

ATELIER « BIOCHIMIE DES LIQUIDES DE PONCTION : TOUJOURS D'ACTUALITÉ ? »

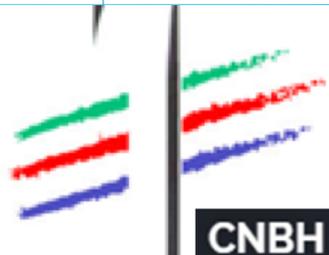
RETOUR D'EXPÉRIENCE SUR L'ACCRÉDITATION DES EXAMENS
SUR LIQUIDES DE PONCTION

29^{èmes} Journées Nationales CNBH

24/01/2020

CAROLINE RICHEL

HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON



www.chu-lyon.fr

RETOUR D'EXPÉRIENCE DU CHU DE LYON

DEMANDE D'AJOUT RÉALISÉE EN SEPTEMBRE 2019
EXAMENS ACCRÉDITÉS MAIS NON AUDITÉS



COFRAC : AIDE ET RECOMMANDATIONS

SH NEWS #15 - OCTOBRE 2018

La validation des matrices rares

Vous avez réalisé vos dossiers de vérification de méthodes pour les matrices classiques. Vous vous apprêtez à ajouter, à votre liste détaillée des examens, des examens réalisés sur des matrices « rares ». Comment faire ?

Le principe est de commencer par une caractérisation de cette matrice « rare » par rapport à la matrice qui a fait l'objet d'une vérification initiale. Si les caractéristiques physiques, chimiques, ou autres (viscosité, pH...) de cette matrice n'influencent pas directement le principe de méthode (ie le volume prélevé, le rapport de dilution, la fluidification, l'extraction, la calibration, ou l'étendue de mesure liés à cette matrice sont comparables à une matrice « courante »), il n'est pas utile de refaire de manière exhaustive le dossier expérimental. Des compléments peuvent toutefois être nécessaires.

Par exemple, votre LBM 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, votre LBM peut choisir de compléter son dossier de vérification au fur et à mesure du déroulement de son activité selon une planification établie (par exemple au regard d'une analyse de risques). Ainsi l'étude des interférences pourra être complétée à l'occasion de certains prélèvements particulièrement chyleux ou hémolysés, l'étude de la contamination pourra être renforcée à l'occasion de l'obtention de certains spécimens aux concentrations particulièrement élevées.

En conclusion, si les caractéristiques de la matrice ont une influence directe sur le principe de méthode, une validation des performances est attendue. Si votre laboratoire est accrédité en portée A, une demande d'extension à une flexibilité de type B est à formuler à votre pilote habituel.

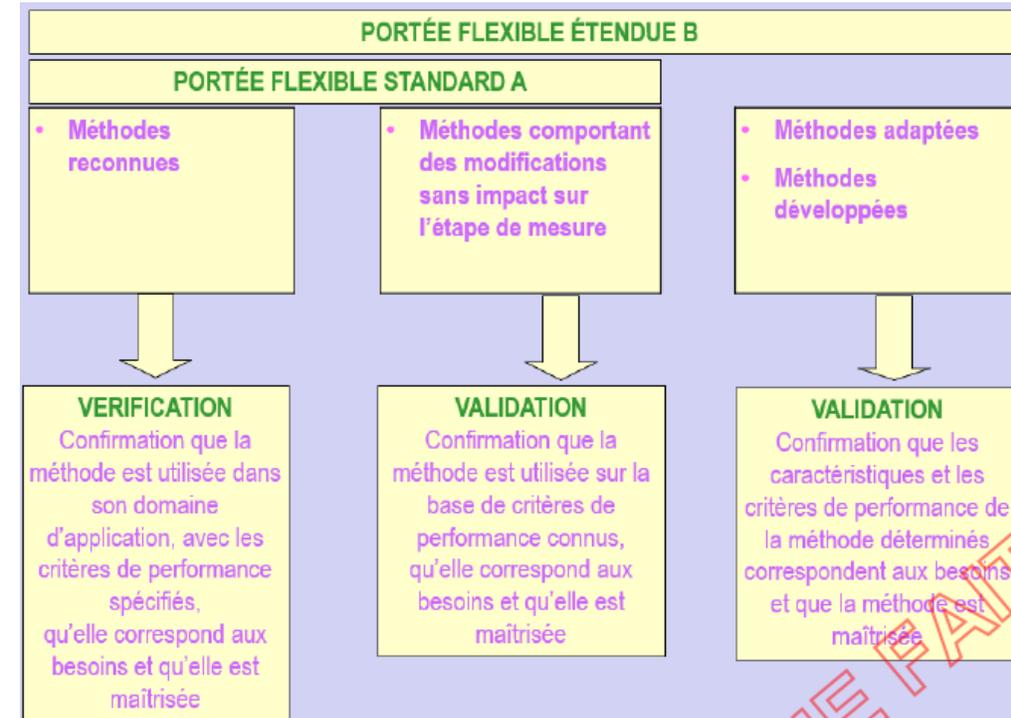
- *Extrait des paragraphes 7.1.1 et 7.2*

Les modifications

- non liées à l'étape de mesure
 - application à une nature d'échantillon biologique (matrice) inhabituelle et non validée *a priori* (par exemple ne figurant pas dans le mode d'emploi d'un DM-DIV marqué CE au titre de la réglementation en vigueur),
 - changement du support de prélèvement (tube, écouvillon, ...),
 - modification ou ajout d'un prétraitement analytique (dilution/concentration de la prise d'essai pour des échantillons précieux par exemple) ;
- relatives au matériel annexe
 - équipements auxiliaires préconisés (incubateur, ...),
 - produits chimiques à usage général de laboratoire (acide de pureté établie, ...);

ne sont pas considérées comme des adaptations de méthode et sont en conséquence couvertes par ce type de portée, tant que la structure peut démontrer que la modification est justifiée, validée et n'impacte pas l'étape de mesure.

La structure conserve la responsabilité pleine et entière des modifications apportées.



DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

- Etat des lieux
 - Examens prescrits, intérêt clinique?
 - Type de ponctions
 - Nature de tubes
 - Nombre de demandes
- Portée A ou B ?
- Analyse de risque
- Validation de méthode

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

ETAT DES LIEUX

6

- Au total 13 analytes dosés sur au moins 6 types de ponction (ascite, pleural, articulaire, drain, kyste, péricardique)

Prescription	Type de liquide	Nature de tube	Analytes	Intérêt
Systématique	Ascite / Pleural Divers	EDTA Poudrier	Protéines	Exsudat / transsudat ?
	Articulaire	Citrate	Protéines Lactates	Inflammatoire ? Sepsis ?
A la demande	Ascite Pleural Drain Péricardique Kyste	Héparine Poudrier	Protéines	Exsudat / transsudat ?
			Amylase / Lipase	Origine pancréatique ?
			Bilirubine totale Calcium Cholestérol / Triglycérides Créatinine / Urée Glucose Lactates LDH Sodium	→ Origine chyleuse ? → Urine ?

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

7

PORTÉE A OU B

- Dosage existant en portée A sur une matrice initiale (sang / urine)
 - Adaptation de méthode
 - Préanalytique ? : [nature de tube](#), [type de prélèvement](#)
 - Analytique ? : volume prélevé, dilution, limite de quantification ...
- Prouver que les adaptations réalisées n'interfèrent pas avec l'étape de dosage (cf SH REF 08 v06)
 - Dossier de **validation** de méthode portée **A**
 - [Dossier allégé par rapport à une portée B](#)

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

ANALYSE DE RISQUE

8

- Identique à la méthode initiale (sang / urine)
 - Principal risque : la matrice modifie-t-elle la réaction de dosage ? : **A évaluer**
 - Etude difficilement exhaustive : type de ponction / contexte
 - Epanchements présents uniquement en situation pathologique
 - Absence de liquide de ponction de référence
 - Mécanismes de formation identique : déséquilibre sécrétion/réabsorption
- ➔ Essais réalisés sur ascites et pleuraux et étendus à l'ensemble des liquides de ponction hors articulaire (essais dédiés)
- ➔ 1 dossier global liquide divers par analyte

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

9

- Dossier de VDM adapté
- ➔ Prouver que la matrice ne modifie pas le principe de dosage
 - Répétabilité : comparaison CV matrice liquide divers / sang-urine
 - Linéarité : tests de surcharge + dilutions en cascade

DÉMARCHE D'ACCREDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

10

- Répétabilité
 - 2 niveaux de concentration comparable / matrice sanguine ou urinaire
 - Comparaison CV : critère **[CV divers < CV sang +30%₍₁₎]**
 - Exemple : lipase

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> Sur échantillons sanguins (Cf SH Form Lipase sang)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu (SFBC)	Conclusion
Niveau bas	20	187	2.6	1.4	2	4.5	CONFORME
Niveau moyen	20	378	5.2	1.4	2	4.5	CONFORME
Niveau haut	20	931	13.5	1.4	2	3.8	CONFORME

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> Sur liquides divers							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu (SFBC)	Conclusion
Niveau bas	30	65	2.3	3.5	/	4.5	CONFORME
Niveau moyen	30	237	2.8	1.2	2	4.5	CONFORME

Conclusion : Les résultats observés sur liquides divers sont comparables à ceux obtenus sur matrice sanguine. Le niveau bas sur liquide divers est très inférieur au sang, les performances des niveaux moyens sont comparables. La matrice ne modifie pas les performances annoncées par le fournisseur.

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

11

- Test de surcharge
 - Préparation d'une solution mère : surcharge du liquide divers avec le calibrant le plus haut
 - Dilution en cascade
 - 5 points de gamme, mesure en triplicate
- Exemple : lipase
 - Liquide divers ayant une C° basse en lipase = 11 U/L
 - Calibrant le plus haut = 1343 U/L
 - Dilution au 1/3 en cascade

DÉMARCHE D'ACCREDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

- Test de surcharge

- Critères de conformité

- Absence de déviant (normes de suivi) : $LS = 3 \cdot \text{racine}(Sfi1^2 + Sfi2^2)$ en prenant $Sfi1=Sfi2$
- Différence $< 2.8 \cdot Sfi$
- Régression linéaire et comparaison avec la droite théorique

- Exemple : lipase

- Niv1 100 U/L Sfi=5 U/L - Niv2 200 U/L Sfi=11 U/L – Niv3 700 U/L Sfi=28 U/L

Ref échantillon	Date de l'analyse	Concentration théorique	Concentration mesurée	di		
		Résultat méthode 1 (xi)	Résultat méthode 2 (yi)	xi - yi	Limite sup	Limite inf
Solution mère	03/07/2019	677	694	-17.00	114.49019	-114.49019
Solution fille 1	03/07/2019	233	241.5	-8.50	48.598314	-48.598314
Solution fille 2	03/07/2019	85	90.3	-5.30	20.830409	-20.830409
Solution fille 3	03/07/2019	35.7	38.4	-2.70	11.394521	-11.394521
Solution fille 4	03/07/2019	19.2	20.4	-1.20	8.2364649	-8.2364649

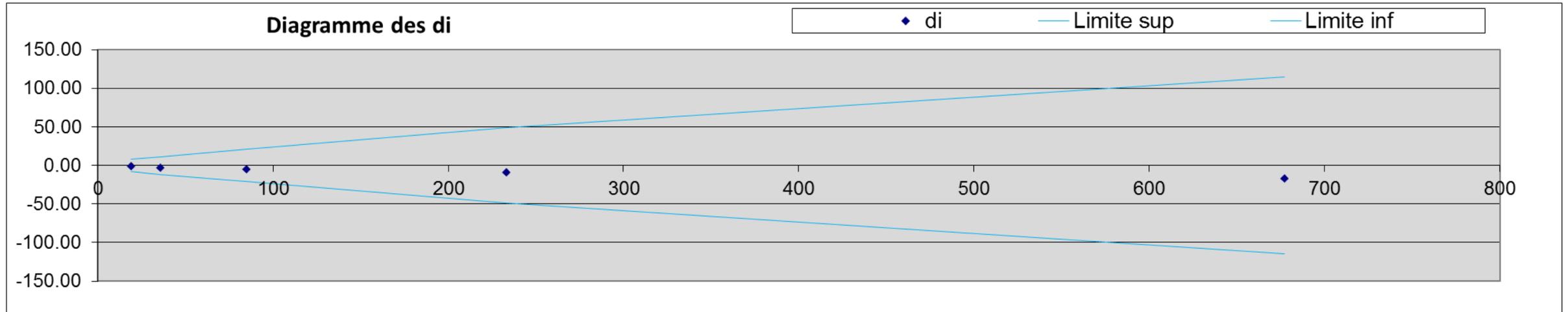
Différence $< 2.8 \cdot Sfi$ ✓



DÉMARCHE D'ACCREDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

13

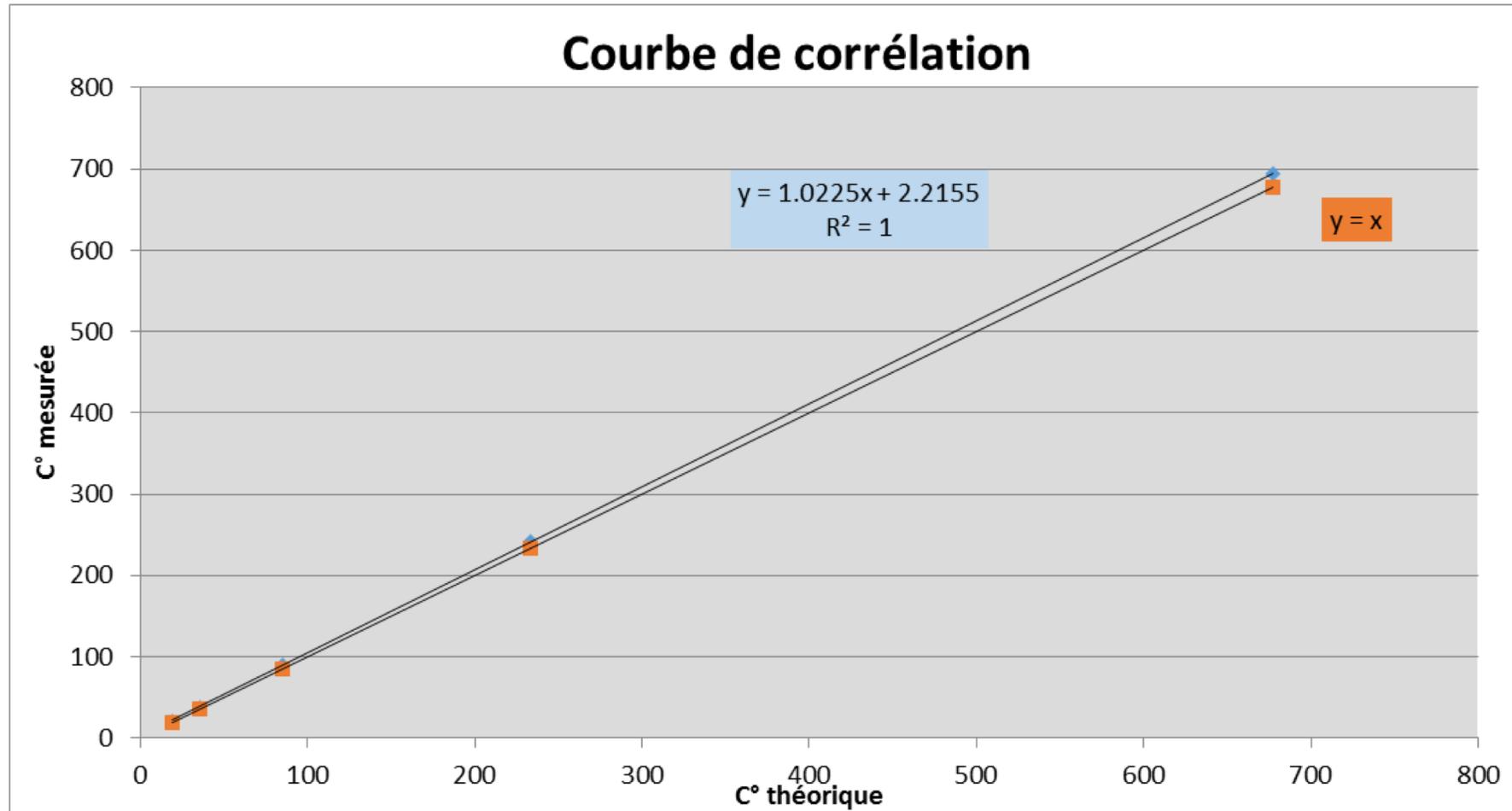


Absence de déviant (normes de suivi) : $LS = 3 \cdot \text{racine} (S_{fi1}^2 + S_{fi2}^2)$ en prenant $S_{fi1} = S_{fi2}$ ✓

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

14



Régression linéaire et comparaison avec la droite théorique ✓

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A

15

- Test de surcharge
 - Exemple : lipase

VERIFICATION DU COMPORTEMENT DE LA MATRICE	
Protocole	<u>Essai de dilution</u> : Préparation d'une solution mère (surcharge d'un liquide divers avec le calibrant le plus haut de la trousse) et dilution en cascade. 5 points de gamme et mesure en <u>triplicate</u> .
Résultats (cf PJ)	Gamme de 677 à 19.2 U/L Courbe de corrélation (concentration théorique vs concentration mesurée) : $Y = 1.0225X + 2.2155$ et $R^2=1$ Aucun déviant
Conclusion	Linéarité conservée La lipase dans le liquide divers suit le même comportement que le calibrant sérique : <u>immunoréactivité comparable</u> dans le liquide divers et le plasma/sérum.

Conclusion : La linéarité du dosage est conservée dans le liquide divers. Cette technique est donc applicable.

La matrice n'influence pas le dosage, on se réfère donc aux performances des CIQ sur matrice sanguine pour le suivi de la fidélité intermédiaire, la justesse, l'exactitude et l'incertitude de mesure.

DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

VALIDATION DE MÉTHODE PORTÉE A



16

- Evaluation de la matrice
 - Répétabilité ✓
 - Linéarité ✓
- ➔ Essais de matrice validés : la matrice n'impacte pas l'étape de mesure
- Autres items du dossier de validation de méthode
 - Reproductibilité / Justesse : pas de CIQ dédiés
 - Exactitude / Incertitude : pas d'EEQ dédiés
 - Interférences : notice réactif
 - Pas d'essais réalisés
 - En fonction de l'aspect du surnageant

Cf performances matrice initiale

Le suivi de méthode sera réalisé uniquement sur le dossier de matrice initiale (sang/urine)

INTERPRÉTATION

- Valeurs de référence : peu de données

Liquides divers	
Liquide pleural	<p><u>Protéines</u> : Un résultat supérieur à 30 g/L est en faveur d'un exsudat. En cas de d'aspect hémolysé du surnageant, le résultat est surestimé.</p> <p><u>Triglycérides</u> : Un résultat supérieur à 1.2 mmol/L est en faveur d'une nature chyleuse.</p>
Liquide d'ascite	<p><u>Protéines</u> : Un résultat supérieur à 25 g/L est en faveur d'un exsudat. En cas de d'aspect hémolysé du surnageant, le résultat est surestimé.</p> <p><u>Triglycérides</u> : Un résultat supérieur à 1.2 mmol/L est en faveur d'une nature chyleuse.</p>
Liquide péricardique	<p><u>Protéines</u> : Un résultat supérieur à 30 g/L est en faveur d'un exsudat. En cas de d'aspect hémolysé du surnageant, le résultat est surestimé.</p>
Liquide divers	<p><u>Amylase</u> : Un résultat supérieur à 100 UI/L est en faveur d'une origine pancréatique.</p> <p><u>Lipase</u> : La présence de lipase dans le liquide est en faveur d'une origine pancréatique.</p> <p><u>LDH</u> : Un résultat supérieur à 200 UI/L est en faveur d'un exsudat</p>

« Biologie des liquides d'épanchement T.Grancher et G.Jeanne ; Editions Biomérieux »

MERCI

www.chu-lyon.fr



HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON