage du matériel du laboratoire IHE » Traçabilité métrologique « Procédure générale de métrologie » Cf. rapports de maintenance préventive ou constat de vérification CIQ/EEQ La surveillance des dérives est également effectuée par le suivi des CIQ et EEQ Procédure « Gestion des évaluations externes de la qualité au LBM » Procédure « Nature, utilisation et gestion des contrôles internes de qualité au laboratoire » Mode opératoire de « Gestion des indicateurs qualité au laboratoire »
Matériel (équipements)	Contamination	3	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Bibliographie et/ou enregistrement de l'essai sur site Instruction d'utilisation de l'automate Notice fournisseur Procédure « Prise de poste, suspension et réhabilitation » « Critères et fiche d'habilitation du personnel IHE »



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (équipements)	Informatique embarquée Cf. Fiche de validation « Transfert informatique » réalisé le 27/10/2021	5	Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ... Non interprétation de l'automate nécessitant une lecture par le technicien (hémolyse, etc...)	Jeux d'essais des transferts automatés –Concentrateur de données - SIL. « Protocole de validation du transfert informatique des résultats d'analyses sur automatés vers le logiciel médico-technique » Enregistrements des jeux d'essai Algorithmes décisionnels du concentrateur de données Transfert automate bidirectionnel du SIL vers automate via le concentrateur de données Mode opératoire « CAT en cas de panne d'un matériel » Mode opératoire « Conduite tenir en cas de panne informatique » Procédure « Fonctionnement en mode dégradé dans le LBM »



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	3	Métrie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Fiches fournisseur Traçabilité métrie « Grille de qualification opérationnelle des locaux » Enregistrements des conditions environnementales. La sonde d'ambiance du laboratoire est programmée sur un intervalle de 21°C +/- 3°C Mode opératoire de « Qualification des enceintes à températures contrôlées » Mode opératoire de « Maintenance et nettoyage du matériel du LBM » Procédure de « Prise de poste, suspension et réhabilitation » « Critères et fiche d'habilitation du personnel »



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Gestion des stocks	3	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison) « Gestion des réactifs et consommables au LBM » Procédure « Contrôle et validation à réception des réactifs et consommables » « Formulaire de contrôle à réception de réactif, réactant et consommable » « Liste des réactifs et fournisseurs critiques par analyse et des fournisseurs de prestation pour le LBM » « Liste des analyses _ Matériel critique utilisé _ Fournisseurs » Mode opératoire « Réactovigilance » Inventaire mensuel Abonnement
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	/	Métrologie des pipettes Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution Non applicable
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	5		Données bibliographiques : Notices, documents, spécifications du fournisseur
Méthode	Causes d'incertitude de mesure	/	Calcul des incertitudes de mesure (non quantifiable pour les méthodes qualitatives)	Non applicable : méthode qualitative



MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité²²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	3	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation	Enregistrements des compétences du personnel « Procédure d'habilitation du personnel LBM » Procédure « Prise de poste, suspension et réhabilitation » « Critères et fiche d'habilitation du personnel IHE » « Maintien des compétences du personnel LBM (hors biologistes) » « Suivi des compétences du personnel LBM » Attestation de formation fournies par le fournisseur
			Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure (par exemple tests à lecture subjective)	Traçabilité de l'occupation des postes de travail Traçabilité de l'occupation des postes dans le logiciel de gestion du temps de travail « Planning du service »



Après analyses des points critiques, nous n'observons aucun risque résiduel.

Tous les points critiques relevés sont maîtrisés par les éléments indiqués et surveillés par le laboratoire par le biais des Fiches de Non-Conformité.

Eléments de suivi mis en place :

- Surveillance des CIQ : « Nature, utilisation et gestion des contrôles internes de qualité au LBM »
- Surveillance des résultats des EEQ : « Gestion de l'Evaluation externe de la Qualité du LBM »

Eléments de dysfonctionnement et analyses de tendance :

- A travers les dysfonctionnements (FNC) : « Gestion des non-conformités, des réclamations clients et des dérogations »
- A travers les indicateurs : « Gestion des indicateurs qualité au laboratoire IHE »

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : **sang total**

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ²³)	Conclusion ²⁴
CIQ	30	NA*	NA*	NA*	NA*	NA*	Conforme

*méthode qualitative

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : 5 passages d'un même CIQ le même jour par le même opérateur dans les mêmes conditions sur 6 CIQ différents

Résultats :

Répétabilité							
Échantillons	Opérateur	Date	Résultat				Conclusion
			3+	3+	-	POS	
CQI UPR RH1 Lot 9171822	Yoann	20/04/2021	3+	3+	-	POS	Conforme
			4+	3+	-	POS	
			4+	3+	-	POS	
			4+	3+	-	POS	
			4+	3+	-	POS	
SERA CQI D Lot 405000	Yoann	20/04/2021	4+	4+	-	POS	Conforme
			4+	4+	-	POS	
			4+	4+	-	POS	
			4+	4+	-	POS	
CQI UPR FY1 Lot 9171822	Yoann	20/04/2021	-	3+	3+	POS	Conforme
			-	3+	3+	POS	
			-	3+	3+	POS	
			-	3+	3+	POS	
SERA CQI FYA Lot 405000	Yoann	20/04/2021	-	3+	2+	POS	Conforme
			-	3+	2+	POS	
			-	3+	2+	POS	
			-	3+	1+	POS	
CQI UPR NEG lot 7111822	Yoann	20/04/2021	-	-	-	NEG	Conforme
			-	-	-	NEG	
			-	-	-	NEG	
			-	-	-	NEG	
SERA CQI NEG Lot 405000	Yoann	20/04/2021	-	-	-	NEG	Conforme
			-	-	-	NEG	
			-	-	-	NEG	
			-	-	-	NEG	

Performance attendue : répétabilité avec un maximum 1+ de différence entre les passages.

Conclusion : Répétabilité **conforme** aux performances attendues.

²³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

²⁴ Conforme/non conforme



FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
CIQ	5 par CIQ	NA*	NA*	NA*	NA*	NA*	Conforme

*méthode qualitative

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : 5 passages d'un même CIQ en faisant varier le jour de passage sur 6 CIQ différents.

Résultats :

Fidélité Intermédiaire							
Échantillons	Opérateur	Date	Résultat				Conclusion
CQI UPR RH1 Lot 9171822	Yoann	12/04/2021	3+	3+	-	POS	conforme
		14/04/2021	3+	3+	-	POS	
		15/04/2021	4+	3+	-	POS	
		20/04/2021	3+	3+	-	POS	
		21/04/2021	3+	3+	-	POS	
CQI UPR FY1 Lot 9171822	Yoann	12/04/2021	-	3+	3+	POS	conforme
		14/04/2021	-	3+	3+	POS	
		15/04/2021	-	3+	3+	POS	
		20/04/2021	-	3+	3+	POS	
		21/04/2021	-	3+	3+	POS	
CQI UPR NEG lot 7111822	Yoann	12/04/2021	-	-	-	NEG	conforme
		14/04/2021	-	-	-	NEG	
		15/04/2021	-	-	-	NEG	
		20/04/2021	-	-	-	NEG	
		21/04/2021	-	-	-	NEG	
SERA CQI D Lot 405000	Yoann	12/04/2021	4+	4+	-	POS	conforme
		14/04/2021	4+	4+	-	POS	
		15/04/2021	4+	4+	-	POS	
		20/04/2021	4+	4+	-	POS	
		21/04/2021	4+	4+	-	POS	
SERA CQI FYA Lot 405000	Yoann	12/04/2021	-	3+	2+	POS	conforme
		14/04/2021	-	3+	2+	POS	
		15/04/2021	-	3+	2+	POS	
		20/04/2021	-	3+	1+	POS	
		21/04/2021	-	3+	2+	POS	
SERA CQI NEG Lot 405000	Yoann	12/04/2021	-	-	-	NEG	conforme
		14/04/2021	-	-	-	NEG	
		15/04/2021	-	-	-	NEG	
		20/04/2021	-	-	-	NEG	
		21/04/2021	-	-	-	NEG	

Performance attendue : fidélité intermédiaire avec un maximum 1+ de différence entre les passages.

Conclusion : Fidélité intermédiaire **conforme** aux performances attendues



VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Mar	Conforme
Sop	
Aga	
Ana	
Cha	

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : 5 passages d'un même CIQ en faisant varier l'opérateur sur 6 CIQ différents.

Résultats

Variabilité inter-opérateur							
Échantillons	Opérateur	Date	Résultat				Conclusion
CQI UPR RH1 Lot 9171822	Marjorie	22/04/2021	4+	3+	-	POS	Conforme
	Sophia		4+	3+	-	POS	
	Agathe		3+	3+	-	POS	
	Anaïs		4+	3+	-	POS	
	Charlène		3+	3+	-	POS	
CQI UPR FY1 Lot 9171822	Marjorie	22/04/2021	-	3+	3+	POS	Conforme
	Sophia		-	3+	3+	POS	
	Agathe		-	3+	3+	POS	
	Anaïs		-	4+	3+	POS	
	Charlène		-	4+	3+	POS	
CQI UPR NEG lot 7111822	Marjorie	22/04/2021	-	-	-	NEG	Conforme
	Sophia		-	-	-	NEG	
	Agathe		-	-	-	NEG	
	Anaïs		-	-	-	NEG	
	Charlène		-	-	-	NEG	
SERA CQI D Lot 405000	Marjorie	22/04/2021	4+	4+	-	POS	Conforme
	Sophia		4+	4+	-	POS	
	Agathe		4+	4+	-	POS	
	Anaïs		4+	4+	-	POS	
	Charlène		4+	4+	-	POS	
SERA CQI FYA Lot 405000	Marjorie	22/04/2021	-	3+	2+	POS	Conforme
	Sophia		-	3+	2+	POS	
	Agathe		-	3+	2+	POS	
	Anaïs		-	3+	2+	POS	
	Charlène		-	3+	2+	POS	
SERA CQI NEG Lot 405000	Marjorie	22/04/2021	-	-	-	NEG	Conforme
	Sophia		-	-	-	NEG	
	Agathe		-	-	-	NEG	
	Anaïs		-	-	-	NEG	
	Charlène		-	-	-	NEG	

Performance attendue : variabilité avec un maximum 1+ de différence entre les opérateurs.

Conclusion : Variabilité inter-opérateur **conforme** aux performances attendues



JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite ⁴	Conclusion ⁵

Argumentaire de la conclusion :
NA, analyse qualitative

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite ⁴	Conclusion ⁵
EEQ	Positif	Positif	positif		NA*		conforme

*méthode qualitative

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : Une approche de l'exactitude est réalisée par l'analyse des résultats d'EEQ.
Critère de performance attendu : résultat identique au résultat attendu = 100% de concordance
Conclusion : exactitude **conforme** aux performances attendues

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
Vrais positifs	159	Fidélité $(VP/(VP+FP))*100 = 99\%$
Faux positifs	2	
Vrais négatifs	220	Justesse $((VP+VN)/(VP+VN+FP+FN))*100 = 95\%$
Faux négatifs	19	

Partie 1

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : passage de 200 échantillons de spécificité connue (160 positifs et 240 négatifs) : comparaison entre le résultat du dépistage sur automate et le résultat attendu en fonction de l'absence/présence d'anticorps dans le sérum du patient.

Résultats :

Fidélité : $(VP/(VP+FP))*100 = 99\%$

Justesse : $((VP+VN)/(VP+VN+FP+FN))*100 = 95\%$

Critère de performance attendu : Une méthode qualitative est d'autant plus fidèle et juste que les valeurs sont proches de 100%

Conclusion : Le dépistage RAI est une méthode **juste** et **fidèle**.



Partie 2
Stabilité des échantillons

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : étude de la stabilité des échantillons par réalisation de l'analyse à J0, 24H à température ambiante, J7 à 5°C +/- 3°C (N°305584774,305585037,305584936,305584880,305585380,305592521,305592394 et CQI réalisés sur le site)

Critère de performance attendu :100% de concordance : un test négatif doit rester négatif et un test positif doit rester positif avec au maximum 1+ de différence entre les deux résultats

Résultats :

Stabilité des échantillons															
n° patient	J0			Conservation 24h à T° ambiante =J1				Conservation 7 jours à 5°C +/-3°C =J7							
	Date	Résultat		Date	Résultat		Conclusion	Date	Résultat		Conclusion				
108424774	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424740	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424707	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424693	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424651	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424626	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424731	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424600	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424618	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424758	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424750	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424758	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424898	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424871	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424901	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424961	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424944	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425258	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425282	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425312	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425304	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425339	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425321	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425401	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425380	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108430022	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108430120	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108430057	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108430081	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108430065	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108430031	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425363	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425266	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425240	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425193	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108424952	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425215	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
108425134	20/04/21	-	-	NEG	21/04/21	-	-	NEG	conforme	27/04/21	-	-	NEG	conforme	
CQI : T-	14/09/21	-	-	NEG	15/09/21	-	-	NEG	conforme	21/09/21	-	-	NEG	conforme	
CQI : Fya	14/09/21	4+	-	4+	POS	15/09/21	4+	-	3+	POS	21/09/21	3+	-	3+	POS
CQI : D	14/09/21	3+	3+	-	POS	15/09/21	2+	3+	-	POS	21/09/21	3+	3+	-	POS
305584774	14/09/21	(+)	1+	(+)	POS	15/09/21	(+)	2+	(+)	POS	21/09/21	(+)	2	(+)	POS
305584936	14/09/21	1+	1+	1+	POS	15/09/21	1+	2+	1	POS	21/09/21	(+)	1+	1	POS
305584880	14/09/21	4+	4+	(+)	POS	15/09/21	4+	4+	(+)	POS	21/09/21	4+	4+	(+)	POS
305585380	14/09/21	-	3+	-	POS	15/09/21	-	4+	-	POS	21/09/21	-	4+	-	POS
305592521	21/09/21	4+	4+	-	POS	22/09/21	4+	4+	-	POS	28/09/21	4+	4+	-	POS
305592394	21/09/21	4+	-	-	POS	22/09/21	4+	-	-	POS	28/09/21	4+	-	-	POS
108444783	04/05/21	2+	2+	2+	POS	05/05/21	2+	2+	2+	POS	11/05/21	2+	2+	1+	POS
108445194	04/05/21	1+	3+	-	POS	05/05/21	2+	3+	-	POS	11/05/21	2+	3+	-	POS
108447111	05/05/21	(+)	1+	-	POS	05/05/21	1+	1+	-	POS	12/05/21	1+	1+	-	POS

Conclusion : Stabilité des échantillons conforme aux performances attendues.



INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : Une analyse de risque est réalisée tout au long du processus

Critère de performance attendu : absence d'interférence résiduelle

Résultats : les éléments vérifiés lors de la validation de méthode montrent qu'il n'y a pas de risque résiduel.

Conclusion : incertitude de mesure **conforme** aux performances attendues.

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (Étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : RAI dépistage sur automate réalisé sur une gamme de dilution préparée à partir de l'étalon de référence anti-RH1 standard (INTS)

Critère de performance attendu : détection d'un anti-RH1 à 10ng/mL

Résultats : détection de l'anti-RH1 entre 0,288 et 0,575ng/mL

Limite de détection		
Dilution	Concentration en ng/mL	Qwalys
0	920,000	
1	18,400	2+ 4+ -
2	9,200	2+ 3+ -
3	4,600	1+ 2+ -
4	2,300	(+) 1+ -
5	1,150	(+) (+) -
6	0,575	- (+) -
7	0,288	- - -
8	0,144	- - -
9	0,072	- - -
10	0,036	- - -

Conclusion : Limite de détection **conforme** aux critères de performance attendu.



COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Fiche technique fournisseur « Liste des documents externes et bibliographie »
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Automate de référence comparé aux deux autres automates du LBM
Nombre de mesures : Site pilote : <ul style="list-style-type: none"> • Au moins 20 échantillons dépourvu de tout allo anticorps avec l'ancienne méthode • Au moins 20 échantillons de patient immunisés (les spécificités des anticorps doivent regrouper les systèmes les plus immunogènes (RH, KEL, FY, JK et MNS), inclure des anticorps de faible concentration réagissant uniquement avec les hématies homozygotes pour l'antigène correspondant 	« Protocole de vérification/validation de méthode : Recherche d'Anticorps anti-érythrocytaires (RAI) dépistage et identification et épreuve directe de compatibilité » « Fiche simplifiée pour la vérification/validation de méthode : RAI dépistage et identification »
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire : Critère de performance attendu : 100% de concordance entre les méthodes comparées en terme de positivité.	« Protocole de vérification/validation de méthode : Recherche d'Anticorps anti-érythrocytaires (RAI) dépistage et identification et épreuve directe de compatibilité » « Fiche simplifiée pour la vérification/validation de méthode : RAI dépistage et identification »
Méthode d'exploitation des résultats :	NA, analyse qualitative
Equation de la droite de régression :	NA, analyse qualitative
Diagramme des différences et/ou des rapports :	NA, analyse qualitative

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : Etude de corrélation (comparaison de méthode) entre les automates.

Critère de performance attendu : 100% de concordance en termes de positivité.

Résultats : Sur 400 échantillons testés, 27 discordances décrites ci-dessous :

		Qwalys	
		neg	pos
automate de comparaison	résultat dépistage		
	neg		12*
	pos	15**	

- Parmi les 12 échantillons retrouvés pos sur l'automate de référence et neg en technique carte gel : 3 anti-RH1 et 1 anti-JK1 en limite de méthode, 4 faux positifs, 1 anticorps anti-Cw dont la détection n'est pas une obligation réglementaire en dépistage, 1 anti-MNS2, 1 anti-JK1 et 1 anti-FY1 de faible intensité.
- Parmi les 15 échantillons retrouvés neg sur l'automate de référence et pos en technique carte gel : 6 anticorps dont la détection n'est pas une obligation réglementaire en dépistage (2 anti-LE, 1 anti-P1, 2 anti-RH8, 1 anti-KEL3), 2 anti-MNS1 et 2 anti-RH3 de nature IgM , 1 faux positif, 1 anti-KEL1 et 1 anti-MNS3, 1 anti-E et anti-C en limite de méthode.

Les discordances sont acceptables après analyse compte tenu du fait que chaque technique présente ses propres limites de détection.

Conclusion : Comparaison de méthode conforme aux performances attendues



ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour :
troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion :

NA, analyse qualitative

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine,
médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Hémolyse	Fiche technique fournisseur : « Manuel Prélèvement du LBM » « Gestion des non-conformités à réception des demandes d'examens » « Bon de demande d'examens »
ictère	
lipémie	
microtube	
daratumumab	

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : Si possible, réalisation d'une analyse de risque en testant des échantillons de patients particuliers (hémolyse, traitement, microtubes)

Critère de performance attendu : absence d'interférence pour patients particuliers testés.

Interférence				
n° patient	Particularité	Date	Résultat	Conclusion
108108442	Microtubes	12/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108413527	Microtubes	12/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108413501	Microtubes	12/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108416372	Microtubes	12/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108416534	Plasma hémolysé	14/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108417859	Plasma hémolysé	15/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108417875	Plasma hémolysé	15/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108418260	Plasma hémolysé	15/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
108423131	Plasma très hémolysé	21/07/2021	Conforme	Pas d'interférence
108434729	Plasma très hémolysé	23/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
404289870	Traitement Daratumumab	15/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
504289870	Traitement Daratumumab	15/04/2021	Conforme	Pas d'interférence
305429302	Traitement Daratumumab	15/04/2021	Conforme	Pas d'interférence

Conclusion : l'hémolyse, les microtubes ainsi que le traitement par Daratumumab n'entraînent pas d'interférences sur la RAID : résultat **conforme** aux performances attendues.



CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(Étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion :

Méthode : L'absence de contamination a été vérifiée en analysant 8 échantillons positifs (CIQ anti-RH1) alternés avec 8 échantillons négatifs

Performance attendue : absence de contamination inter échantillon (résultat négatif reste négatif et résultat positif reste positif)

Résultats :

Ordre de passage sur l'automate	N°Patient	Résultat	Conclusion
1	9000800680	Positif	Conforme = pas de contamination inter-échantillons
	9000800698	Positif	
	9000800701	Positif	
	9000800710	Positif	
	9000800728	Positif	
	9000800736	Positif	
	9000800744	Positif	
	9000800752	Positif	
2	9000800761	Négatif	
	9000800779	Négatif	
	9000800787	Négatif	
	9000800795	Négatif	
	9000800809	Négatif	
	9000800817	Négatif	
	9000800825	Négatif	
	9000800833	Négatif	

Conclusion : L'étude montre l'absence de contamination inter-échantillons ce qui est **conforme** aux performances attendues. Au-delà de l'étude, pas d'impact étant donné que chaque dépistage positif donnera systématiquement lieu à une identification.



ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (Étude expérimentale indispensable en portée B) (Étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	Fiche technique fournisseur Respect des exigences fournisseurs
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Fiche technique fournisseur Respect des exigences fournisseurs

Argumentaire de la conclusion :

NA, respect des recommandations fournisseur.

Les fiches techniques des réactifs (en particulier celle des hématies) indiquent les conditions de conservation (durée, température) : les réactifs sont utilisés selon les recommandations du fournisseur.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>

Argumentaire de la conclusion :

NA, analyse qualitative.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : L'ensemble de ce rapport permet de déclarer « conforme » la méthode de Recherche d'Agglutinines Irrégulières Dépistage (RAID) sur automate XX N° série XXXXX sur le site de XXXX à partir du XX/XX/XXXX
Autorisée par : YYY YYYY – XX/XX/XXXX
Signature



11 TESTS STATISTIQUES A L'USAGE DE LA VERIFICATION/VALIDATION DE METHODES

La distribution des valeurs biologiques est définie par sa moyenne et sa variance (écart-type). L'objet de cette annexe est de proposer des outils statistiques pour confronter les caractéristiques des distributions.

L'objectif n'est pas de fournir des bases mathématiques mais d'illustrer avec des cas d'application comment choisir le test statistique le plus adapté au plan expérimental.

11.1 Répétabilité, Fidélité intermédiaire : détermination de l'intervalle de confiance du CV

11.1.1 Qu'est-ce qu'un intervalle de confiance ?

Au préalable de la comparaison de moyennes ou deux écart-types ou deux CV, il est important de définir l'intervalle de confiance (IC). Le seuil de 95% IC fait aujourd'hui l'objet d'un consensus pour de nombreux domaines, il signifie qu'on admet un risque d'erreur de 5%. Un intervalle de confiance à 95% est une plage de valeurs pour laquelle il est certain à 95% qu'elle contient la vraie moyenne de la population.

Plus la taille de l'échantillon (n) est importante plus l'intervalle est fin avec un même degré de confiance (Cf. Figure 1)

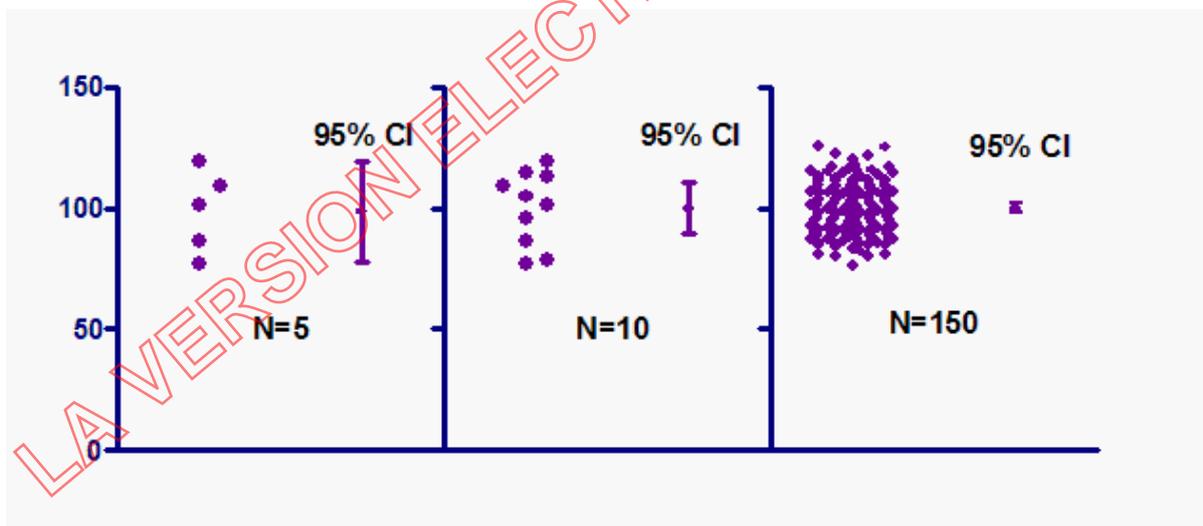


Figure 1 : Impact de la taille de l'échantillon sur l'intervalle de confiance.



11.1.2 Détermination d'un intervalle de confiance

Intervalle de confiance		
	n > 30 échantillons	Ecart type (n ≤ 30 échantillons)
Moyenne	$IC_m = \pm t \times \frac{s}{\sqrt{n}}$	$IC_m = \pm t \times \frac{s}{\sqrt{n}}$ avec ddl = n-1
Ecart type	$IC_s = \pm t \times \frac{s}{\sqrt{2n}}$	Borne inférieure (coefficient KI) = $\sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}}}$ Borne supérieure (coefficient KS) $= \sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}}}$
CV%	$IC_{CV\%} = \pm t \times \frac{s}{\sqrt{2n}}$	Borne inférieure (coefficient KI) = $\sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}}}$ Borne supérieure (coefficient KS) $= \sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}}}$
Pourcentage	$IC_{\%} = \pm t \times \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$	
n = nombre d'échantillons, m = moyenne s = écart type, CV coefficient de variation t = coefficient recherche dans la table t de Student en fonction du nombre de degré de liberté ddl=n-1 χ^2		

Exemple : Un laboratoire a réalisé un essai de fidélité intermédiaire pour valider sa méthode de dosage de l'Afanitib par LC-MS/MS. Il obtient une première série de 10 résultats pour le niveau 40 ng/mL qui est utilisée pour établir le CV de la méthode :

nb d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats	49,91	43,96	45,87	38,05	34,14	35,10	36,39	42,15	42,75	37,38

Valeur moyenne de cet échantillon : m = 40,27

L'écart type : s = 4,612

CV% = 11,5, pour une limite acceptable de 15% pour le CV% (EMA 2011) le laboratoire conclut à la conformité.

Calcul de l'intervalle de confiance de ce CV% :

- Compte tenu de l'effectif de cet échantillon qui est inférieur à 30, le laboratoire détermine :

- la borne inférieure (coefficient KI) : $KI = \sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}}}$
- la borne supérieure (coefficient KS) : $KS = \sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}}}$



L'intervalle de confiance pour la borne inférieure avec $KI = \sqrt{\frac{9}{2,70}} = 1,825$ est de 9,4% avec le calcul suivant : $0,115 - (1,825 \times 0,115)$. Soit la borne inférieure du CV% = $20,9 - 11,5 = 9,4$.

L'intervalle de confiance pour la borne supérieure avec $KI = \sqrt{\frac{9}{17,53}} = 0,716$ est de 19,7% avec le calcul suivant : $0,115 + (0,716 \times 0,115)$. Soit la borne supérieure du CV% = $11,5 + 8,2 = 19,7$.

Conclusion : La conformité ne peut être déclarée si on considère l'intervalle de confiance IC 95%.

- Le laboratoire poursuit son essai de fidélité et obtient les 21 valeurs supplémentaires suivantes (n = 31).

nb d'essai	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Résultats	38,18	44,47	41,46	43,73	34,73	36,81	41,29	45,01	41,98	43,20	46,70

nb d'essai	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Résultats	49,20	37,20	38,90	37,03	41,20	42,32	45,00	43,20	41,30	42,30

Valeur moyenne de cet échantillon : $m = 41,22$

L'écart type : $s = 3,918$

CV% = 9,50, pour une limite acceptable de 15% pour le CV% (EMA 2011) le laboratoire conclut à la conformité.

Le laboratoire détermine l'intervalle de confiance de son CV% selon la formule suivante

$$IC_{cv} = \pm t \cdot \frac{CV}{\sqrt{2n}}$$

n = nombre d'échantillon

m = moyenne

s = écart type

t = 1.96 (car n > 30 t est déterminé sur table de t de Student en annexe pour un risque $\alpha = 0.05$, bilatéral et un degré de liberté ddl n-1)

L'intervalle de confiance du CV% = 9.50 ± 2.37 (1.96×1.21) soit [IC95% 7.13 -11.87]

Pour une limite acceptable de 15% pour le CV% (EMA 2011) le laboratoire conclut à la conformité.

Remarque : Il est également possible d'estimer l'intervalle de confiance pour des effectifs $n < 30$ en utilisant la table de t Student.

En reprenant les résultats pour les 10 résultats :

Valeur moyenne de cet échantillon : $m = 40,27$

L'écart type : $s = 4,612$

CV% = 11,5

L'intervalle de confiance peut être estimé à 11.5 ± 5.82 ($t_{\alpha=0.05 \text{ ddl} = 9} = 2.262$) : [IC 95% = 5.68-17.32]



11.2 Choix du ou des tests statistiques adaptés

Le choix d'un test statistique dépend de plusieurs facteurs notamment (Cf. tableau ci-dessous) :

- La nature des variables,
- Du type de comparaison
- De l'effectif de l'échantillon (n)

		Tests paramétriques			Types de tests non paramétriques
Variables quantitatives					
Type de comparaison		Conditions de l'effectif	Type de test	Vérifications	
Comparaison de moyennes	une moyenne à une moyenne théorique	effectifs de chaque série (n ₁ et n ₂) doivent être supérieurs à 30	Test Z (loi normale centrée réduite)	S'assurer de la normalité de la distribution des valeurs	
	deux séries non appariées				Wilcoxon-Mann-Whitney Si n ₁ et n ₂ > 10
	deux séries appariées				Wilcoxon Si paires de différence non-nulle > 20
	une moyenne à une moyenne théorique	Effectifs d'une séries < 30	Test T de Student	Variances des populations doivent être identiques	
	de deux séries non appariées				
	de deux séries appariées				
Comparaison de variances	Vérifier l'égalité de variances dans un test t de Student		Test de Fisher		
	Comparaison de deux moyennes par une analyse de variance				
	Comparaison de plusieurs moyennes par une analyse de variance		ANOVA / MANOVA		Kruskal Wallis Si effectifs des séries > 10
Variables qualitatives					
Comparaison de deux pourcentages observés sur deux échantillons	pour des séries appariées				Test χ^2 de Mac Nemar Si Le nombre de paires discordantes doivent être > 10
Comparaison des sensibilités ou spécificités en % de deux tests qualitatifs					Test de Fisher ou Test de χ^2 de Pearson Les effectifs théoriques > ou = 5



11.3 Les tests paramétriques et épreuves de normalité

Les tests paramétriques contrairement aux tests non paramétriques fonctionnent en supposant que les données dont on dispose suivent un type de loi de distribution connu, en général la Loi normale. Il est donc prudent de s'assurer d'une distribution normale principalement si le nombre de données est inférieur 30.

Epreuves de normalité

Il existe plusieurs types de méthodes fin d'éprouver la normalité :

- **Méthode approchée** : elle consiste à vérifier si la distribution observée possède les propriétés d'une distribution normale et notamment :
 - une moyenne = médiane
 - un coefficient d'asymétrie (skewness) égal à zéro
 - un coefficient d'aplatissement (kurtosis ou γ_2) égal à 3.

Formule pour le calcul du coefficient d'aplatissement :

$$\frac{\frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum \left(\frac{x_j - \bar{x}}{s} \right)^4}{\frac{3(n-1)^2}{(n-2)(n-3)}}$$

Remarques :

Un coefficient de Kurtosis < 3 est témoin d'une distribution aplatie et > 3 d'une distribution pointue.

Dans un tableur Excel, ces coefficients sont facilement accessibles à l'aide des fonctions fx= COEFFICIENT.ASYMETRIE et fx= KURTOSIS(nombre1, [nombre2], ...)

Le tableur Excel fournit un coefficient d'aplatissements normalisé de Fisher et la valeur doit être égal à 0. Ainsi un coefficient de Kurtosis normalisé compris entre -1 et +1 permet d'accepter la distribution gaussienne.

- **Méthode graphique** : elle consiste à vérifier si l'histogramme fréquences relatives suit l'allure d'une courbe en cloche.
- **Méthode analytique** : en se utilisant un test de Khi2 de normalité pour les tests paramétriques ou des tests de Kolmogorov-Smirnov ou test de Shapiro Wilk pour des tests non paramétrique.

Exemple d'utilisation des méthodes approchée et graphique

Contexte : Un laboratoire vérifie sa méthode de dosage de calcium et il a obtenu une série de 30 valeurs.

nb d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats	2,1	2,13	2,13	2,14	2,14	2,15	2,15	2,15	2,15	2,16
nb d'essai	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Résultats	2,16	2,16	2,16	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,18
nb d'essai	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Résultats	2,18	2,18	2,18	2,19	2,19	2,19	2,19	2,2	2,21	2,21

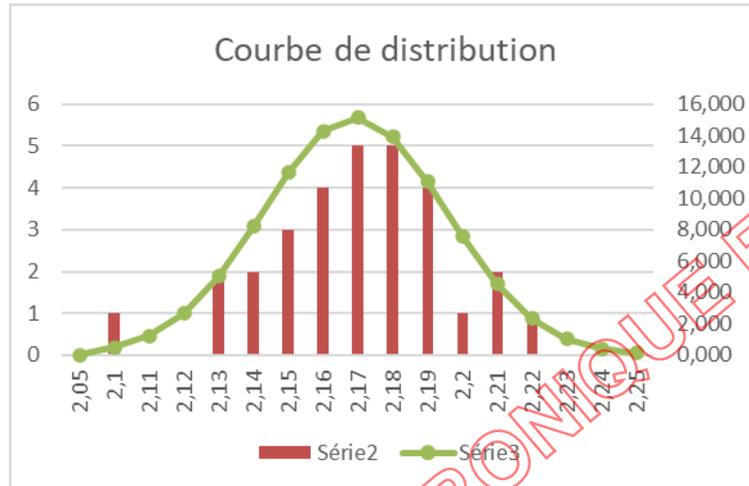


La moyenne est égale à 2,169 et écart type 0,026 soit un CV% = 1,21

Les données de l'état de l'art sont les suivantes :

- RICOS : valeurs souhaitables Imprécision (fidélité intermédiaire) = 1,05% et biais = 0,8%.
- SFBC : reproductibilité 1,6% et biais 1,7%.

- **Méthode graphique** : cette méthode est simple à mettre en œuvre par l'établissement d'un graphique en utilisant par exemple les fonctions FREQUENCE (tableau_données ; matrice classes) et LOI.NORMALE (x ; espérance, écart type, FAUX) sur Excel.



L'histogramme des fréquences relatives suit l'allure d'une courbe en cloche, la distribution suit donc une Loi normale.

Il apparaît visiblement une valeur aberrante, le résultat 2,1.

- **Méthode approchée** : En utilisant le module « utilitaire d'analyse » d'Excel, il est possible d'obtenir les statistiques descriptives ci-dessous (encadré « En pratique » ci-après)

Statistiques descriptives	
Moyenne	2,167
Erreur-type	0,00434569
Médiane	2,17
Mode	2,17
Écart-type	0,02380235
Variance de l'échantillon	0,00056655
Kurstosis (Coefficient d'aplatissement)	-0,037
Coefficient d'asymétrie	-0,258
Plage	0,1
Minimum	2,11
Maximum	2,21
Somme	65,01
Nombre d'échantillons	30



Les propriétés de la distribution indiquent que :

- La moyenne et la médiane sont identiques ;
- Le coefficient d'asymétrie est égal à 0,05 en l'absence de la valeur 2,10
- Le coefficient de Kurtosis normalisé est (-0,037) est compris entre -1 et +1.

Tous ces critères permettent d'accepter la distribution gaussienne.

Méthode analytique utilisant le test de Shapiro Wilk (test non paramétrique). Ce test est réputé robuste à partir d'un nombre de valeurs $n=7$. Cependant avec un nombre d'échantillons inférieur à 20, il existe un risque d'accepter l'hypothèse de normalité alors que cette dernière n'est pas remplie.

$$W = \frac{\sum(a_i x_i)^2}{\sum(x_i - x_m)^2}$$

a_i = coefficient de Shapiro-Wilk

x_i = est le rang ième valeur

x_m = moyenne

En se basant toujours sur le contexte plus haut avec les 30 valeurs issues du dosage de calcium.

Calcul de $W = 0.950$ ($n = 30$)

Calcul de $W = 0.994$ ($n = 29$ avec élimination de la valeur 2.10)

Valeur W critique = 0.927 (95%) et 0.900 (99%) pour $n = 30$

Valeur W critique = 0.926 (95%) et 0.898 (99%) pour $n = 29$

$W_{\text{calculé}} > W_{\text{critique}}$ de la table de Shapiro : l'hypothèse de distribution normale des données est acceptée avec un risque de 5% d'accepter une distribution de données ne suivant pas une loi normale.

L'absence de normalité des données peut être liée à la présence de valeurs aberrantes.

Les tests paramétriques sont puissants à condition que les données suivent effectivement la loi de distribution supposée. **Ils sont en particulier très sensibles aux valeurs aberrantes et ne sont pas conseillés si des valeurs aberrantes sont détectées et conservées dans l'échantillon.**

En pratique pour utiliser l'utilitaire d'analyse sur Excel :

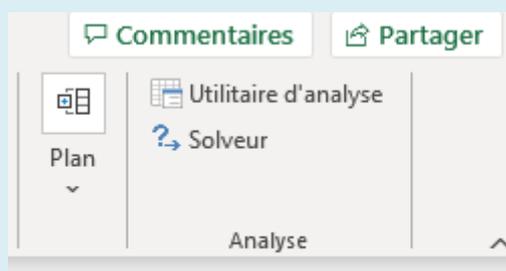
Sur un classeur Excel, cliquer sur l'onglet « Fichier ».

Sur les choix proposés à gauche, cliquer sur « Option ».

Dans la boîte de dialogue qui s'ouvre, cliquer sur « Compléments » et tout en bas dans Gérer Compléments Excel, cliquer sur « Atteindre ».

Choisir ensuite Analysis ToolPak et Complement Solveur puis cliquer sur « OK ».

L'utilitaire d'analyse apparaît dans la barre d'outils de l'onglet « Données » :





11.4 Valeurs aberrantes

Question pratique :

Dans la série de mesures, existe-t-il des valeurs aberrantes qu'il est raisonnable d'éliminer ?

La réponse peut être apportée par le test de Grubbs.

Il existe plusieurs tests mais le test de Grubbs est le plus efficace pour des faibles effectifs compris entre 6 et 50. Pour $n > 50$, le test de Dixon est particulièrement adapté.

11.4.1 Principe du test de Grubbs

Le Test de Grubbs présente un grand intérêt parce qu'il permet le rejet de deux points aberrants dans une série de mesures ou le rejet d'une ou de deux moyennes par rapport à une moyenne générale.

On calcule les deux résidus normalisés et ramenés à des valeurs positives :

$$G_1 = \frac{m - x_1}{s} \text{ et } G_n = \frac{x_n - m}{s}$$

Ces résidus sont comparés aux valeurs critiques à 5 % et à 1 % comme dans le cas du test de Dixon.

Si	$G_1 \text{ ou } G_n > G(\alpha = 1 \%)$	$x_1 \text{ ou } x_n$ est aberrant
Si	$G(\alpha = 5 \%) < G_1 \text{ ou } G_n < G(\alpha = 1 \%)$	$x_1 \text{ ou } x_n$ est douteux
Si	$G_1 \text{ ou } G_n < G(\alpha = 5 \%)$	$x_1 \text{ ou } x_n$ est non aberrant

Ces résidus sont comparés aux valeurs critiques à 5% et à 1% (cf. table de Grubbs).

Lien pour calcul automatisé : <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>.



11.4.2 Exemple

Une série de mesures a donné les valeurs suivantes classées par ordre croissant :

nb d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats	2,11	2,16	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17
nb d'essai	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Résultats	2,17	2,17	2,18	2,18	2,18	2,19	2,19	2,19	2,19	2,20
nb d'essai	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Résultats	2,20	2,20	2,21	2,21	2,21	2,22	2,22	2,23	2,23	2,32

Existe-t-il une valeur aberrante ?

n = 30

Moyenne = 2,191

Ecart-type = 0,034

- $G_{2.32} = \frac{(2.32 - 2.191)}{0.034} = 3,724$

G valeur critique ($\alpha = 0.01/DDL = 30$) = 3,103

G valeur critique ($\alpha = 0.05/DDL = 30$) = 2,745

La valeur 2,32 est une valeur aberrante (avec $p < 0.01$)

Existe-t-il une deuxième valeur aberrante ?

- $G_{2.11} = \frac{(2.186 - 2.11)}{0.025} = 3,03$

La valeur 2,11 est une valeur aberrante (avec $p < 0.05$)

Remarque :

Après avoir détecté la ou les valeurs aberrantes, l'élimination est justifiée au regard de sa signification. Exemple : une erreur grossière due à une inversion d'échantillon peut être éliminée si elle n'est pas liée au principe de la méthode. A contrario, il peut être préférable de conserver une erreur aléatoire liée à la méthode pour mieux la caractériser.

Le test Q de Dixon :

Il est possible pour de grande série d'utiliser le test Q de Dixon notamment pour des séries de plus de 50 observations. Il se base sur la distance entre X la valeur suspectée d'être aberrante et celle qui la précède.

Pour $n < 10$:

- Si $X_i \geq$ médiane (X) alors $Q_{obs} = X_{i+1} - X_i / X_n - X_1$
- Si $X_i \leq$ médiane (X) alors $Q_{obs} = X_i - X_{i-1} / X_n - X_1$

Pour $n > 10$:

- Si $X_i \geq$ médiane (X) alors $Q_{obs} = X_{i+2} - X_i / X_n - X_3$
- Si $X_i \leq$ médiane (X) alors $Q_{obs} = X_i - X_{i-2} / X_n - X_3$

Si la valeur $Q_{obs} >$ valeur critique au seuil de 0,05 ($r_{0,95}$ de la table de Dixon), la valeur est suspectée est aberrante.



11.5 Comparaison de deux CV

Question pratique :

Le laboratoire possède 2 systèmes analytiques pour réaliser le même paramètre biologique.
Les mêmes CIQ sont analysés sur les deux systèmes. Les CV sont-ils statistiquement différents ?
La réponse peut être apportée par **le test de Fisher - Snedecor.**

11.5.1 Principe

Pour comparer 2 CV, on compare en fait les variances s_A^2 et s_B^2 estimées à partir des 2 échantillons de taille n_A et n_B . On utilise le test F de FISHER-SNEDECOR. Ce test consiste à calculer le rapport des deux variances s_A^2 / s_B^2 (F calculé). On établit l'hypothèse nulle H_0 , que les deux variances dont sont issues les échantillons étudiés sont identiques : les deux variances sont égales et leur rapport est égal à 1. La valeur F est comparée à la valeur seuil (F théorique) donnée dans la table pour n_A-1 et n_B-1 degré de liberté (Cf. table de F). La particularité de la table de Fisher est d'être présentée pour une hypothèse H_1 unilatérale. Dans le cas de la comparaison de deux variances le rejet de H_0 au risque de 5% est donnée par la table $\alpha = 0.025$. Pour obtenir p, on doit donc multiplier par 2 la valeur obtenue. Sur la table, la variance la plus grande se place au numérateur.

Si F calculé < F théorique les 2 variances ne diffèrent pas significativement.

Si F calculé \geq F théorique les 2 variances diffèrent significativement.

Condition d'utilisation du test : la variable x doit être distribuée dans les 2 populations selon une loi normale indifféremment de la taille des échantillons.

11.5.2 Exemples

- Comparaison de deux CV différents avec les statistiques suivantes pour l'examen CK (UI/L) :

	Appareil A	Appareil B
n	21	21
Moyenne	157,79	161,96
Ecart-type	5,658	1,509
Variance	32,012	2,277
CV	3,586	0,931

$F = s_A^2/s_B^2$ (ddl1 = n-1 et ddl = n-2 et en nommant S_A^2 la variance la plus élevée.

$$F_{\text{calculé}} = \frac{5,658^2}{1,509^2} = 14,0\text{€}$$

$$F_{\text{théorique}}(20/20DDL) = 2,46$$

$F_{\text{calculé}} > F_{\text{théorique}2.5\%}$: S_A^2 diffère significativement de S_B^2 avec un p <0.05 (5%)



Rejet de l'hypothèse H₀ : les deux variances sont identiques (la différence observée provient des fluctuations d'échantillonnage).

L'hypothèse H₁ bilatérale est retenue : les deux variances (les deux CV) sont différentes.

Conclusion : Les deux systèmes analytiques présentent des fidélités statistiquement différentes.

- Comparaison de deux CV identiques avec les statistiques suivantes pour l'examen CK (UI/L) :

	Appareil A	Appareil B
n	21	21
Moyenne	157,79	161,96
Ecart-type	2,360	1,509
Variance	5,570	2,277
CV	1,496	0,931

$$F_{\text{calculé}} = 2,45$$

$$F_{\text{théorique}} (\alpha = 0.025 ; 20/20 \text{ DDL}) = 2,46$$

$$F_{\text{calculé}} < F_{\text{théorique}2.5\%} : S_A^2 \text{ ne diffère pas significativement de } S_B^2 \text{ avec un } p < 0.05 (5\%)$$

L'hypothèse H₀ est retenue : les deux variances sont identiques (la différence observée provient des fluctuations d'échantillonnage).

Conclusion : Les deux systèmes analytiques présentent des fidélités statistiquement identiques.

11.6 Comparaison de deux moyennes

Question pratique :

Le laboratoire possède 2 systèmes analytiques pour réaliser le même paramètre biologique.

Les mêmes CIQ sont analysés sur les deux systèmes. Les moyennes sont-elles statistiquement différentes ?

La réponse peut être apportée par **le test t pour les cas où au moins une série <30** et par **le test z si les 2 séries sont > 30**.

Les tests t est préconisé pour un nombre de valeurs < 30. Cependant le test t et le test z sont utilisés pour un nombre de valeurs > 30 afin de déterminer si la moyenne d'une série est significativement différente d'une moyenne de référence (exemple avec les techniques d'HPLC) ou si la moyenne d'un automate est différente de la moyenne d'un autre automate (exemple avec les techniques de spectrométrie).



11.6.1 Comparaison de 2 moyennes de CIQ m_A et m_B obtenues à partir de deux échantillons de n_A et n_B valeurs (> 30 pour les deux échantillons)

Puisque les échantillons n_A et n_B sont tous les deux supérieurs à 30, il est possible d'utiliser le test Z qui consiste à calculer $Z_{\text{calculé}}$ et à le comparer à la valeur seuil de 1.96 (pour un $p = 0.05$).

$$Z = |m_A - m_B|/S_d$$

avec $S_d = \sqrt{s_A^2/n_A + s_B^2/n_B}$

et $S_A^2 =$ variance de l'échantillon n_A , $S_B^2 =$ variance de l'échantillon n_B

Si $Z_{\text{calculé}} < 1.96$: les deux moyennes de CIQ sont identiques et l'hypothèse H_0 est acceptée avec une probabilité de se tromper $p < 5\%$.

Si $Z_{\text{calculé}} > 1.96$: la différence entre les deux moyennes de CIQ est significative et l'hypothèse H_0 est rejetée avec une probabilité de se tromper $p < 5\%$.

Exemple : protéines urinaires (g/L)

	Appareil 1	Appareil 2
n	52	49
Moyenne	0,459	0,418
Ecart-type	0,031	0,028
CV	6,753	6,698

$Z_{\text{calculé}}$:

$$\frac{|0,459 - 0,418|}{\sqrt{\frac{0,031^2}{52} + \frac{0,028^2}{49}}} = 6,98$$

$Z_{\text{calculé}} > Z_{\text{théorique}} (=1.96)$

Conclusion : Les deux systèmes analytiques présentent des moyennes statistiquement différentes avec une probabilité d'erreur $p < 5\%$.

11.6.2 Comparaison de 2 moyennes de CIQ m_A et m_B obtenues à partir de deux échantillons de n_A et n_B valeurs avec au moins un des échantillons < 30

Pour comparer 2 moyennes m_A et m_B estimés sur deux échantillons n_A et n_B avec au moins un des échantillon ayant un effectif < 30 , on utilise le test de Student qui consiste à calculer le (t calculé) et à le comparer à la valeur seuil (t théorique) donné dans la table pour (n_A+n_B-2) degré de liberté (Cf. table de t).

La loi t de Student est utilisée selon les conditions suivantes :

- Faire l'hypothèse que la distribution suit une loi normale
- Les variances S_A^2 et S_B^2 sont comparables ($S_A^2/S_B^2 < 3$) à vérifier par un test F de Fisher-Snedecor (Cf. 11.5)
- La taille des échantillons n_A et n_B sont comparables ($n_A/n_B < 1.5$)



$$t_{\text{calculé}} = |m_A - m_B| / \sqrt{S_d}$$

avec $S_d = S^2/n_A + S^2/n_B$

et $S^2 =$ variance commune aux deux échantillons = $[(n_A-1)S_A^2 + (n_B-1)S_B^2] / n_A + n_B - 2$

ddl = $n_A + n_B - 2$

Bilatérale :

- Si $t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique } 0.05}$, l'hypothèse H_0 est retenue : m_A n'est pas significativement différente de m_B .
- Si $t_{\text{calculé}} \geq t_{\text{théorique } 0.05}$, les 2 moyennes diffèrent significativement.

Exemple : cholestérol (mmol/L)

	Appareil 1	Appareil 2
n	20	20
Moyenne	5,591	5,484
Ecart-type	0,179	0,192
CV	3,2	3,5

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|5,591 - 5,484|}{\sqrt{\frac{0,0344}{20} + \frac{0,0344}{20}}} = 1,824$$

$$t_{\text{théorique (38 DDL)}} = 1,96$$

$$t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$$

Conclusion : Les deux systèmes analytiques présentent des moyennes statistiquement non différentes avec une probabilité d'erreur $p < 5\%$.

Remarque :

Si les conditions du test Z ou test t ne sont pas remplies, il est possible de comparer les moyennes à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney ou test de la somme des rangs qui a pour conditions d'utilisation : n_A et $n_B > 10$ et pas trop de valeur ex aequo. Il s'agit d'un test non paramétrique basé sur les rangs des valeurs ordonnées.

Il est nécessaire de classer les données des deux séries selon leurs valeurs de première à la nième selon l'ordre croissant. Lorsque deux valeurs sont identiques, leur rang moyen ex aequo est déterminé.

Par exemple dans la série suivante : ..., 9, 10, 10, 11, ...

Il sera établi : 9 (rang 6), 10 (rang 7), 10 (rang 8), 11 (rang 9). Comme il y a un ex aequo, le classement devient 9 (rang 6), 10 (rang 7,5), 10 (rang 7,5), 11 (rang 9). 7,5 étant la moyenne des rang 7 et 8.

Calcul pour déterminer le facteur W :

$$W = \frac{|W_1 - W_a|}{\sqrt{S^2_{W_1}}}$$

$W_1 =$ somme des rangs d'une des séries = (série 1) et (série 2)

$W_a =$ somme attendue = $n_1(N+1)/2$

Variance de $W_1 = S^2_{W_1} = n_1 n_2 (N+1) / 12$



En pratique :

Il est possible pour d'utiliser Excel pour le calcul de t et classement du test de rang.

t : =T.TEST(matrice 1 ; matrice 2 ; uni/bilatéral : type)

Uni/bilatéral : 1 = test unilatéral et 2 = test bilatéral

Type : type =3 pour un test Z et type = 2 pour un test t

Rang : Excel fonction rang

RANG (nombre; référence; [ordre]

Premier valeur classée =RANG(A1;A\$1:A\$40)

La valeur précise de p peut être aussi obtenue dans Excel : = LOI.STUDENT.BILATERAL(t calculé ; ddl)

11.6.3 Comparaison d'une moyenne observée à une moyenne théorique

Le principe de cette comparaison repose sur l'évaluation de la différence entre la moyenne et celle de la valeur de référence ou plus précisément la différence entre la moyenne observée et la valeur de référence devrait être suffisamment éloignée de 0.

$$Z = \frac{|m - \mu|}{S_{\mu}} \quad \text{avec } S_{\mu} = \frac{S_{obs}}{\sqrt{n}}$$

On estime l'écart type de la référence, S_{μ} si non connu par l'écart type de l'échantillon :

$$S_{\mu} = \frac{SA}{\sqrt{nA}}$$

Exemple :

Un laboratoire souhaitant valider une méthode **dosage** de l'afanitib par LC-MS/MS au moyen d'une solution de référence à la concentration de 5 ng/ml a obtenu les 18 valeurs suivantes :

nb essais	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Résultats	5,90	5,80	5,75	5,03	5,77	5,07	4,31	5,43	4,74
nb essais	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Résultats	5,03	5,77	5,07	5,63	4,88	5,80	4,73	5,03	5,83

Moyenne observée = 5,31

Ecart type observé $s_{obs} = 0.489$

CV% = 9.21

- **La taille de l'échantillon étant inférieur à 30**, le test t de Student est utilisé avec les hypothèses suivantes :
 - Hypothèse nulle $H_0 : m = \mu$, la moyenne observée n'est pas statistiquement différente de la moyenne de référence.
 - Hypothèse alternative bilatérale $H_1 : m \neq \mu$, les deux moyennes sont statistiquement différentes.



On va déterminer si la différence des moyennes qui équivaut à 0.31 (5.31(m) – 5.00(μ)) est suffisamment éloignée de zéro pour rejeter l'hypothèse H₀.

Pour commencer, la valeur du t observé est calculé :

$$t = \frac{|m - \mu|}{s_{\mu}} \quad \text{avec} \quad s_{\mu} = \frac{S_{obs}}{\sqrt{n}} = \frac{0.489}{\sqrt{18}} = \frac{0.489}{4.243} = 0.115$$

$$t_{\text{observé}} = \frac{|5.31 - 5.00|}{0.115} = 2.695$$

Puis, la valeur de t observé est comparée à la valeur t théorique obtenue à partir de la table t de Student pour un degré de liberté $ddl = 18 - 1 = 17$.

$$t_{\text{théorique}} (\alpha = 0.05 \text{ et } ddl = 17) = 2.110$$

$$t_{\text{théorique}} (\alpha = 0.02 \text{ et } ddl = 17) = 2.567$$

$t_{\text{observé}} > t_{\text{théorique}}$: permet de rejeter l'hypothèse H₀ : m = μ, les deux moyennes sont statistiquement différentes avec p < 2%.

- **La taille de l'échantillon est supérieure ou égale à 30**, le test Z (t théorique) = 1.96 sera utilisé pour comparer la moyenne observée à une moyenne théorique

$t_{\text{observé}} 2,695 > t_{\text{théorique}} 1,96$: permet de rejeter l'hypothèse H₀ = m = μ, les deux moyennes sont statistiquement différentes.

11.7 Comparaison de deux séries de résultats (séries appariées)

11.7.1 Test t des différences

Question pratique :

Le laboratoire possède 2 systèmes analytiques pour réaliser le même paramètre biologique.

Les mêmes échantillons patients sont analysés sur les deux systèmes. Les différences observées sont-elles statistiquement significatives ?

*La réponse peut être apportée par **le test t des différences**.*

11.7.1.1 Principe

Les données des deux échantillons, de même effectif n, se présentent sous la forme de n couples. Pour chaque couple on calcule la différence. On obtient n différences qu'on peut considérer comme un échantillon aléatoire de la population des différences. On calcule la moyenne des différences (m_d) et l'écart-type des différences (σ_d). Le problème se ramène donc à la comparaison de la moyenne des différences à 0 (valeur de référence).

- Si n (nombre de paires) ≥ 30 le Z sera comparé à la valeur théorique = 1.96
- Si n (nombre de paires) < 30 Le t calculé sera comparé au t théorique avec (n-1) DDL.



Ce test est applicable si les différences sont distribuées selon une loi normale. En pratique, cette condition est difficilement applicable.

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|m_d - 0|}{\sqrt{\frac{\sigma_d^2}{n_d}}}$$

Ce $t_{\text{calculé}}$ ou $Z_{\text{calculé}}$ sera comparé respectivement au $t_{\text{théorique}}$ ou 1,96 de sorte que :

- Si $t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$ ((n_d-1) DDL): la moyenne des différences ne diffère pas significativement de 0 (risque α).
- Si $t_{\text{calculé}} \geq t_{\text{théorique}}$ la moyenne des différences diffère significativement de 0.

Ou

- Si $Z_{\text{calculé}} < 1.96$ la moyenne des différences ne diffère pas significativement de 0 (risque α).
- Si $Z_{\text{calculé}} \geq 1.96$ la moyenne des différences diffère significativement de 0.

11.7.1.2 Exemple de comparaison en utilisant un test t des différences

Un laboratoire réalise un dosage du cholestérol (mmol/l) sur 20 échantillons de sérums par deux appareils puis établit un tableau de synthèse de comparaison des résultats obtenus, étude des différences.

Appareil 1	Appareil 2	Différences (1-2)
5.2	5.14	0.06
3.6	3.66	-0.06
3.7	3.96	-0.26
4.77	4.72	0.05
4.23	4.28	-0.05
3.4	3.32	0.08
3.6	3.29	0.31
5.9	5.85	0.05
3.5	3.47	0.03
2.6	2.52	0.08
4.0	3.92	0.08
4.5	4.32	0.18
7.4	7.06	0.34
2.2	2.22	-0.02
4.3	4.56	-0.26
5.2	5.34	-0.14
6.0	5.84	0.16
3.5	3.61	-0.11
4.4	4.53	-0.13
1.4	1.46	-0.06

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|0,0205263|}{\sqrt{\frac{0,1634175^2}{20}}} = 0,562$$

$t_{\text{théorique}} ((n_d-1)=19 \text{ DDL}) = 2,093$

$t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$, la moyenne des différences ne diffère pas significativement de 0.



Conclusion : les résultats des deux systèmes analytiques présentent des différences non statistiquement significatives.

Remarque :

Le test t sur séries appariées est un test très sensible qui peut mettre en évidence des différences très faibles, statistiquement significatives, qui n'ont pas d'impact sur le plan clinique.

Dans le cas général, le test est bilatéral.

Dans les cas où un laboratoire veut s'assurer de la comparaison seulement sur une partie (haute ou basse) de la distribution, il utilisera l'interprétation unilatérale du test. Pour rappel, les hypothèses selon le type de tests ci-dessous.

Bilatérale :

- Si $T \text{ calculé} < T_{5\%}$: Hypothèse H_0 les moyennes des 2 séries ne diffèrent pas significativement.
- Si $T \text{ calculé} \geq T_{5\%}$: Hypothèse H_1 : les moyennes des 2 séries diffèrent significativement.

Unilatérale :

- Si $T \text{ calculé} < T_{10\%}$: Hypothèse H_0 les moyennes des 2 séries ne diffèrent pas significativement
- Si $T \text{ calculé} \geq T_{10\%}$: les moyennes des 2 séries diffèrent significativement.

11.7.2 Test de concordance entre deux instruments

Test de Bland-Altman D'après l'exemple du CRHUM : crchum.chumontreal.qc.ca/.../crchum.../analyse_graphique_bland-altman

Contexte :

On désire comparer deux instruments qui mesurent le même analyte biologique et on veut savoir si les deux instruments sont concordants (« agreement »).

Données :

Soit dix sujets pour lesquels les mesures sont réalisées. Pour chaque sujet de 1 à 10, on a une mesure de chaque instrument à comparer.

On calcule la moyenne entre les deux instruments pour chaque sujet (colonne 3) et la différence entre les deux instruments pour chaque sujet (colonne 4).

Sujets	Instrument 1	Instrument 2	Moyennes	Différences
1	13	12	$(12+13)/2 = 12,5$	$13 - 12 = 1$
2	14	10	$(10+14)/2 = 12$	$14 - 10 = 4$
3	11	15	13	-4
4	10	10	10	0
5	12	14	13	-2
6	14	14	14	0
7	12	12	12	0
8	11	13	12	-2
9	9	10	9,5	-1
10	11	9	10	2

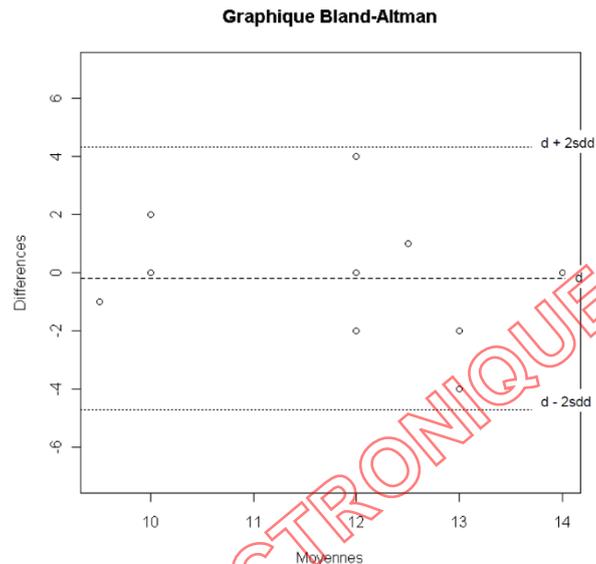


Graphique :

Un graphique de BLAND-ALTMAN permet de comparer les moyennes des mesures à leurs différences. On porte sur l'axe des x les moyennes (colonne 4) et sur l'axe des y les différences (colonne 5).

Pour calculer ce qu'on appelle les limites d'agrément (limits of agreement), il y a trois étapes :

1. Calculer d = moyenne des Différences (ici $d = -0.2$)
2. Calculer sdd = l'écart type des Différences (ici $sdd = 2.25$)
3. Calculer la limite inférieure et supérieure = $d \pm 2 sdd$ (ici $d \pm 2 sdd = -4.7$ et 4.3)



Interprétation :

La moyenne des différences « d » indique si un des deux instruments tend à produire des valeurs systématiquement plus basses ou plus élevées que l'autre. Dans cet exemple $d = -0,2$. Il semble donc que l'instrument 1 fournisse des valeurs un peu plus faibles que l'instrument 2. Cependant, il faut s'interroger sur la signification de cette différence de $-0,2$ (voir le paragraphe « Interprétation des limites d'agrément » ci-dessous).

La valeur « d » est souvent présentée à tort comme le biais. En fait, on ne connaît pas la vraie mesure pour chaque sujet, tout ce que l'on a, pour chaque sujet, ce sont deux valeurs qui comportent probablement des erreurs de mesure. La moyenne entre ces deux valeurs est notre meilleure estimation de la valeur vraie. La valeur « d » est la moyenne des différences entre les mesures de l'instrument 1 et celles de l'instrument 2. Si un des instruments donne la valeur de référence, on peut considérer « d » comme la mesure du biais. Si aucun des deux instruments n'est « de référence », alors on peut considérer « d » davantage comme une différence systématique entre deux instruments qu'un biais.

Interprétation des limites d'agrément :

On s'attend à ce que la plupart de nos points se situent dans l'intervalle entre les limites d'agrément $d \pm 2 sdd$. Il faut donc savoir interpréter ces limites.

Important : les procédures reliées au graphe de Bland-Altman ne sont généralement pas associées à des tests statistiques et ne produisent pas de valeur de probabilité « p ». L'interprétation des limites d'agrément se fait en lien avec le contexte de réalisation du test (intérêt clinico-biologie) non en comparaison avec des valeurs « de référence ». Avant de faire



le graphe de Bland-Altman, il faudra s'interroger sur la différence entre les deux instruments que l'on considérera acceptable.

Dans l'exemple ci-dessus, si on considère que la différence acceptable entre deux mesures obtenues par deux instruments est de ± 5 unités, alors les mesures obtenues sont considérées comme similaires ou interchangeables, les 2 instruments sont concordants. Si la différence acceptable avait été de ± 2 unités on aurait conclu qu'il n'y a pas de concordance (ou faible concordance) entre les 2 instruments.

11.7.3 Droites de régression

Lorsque l'on dispose de couples de valeurs obtenues sur des spécimens de patients, on peut reporter sur un graphique orthonormé l'ensemble des données avec en abscisse la technique prise comme référence et en ordonnée la technique à tester et rechercher la relation existante entre elles. Il existe différentes modalités de calcul de la relation linéaire qui prennent plus ou moins en compte l'ensemble des contraintes existant dans la comparaison de méthodes. Les méthodes de calcul suivantes conduisent à des droites de régression comparables :

- droite des moindres carrés (régression orthogonale) tableur Excel,
- droite des moindres rectangles (droite d'allométrie)
 - o $y = a.x + b$ avec a (pente) = σ_y/σ_x et b (intercept) = $m_y - a.m_x$
 - o m_x = moyenne de x et σ_x = écart type des x
 - o m_y = moyenne de y et σ_y = écart type des y
- droite de DEMING,
- droite de YORK,
- droite de PASSING-BABLOK.

Exemple : comparaison de 2 méthodes de dosage

Pour chacun des N sujets d'un échantillon, on dose simultanément la même substance par 2 méthodes X et Y .

Sujet	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Y	7,2	5,3	2,3	4,1	6,4	8,1	6,8	9,1	5,9	4,8
X	8,1	5,3	2,9	3,8	7,1	7,4	7,7	8,7	5,9	5,2

D'après Appareils et méthodes en Biochimie de Pierre Kamoun – 3^e édition, Médecine & Sciences, Flammarion

On désire savoir si X et Y sont ou non des méthodes équivalentes. La question posée est : les méthodes X et Y donnent-elles les mêmes résultats dans la population des sujets ? A-t- on dans celle-ci $X=Y$?

• Droite des moindres rectangles (droite d'allométrie) :

- o $m_x = 6,21$ et $\sigma_x = 1,91221222$
- o $m_y = 6,00$ et $\sigma_y = 1,98606255$
- o a (pente) = $\sigma_y/\sigma_x = 1,98606255/1,91221222 = 1,03862036$
- o b (intercept) = $m_y - a.m_x = 6,00 - 1,03862036 \times 6,21 = -0,4498$

Equation de la droite d'allométrie :

$$Y = 1,039 x - 0,450$$



- Droite des moindres carrés, régression orthogonale, tableur Excel :

RAPPORT DÉTAILLÉ EXCEL

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple	0,95787129
Coefficient de détermination R ²	0,91751741
Coefficient de détermination R ²	0,90720708
Erreur-type	0,60499299
Observations	10

	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Statistique t</i>
Constante b	-0,17810933	0,68228633	0,26104778
Pente a	0,99486463	0,10546127	9,43345954

Equation de la droite des moindres carrés :

$$Y = 0,995 x - 0,178$$

Conclusion :

Si les 2 méthodes fournissent dans la population et aux variations aléatoires près, les mêmes résultats, alors il existe une droite de régression théorique $Y = 1.x + 0$, c'est-à-dire de pente $a = 1$ et d'ordonnée à l'origine $b = 0$.

- Hypothèse $a=1$.

Les étapes de ce test sont les suivantes :

- $H_0 : a=1$ et $H_1 : a \neq 1$
- le paramètre $a-1/S_a$ suit sous H_0 une loi de du test t Student avec $(n-1)$ ddl
- pour un risque de 0,05 et $(n-1)$ ddl = 7, $t=2,262$
- $t_{calculé} = -0,0052/0,10546 = -0,049$

$t_{calculé} < t_{théorique}$: hypothèse H_0 acceptée, la pente n'est pas différente de 1.

- Hypothèse $b=0$.

Les étapes de ce test sont les suivantes :

- $H_0 : b=0$ et $H_1 : b \neq 0$
- le paramètre b/S_b suit sous H_0 une loi du test t de Student avec $(n-2)$ ddl pour un risque de 0,05 et $(n-2)$ ddl = 8, $t=2,306$
- $t_{calculé} = -0,178/0,6822 = 0,261$

On peut donc conclure que les deux méthodes donnent des résultats équivalents.

La comparaison de la droite de régression obtenue à la droite théorique ($y=x$) peut être simplifiée en utilisant les normes d'interprétation (NI) de la droite de régression proposées par la SFBC. Ces normes correspondent, pour les trois niveaux de concentration définis, aux erreurs systématiques maximales tolérables.

$$NI = 2 * \text{erreur de justesse}$$



Exemple : acide urique

	Valeur	Justesse (%)	NI
Niveau bas	150 $\mu\text{mol/l}$	$\pm 7,1$	± 21
Niveau moyen	300 $\mu\text{mol/l}$	$\pm 6,2$	± 37
Niveau élevé	450 $\mu\text{mol/l}$	$\pm 5,3$	± 48

Pour les trois niveaux de concentration, les deltas entre les deux droites $y=ax+b$ et $y=x$ sont inférieures aux normes d'interprétation. L'équation de la droite $y=ax+b$ ne sera pas considérée comme différente de $y=x$.

11.8 Comparaison de n séries de résultats (n opérateurs ou n analyseurs)

La comparaison de plusieurs moyennes entre n groupes (pour n supérieur à 2, sinon un test t de Student sera réalisé) peut être réalisée à l'aide de l'analyse de variance (Anova ou plus précisément MANOVA) ou à l'aide d'un test F de Fisher-Snedecor.

Il y a deux raisons pour utiliser l'Anova plutôt que plusieurs tests t :

- le nombre C de comparaisons augmente de façon géométrique, il y a $C*(C-1)/2$ comparaisons possibles. Par exemple, la comparaison de 4 moyennes nécessite la réalisation de 6 tests t.
- le risque de trouver des résultats significatifs ne traduisant pas de réelle différence peut être dû au hasard. Il peut être démontré que dans 27% des cas l'hypothèse d'égalité sera rejetée alors qu'elle est vraie.

Comme le test t de Student, les conditions d'utilisation de l'ANOVA sont les suivantes :

- L'hypothèse que les distributions des différents groupes suivent une loi normale
- Les variances sont comparables (S^2 la plus basse / S^2 la plus élevée < 3) à vérifier par un test F de Fisher-Snedecor (Cf. 11.5)
- La taille des échantillons n_x sont comparables (n_x la plus bas / n_x le plus élevé < 1.5)

La comparaison est basée sur l'établissement du facteur $F_{\text{calculé}}$ égal au rapport entre la variance inter groupe et la variance intra groupe. En effet, la variance totale de toutes ces mesures peut être décomposée en variance intergroupes et en variance intra-groupes. La comparaison repose sur les hypothèses suivantes :

- Hypothèse H_0 : les moyennes sont équivalentes : la variance inter groupes est faible et inférieure à la variance intragroupe : $F_{\text{calculé}} \leq 1$
- Hypothèse alternative H_1 : les moyennes sont différentes : la variance inter groupes est élevée et supérieure à la variance intragroupe : $F_{\text{calculé}} > 1$.

Le nombre d'échantillon est nommé k et le nombre de mesures par échantillon est désigné par n.

La valeur de F calculée est comparée à celle de la valeur théorique d'une table F de Snedecor, à double entrée avec pour numérateur le [nombre k d'échantillon moins un] et pour dénominateur le [nombre total de mesure kn - k]

Si l'Anova n'est pas significative, cela veut dire qu'au seuil choisi, il n'y a pas de différence entre les moyennes. Si elle est significative, cela veut dire qu'au moins une des moyennes diffère des autres.

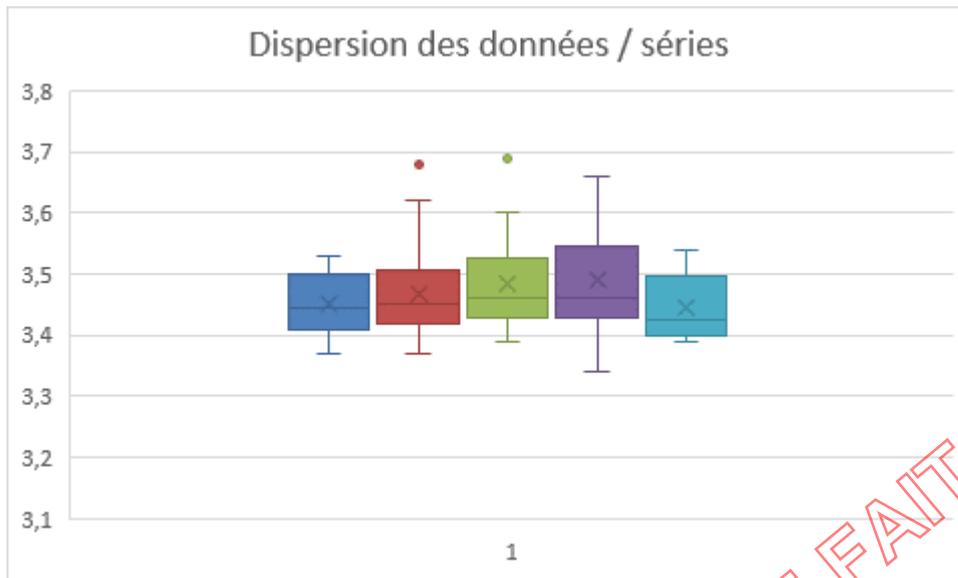


Exemple :

Une comparaison basée sur l'établissement du facteur F égal au rapport entre la variance entre les moyennes des 4 analyseurs (variances inter groupe) et la variance à l'intérieur d'un groupe de 24 à 25 échantillons (variance intra groupe). Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus avec les sommes, moyennes et variance de chaque série.

Echantillon	Analyseur 1	Analyseur 2	Analyseur 3	Analyseur 4	Analyseur 5
1	3,37	3,37	3,39	3,34	3,39
2	3,37	3,38	3,39	3,41	3,39
3	3,37	3,4	3,41	3,42	3,39
4	3,39	3,41	3,41	3,42	3,39
5	3,4	3,41	3,41	3,42	3,39
6	3,41	3,42	3,43	3,43	3,4
7	3,41	3,42	3,43	3,43	3,4
8	3,42	3,43	3,44	3,43	3,41
9	3,42	3,43	3,44	3,44	3,41
10	3,43	3,43	3,44	3,45	3,41
11	3,43	3,44	3,45	3,45	3,42
12	3,44	3,44	3,46	3,46	3,42
13	3,45	3,45	3,46	3,46	3,43
14	3,45	3,46	3,48	3,49	3,45
15	3,46	3,46	3,51	3,5	3,45
16	3,48	3,46	3,52	3,51	3,46
17	3,49	3,46	3,52	3,51	3,46
18	3,5	3,48	3,52	3,52	3,49
19	3,5	3,49	3,52	3,54	3,5
20	3,51	3,52	3,53	3,55	3,5
21	3,52	3,53	3,53	3,57	3,51
22	3,53	3,53	3,54	3,57	3,51
23	3,53	3,58	3,55	3,63	3,52
24	3,53	3,62	3,6	3,64	3,54
25		3,68	3,69	3,66	

Il est possible de voir une un représentation graphique la dispersion des données par séries afin de comparer les moyennes visuellement.



A l'aide de l'utilitaire d'analyse Excel il est possible d'obtenir le rapport suivant :

RAPPORT DÉTAILLÉ

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
Colonne 1	24	82,81	3,45042	0,00289
Colonne 2	25	86,7	3,468	0,005475
Colonne 3	25	87,07	3,4828	0,00506
Colonne 4	25	87,25	3,49	0,0064
Colonne 5	24	82,64	3,44333	0,00243

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,03953	4	0,00988	2,20452	0,07263	2,44854
A l'intérieur des groupes	0,52893	118	0,00448			
Total	0,56846	122				

F calculé = 2,20452

F théorique (2/57 DDL) = 2,448

$F_{\text{calculé}} < F_{\text{théorique}}$: les moyennes sont équivalentes, hypothèse H0 acceptée.

Conclusion : Les trois systèmes analytiques présentent des moyennes non statistiquement différentes.



11.9 Vérification des concordances

<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>

Question pratique :

Le dosage qualitatif d'un même paramètre biologique est réalisé par deux techniciens différents, sur les mêmes échantillons patients. Les résultats obtenus sont-ils concordants ?

*La concordance ou la discordance des résultats entre opérateurs peuvent être mises en évidence par **le calcul du coefficient Kappa**.*

11.9.1 Principe

Afin de comparer deux mesures, obtenues par deux observateurs différents utilisant la même méthode (variables souvent qualitatives), il importe d'évaluer la proportion de résultats pour lesquels il y a accord entre les observateurs. L'expression de cette concordance passe par le calcul d'un coefficient dit « kappa », qui est d'autant plus proche de 1 que la concordance est bonne. A noter que même en cas d'observations effectuées au hasard (hypothèse d'indépendance), on observe une concordance non nulle, dite « concordance aléatoire ».

Le calcul du coefficient kappa prend donc en compte la concordance observée P_o (somme des proportions diagonales du tableau), et la concordance calculée P_c (concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance).

Le tableau ci-dessous expose le cas de deux observateurs ayant R modalités de jugement à propos d'un nombre total d'observations N (effectif total) ; on note n_{ij} l'effectif de la case de ligne i et de colonne j.

Tableau I.
Calcul du coefficient Kappa.

	Observateur 2			Total	
Observateur 1	n_{11}	n_{12}	n_{1j}	n_{1R}	$n_{.1}$
	n_{21}	n_{22}	n_{2j}	n_{2R}	$n_{.2}$
	n_{ij}	n_{ij}	n_{ij}	n_{iR}	$n_{i.}$
	n_{R1}	n_{R2}	n_{Rj}	n_{RR}	$n_{R.}$
Total	$n_{.1}$	$n_{.2}$	$n_{.j}$	$n_{.R}$	N

La concordance observée : $P_o = 1/N \times (\sum n_{ij})$

La concordance calculée : $P_c = 1/N^2 \times (\sum n_{i.} \times n_{.j})$



Le coefficient kappa se calcule comme : $K = P_o - P_c / 1 - P_c$

Il n'y a pas de coefficient kappa « significatif » ou non. Il s'agit d'une mesure de l'accord entre observateurs, qui est analysée en fonction du contexte. On attend un coefficient kappa d'autant plus élevé que la variable étudiée est « objective ». Le tableau ci-dessous donne un ordre d'idée de l'interprétation des valeurs de kappa en fonction de l'intervalle dans lequel se situe la valeur calculée du coefficient, mais d'autres échelles d'interprétation (reposant sur 3 classes par exemple) peuvent être utilisées.

Tableau II.
Interprétation du coefficient Kappa.

Coefficient Kappa	Estimation du degré de concordance
0,8 à 1	Excellent
0,6 à 0,8	Bon
0,4 à 0,6	Moyen
0,2 à 0,4	Faible
0 à 0,2	Négligeable
< 0	Mauvais

D'après C. Fuhrman & C. Chouaid, RMR, Fev 2004, vol 21, n°1, pp123-125

Davantage que la valeur absolue du coefficient kappa, il est en fait plus important de connaître son intervalle de variation. P_o peut varier de 0 (désaccord total) à 1 (accord parfait), le coefficient Kappa peut varier de 0 à 1. Cette borne inférieure dépend des totaux marginaux du tableau. De même, la valeur maximale du coefficient Kappa n'est pas nécessairement égale à 1.

Comparaison entre deux valeurs du coefficient kappa :

S'il n'y a pas de moyen objectif « statistique » de dire qu'un coefficient kappa est « bon » ou pas, il peut être utile de comparer deux valeurs de ce coefficient entre elles. Pour cela, il faut calculer le rapport, qui suit une loi normale centrée réduite sous l'hypothèse nulle.

11.9.2 Exemple

Evaluation de la présence/absence de *P. falciparum* sur 50 échantillons de sang par deux techniciens. Comparaison des résultats obtenus, étude des différences.

Réponses		Opérateur 1		Total
		+	-	
Opérateur 2	+	20	5	25
	-	3	22	25
Total		23	27	50

$$P_o = \frac{20}{50} \times (20 + 22) = 0,84$$

$$P_c = \frac{1}{50^2} \times [(25 \times 23) + (27 \times 25)] = 0,5$$

$$K = \frac{0,84 - 0,5}{1 - 0,5} = 0,68$$

Conclusion : Il existe un bon accord entre les deux opérateurs (cf. tableau II)



11.10 Comparaison de deux pourcentages observés sur deux échantillons (variable qualitatives)

Question pratique :

Le dosage qualitatif d'un même paramètre biologique est réalisé par deux méthodes différentes à partir des mêmes échantillons patients. Les performances sont-elles identiques ?

*L'équivalence ou non entre les deux techniques peut être mise en évidence par **le test de χ^2 de Mac Nemar.***

11.10.1 Principe

Le test de Mac Nemar est un test non paramétrique qui est utilisé dans le cadre de la comparaison de deux variables qualitatives binaires appariées. Il peut être utilisé à condition que les effectifs des paires discordantes est supérieur à 10.

Pour réaliser le test χ^2 de Mac Nemar, il est nécessaire de construire un tableau de croisé associé aux deux variables appariées (Test A, Test B) également appelé tableau de contingence.

		Test A	
		+	-
Test B	+	$n_{+,+}$	$n_{-,+}$
	-	$n_{+,-}$	$n_{-,-}$

Le calcul ne tient compte que des valeurs discordantes :

$$\chi_{MN}^2 = \frac{(n_{1,2} - n_{2,1})^2}{n_{1,2} + n_{2,1}}$$

L'hypothèse H_0 : χ^2 calculé < à la valeur seuil $\chi^2_{0.05}$, les méthodes sont statistiquement de performances équivalentes.

L'hypothèse H_1 : χ^2 calculé > à la valeur seuil $\chi^2_{0.05}$, les méthodes sont statistiquement de performances différentes.

11.10.2 Exemple

Un laboratoire étudie les performances d'un test immunochromatographie A par rapport à un test de référence ELISA à partir des mêmes échantillons (appariés)

Il obtient les données suivantes :



		Test IC A		Totaux
		+	-	
Test ELISA	+	18	8	26
	-	3	33	36
Totaux		21	41	62

Les effectifs théoriques sont les suivants :

		Effectif observé	Effectif théorique
e	+/+	18	8.8 (26×21/62)
f	+/-	3	12.2 (36×21/62)
g	-/+	8	17 (26×41/62)
h	-/-	34	24 (36×41/62)
		62	62
	f+g	11	

La somme des paires discordantes (n = 11) est supérieure à 10 et les effectifs théoriques de chaque case sont ≥ 5 . Le Test de χ^2 de Mc Nemar est donc utilisable.

$$\chi^2_{MN} = \frac{(f-g)^2}{f+g} = \frac{(3-8)^2}{11} = 25/11 = 2.27$$

Conclusion : $\chi^2_{MN} <$ à la valeur seuil $\chi^2_{0.05} = 3.84$ (pour un ddl = 1) : les performances des deux techniques sont équivalentes.



12 BIBLIOGRAPHIE

12.1 Références légales et réglementaires

Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale : J.O. du 31 mai 2013.

Le règlement européen (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=EN>

12.2 Références normatives générales

ISO 22870 :2017, Examens de biologie médicale délocalisée (EBMD) — Exigences concernant la qualité et la compétence (AFNOR)

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

XP V03-044 : 2008, Critères de validation intra-laboratoire pour les méthodes de détection et quantification de séquences d'acides nucléiques spécifiques. XP V03-044 : Juillet 2008 (AFNOR).

ISO/IEC 17025:2017, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. (AFNOR)

ISO/CEI GUIDE 98-3 : 2008, Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) (AFNOR) et JCGM 100 : 2008 (<http://www.bipm.org/en/publications/guides/>).

NF EN ISO 15189 :2012, Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence.

NF EN ISO 15189 :2022, Laboratoires médicaux – Exigences concernant la qualité et la compétence.

ISO 21748 : Juillet 2017, Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure (AFNOR).

ISO Guide 31 : 2015, Matériaux de référence - Contenu des certificats et étiquettes (AFNOR)

ISO 10012 : 2003, Métrologie – Systèmes de management de la mesure – Exigences pour les processus et les équipements de mesure (AFNOR).

FD X07-021 : 1999, Normes fondamentales - Métrologie et applications de la statistique - Aide à la démarche pour l'estimation et l'utilisation de l'incertitude des mesures et des résultats d'essais (AFNOR).



ISO/CEI GUIDE 99, Normes fondamentales - Vocabulaire des termes fondamentaux et généraux de métrologie (VIM) (AFNOR) et JCGM 200 : 2012 (<http://www.bipm.org/en/publications/guides/>).

ISO 3534-1 : 2007, Statistique - Vocabulaire et symboles - Parties 1 et 2 (AFNOR).

ISO 9000: 2015, Systèmes de management de la qualité — Principes essentiels et vocabulaire. (AFNOR).

ISO Guide 33 : 2015, Utilisation des matériaux de référence certifiés (AFNOR)

ISO/TS 20914 : 2019, Spécification technique : Lignes directrices pratiques pour l'estimation de l'incertitude de mesure (AFNOR)

12.3 Documentation Cofrac / EA

[Document Cofrac SH REF 02](#), "Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870"

[Document Cofrac SH REF 05](#), "Règlement d'accréditation".

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

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

Document Cofrac SH GTA 01, "Guide technique d'accréditation en Biologie Médicale".

Document Cofrac SH GTA 02, "Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en Biologie Médicale".

Document Cofrac SH FORM 43, "Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale".

Document EA 4/17, "EA Position Paper on the description of scopes of accreditation of medical laboratories (EA)".

12.4 Validation des méthodes

[The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics](#). Eurachem Guides (2014).

[Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods](#). NATA Janvier 2018.

Validation de méthodes pour la recherche de mutations en génétique somatique. INCA (2014).

[A WHO guide for supplementary guidelines on good manufacturing practice \(GMP\): Validation](#). World Health Organisation (2006).



Radioprotection - Critères de performance pour l'analyse radio toxicologique - Partie 1 : principes généraux. NF ISO 12790-1: Juin 2009 (AFNOR).

Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches. SFSTP. STP Pharma Prat mai/juin 2003, vol. 13 (3): 101-138.

Guide de validation analytique. Méthodologie. STP Pharma Pratique 1992, vol. 2: 205-226.

Guide de validation analytique. Exemples d'application. STP Pharma Pratique 1992, vol. 2: 227-239.

Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation. SFSTP, 1997, vol. 7: 169-194.

[Validation of Analytical Procedures: text and methodology. Q2A, Q2B ICH \(2005\).](#)

IUPAC recommendations for defining and measuring detection and quantification limits, Analysis magazine 1994, v22, n°5 M24-M26.

Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude. NF V03-110 : Août 2011 (AFNOR).

Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole d'évaluation intra-laboratoire d'une méthode alternative d'analyse qualitative par rapport à une méthode de référence. XP V03-111 : Octobre 1995 (AFNOR).

Analyse des produits agricoles et alimentaires - Guide pour l'utilisation des matériaux de référence. FD V03-115: Juillet 1996 (AFNOR).

Évaluation des performances des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Norme NF EN 13612: Septembre 2002 (AFNOR).

[Guide EURACHEM/CITAC. Quantifier l'incertitude dans les mesures analytiques \(3ème édition\), 2012 \(www.lne.fr\).](#)

Estimer l'incertitude, Mesures et Essai. C. Perruchet et M. Priel, 2000, (Editions AFNOR).

12.5 Validation des méthodes en biologie médicale

A multicentric evaluation of IDMS-traceable creatinine enzymatic assays. Pieroni L (2011) Clin Chim Acta 412(23-24):2070-5

Accreditation for Microbiological Laboratories. Eurachem Guides (2013).

Analyses de biologie médicale : spécification et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. A. Vassault, D. Grafmeyer, J. de Graeve, R. Cohen, A. Beaudonnet, J. Bienvenu Ann Biol Clin 1999, 57 : 685-95.

CLSI EP17 – A2 Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline - Second Edition, 2012.



CLSI EP15 – A3 User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline - Third Edition, 2014

Continuous improvement of medical test reliability using reference methods and matrix-corrected target values in proficiency testing schemes: application to glucose assay. Delatour V. Clin Chim Acta. 2012 Nov 20;413(23-24):1872-8.

Current databases on biological variations : pros, cons and progress, Ricos C. *et al.*, Scand J Clin Lab Invest 1999, 59, 491-50. Updated in 2014 (www.westgard.com).

Dictionnaire des termes à l'usage de la validation des techniques, Commission validation de technique SFBC, Ann Biol Clin 1986, 44: 679-85.

Normes d'acceptabilité en hémostase. GEHT, Août 2014.

Plackett-Burman - wjyouden,ehsteiner,statistical manual of the AOAC International, 1975, ISBN 0-935584-15-3.

Protocole de validation de techniques (Protocole Valtec) - Document B. Vassault A., Grafmeyer D., Naudin C., Dumont G., Bailly M., Henny J., Gerhardt MF., Georges P. et les membres de la commission de Validation de techniques de la SFBC Ann. Biol. Clin., 1986, 44, 686-745.

Recommandations 2007 : prélèvements destinés aux tests d'Hémostase. GEHT/GFHT.

REMIC 2018

Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale (Document F). Giroud C, Dumontet M, Vassault A, Braconnier F, Féraud G Ann Biol Clin 2007, 65 : 185-200.

SFBC « Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale ». Ann Biol Clin 2010 ; **68** ; (Hors série no 1) : John LIBBEY ed (313 pages).

Référentiel en microbiologie médicale 2010, 4^e édition. Société française de microbiologie.

TIETZ Clinical guide to laboratory tests, Alan HB Wu, 4th edition, Saunders/Elsevier, 2006.

Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology, Holger et al., J. Clin. Virology 40 (2007): 93–98.

Young DS: Effects of Drugs and Clinical Laboratory Tests, 5th ed. Washington, DC, AACC Press, 2000.

Quality specifications and allowable limits for validation of methods used in clinical biochemistry (p.685-95), A. Vassault et al., Ann Bio Clin 57 n°6 de novembre – décembre 1999

Recommandations pour la mise en place et le suivi des contrôles de qualité dans les laboratoires de biologie médicale. Ann Biol Clin 2019;77:577-97



12.6 Sites Internet

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

Ph. Marquis, www.multiqc.com.

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

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

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

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

GFHT, groupe d'étude de la Société Française d'Hématologie, site.geht.org/Accueil/

Les fournisseurs de DMDIV et la norme NF EN ISO 15189 Version 2012 Position Paper ,
www.sidiv.fr/_GizBooFlow/data/4c8e7e24f3d57/NEWS/762/documents/5249a0942a04c.pdf

QUAMIC : Comité qualité de la société française de microbiologie, Recommandations 2019, SFM, www.sfm-microbiologie.org

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



13 Liste des membres du groupe de travail

- **Mme Valérie ADJIDE** (LBM CHU AMIENS PICARDIE)
- **Mme Maud BAUME** (LBM DES HOSPICES CIVILS DE LYON)
- **Mme Nathalie COLARD** (LBM du GCS – SHAB)
- **M François DARROUZAIN** (LBM CHU TOURS)
- **Mme Mélanie DAUTIGNY** (LBM du GCS BIOPARIV')
- **Mme Stéphanie DUCREUX** (LBM ALPIGENE)
- **Mme Florence FISCHER** (LBM CHU NICE)
- **Mme Fabienne FLOCH** (LBM CERBA)
- **M Julien FONSART** (LBM HU St LOUIS LARIBOISIERE F. WIDAL AP-HP)
- **M Jean-Louis GALINIER** (LBM BIOLAB AVENIR)
- **M Jean-Marc GIANNOLI** (LBM UNILIANS/BIOGROUP)
- **M Bernard GOUGET** (PRESIDENT COMITE SECTION SANTE HUMAINE - COFRAC)
- **M André HEIM** (ROCHE DIAGNOSTICS France)
- **Mme Annick JOLIVOT** (LBM CERBA)
- **M Charles-Alexandre JOSEPH** (LBM CH BOURG EN BRESSE/LBM CH NORD FRANCHE COMTE)
- **M Frédéric LECOMPTE** (LBM BIOPATH HAUTS DE FRANCE NORD)
- **M Sébastien LEFRANCOIS** (LBM CERBALLIANCE ILE-DE-FRANCE SUD)
- **Mme Anne HAY LOMBARDIE** (LBM CHU NANTES)
- **M Kader MERAH** (LBM CERBALLIANCE ILE DE FRANCE SUD)
- **M Jean-François MERITET** (LBM AP-HP HÔPITAL COCHIN)
- **M Bernard POGGI** (ProBioQual)
- **M Rayan SATER** (LBM UNIBIO)
- **M Florian SCHERRER** (LBM SYNLAB BARLA)
- **M Michel VAUBOURDOLLE** (LBM DES HUEP AP-HP)
- **Mme Marie-Christine ZIMMICH** (LBM ONCOLOGIQUE DE L'INSTITUT CLAUDIUS REGAUD)
- **M Olivier ERNY** (Biologiste Médical – COFRAC)
- **Mme Linda OBIANG** (COFRAC)