

VALIDATION DE METHODES ET INCERTITUDES EN BIOLOGIE MEDICALE : COMMENT RESPECTER LES ECHEANCES DE LA REFORME ?

D. BENHAMOU

CT2M

Route de Lançon, 13250 Saint-Chamas

dbenhamou@ct2m.fr

Résumé

En France, les laboratoires de biologie médicale doivent faire face à une petite révolution de leurs activités avec l'obligation de l'accréditation ISO 15189 : une part importante de leurs analyses (80%) devra être accréditée au 31 octobre 2018 et au 1^{er} novembre 2014 (si amendement validé), ils devront prouver leur entrée dans une démarche qualité en concordance avec les exigences du Cofrac. Parmi ces preuves figurent les dossiers de validation de méthodes pour une méthode qualitative et quantitative, incluant l'estimation des incertitudes. Les enjeux et les problématiques seront discutés dans le présent article.

Summary

In France, laboratories of medical biology have to get through a reform of their activities with the obligation of ISO 15189 accreditation : the most part of their analysis have to be accredited in 2018, October 31th, and in November 2014, they have to prove their entrance in a quality approach in accordance with Cofrac specifications. Among those proofs, there are files of methods validation for a qualitative and a quantitative method including uncertainties estimation.

Issues and problematic will be discussed in this paper.

INTRODUCTION

En France, les laboratoires de biologie médicale doivent faire face à une petite révolution de leurs activités avec l'obligation de l'accréditation ISO 15189 : une part importante de leurs analyses (80%) devra être accréditée au 31 octobre 2018 et au 1^{er} novembre 2014 (si amendement validé), ils devront prouver leur entrée dans une démarche qualité en concordance avec les exigences du Cofrac. Parmi ces preuves figurent les dossiers de validation de méthodes pour une méthode qualitative et quantitative, incluant l'estimation des incertitudes.

Deux nouveaux documents, le SH GTA 04 et SH GTA 14, dont le premier est déjà téléchargeable sur le site internet du Cofrac, précisent les attentes du Cofrac et des évaluateurs sur ces deux thèmes. Cependant les laboratoires sont inquiets sur la manière avec laquelle ils vont pouvoir satisfaire à ces exigences, tout en mettant en place un système de management efficient et en continuant à réaliser leur métier, c'est-à-dire rendre des analyses de biologie médicale à des patients et des prescripteurs, parfois en urgence.

Plusieurs enjeux et problématiques seront discutés dans cet article :

1- Organisation : la plupart des laboratoires de biologie médicale réalise 200 à 600 analyses. Par quoi commencer ? Quels sont les types d'analyses ou les secteurs les plus faciles à traiter ? Comment gagner du temps et optimiser le travail pour répondre aux exigences ? Quelle est l'organisation retenue pour les laboratoires multi-sites de petite taille ? pour les laboratoires de gros hôpitaux ?

Sur cette partie, l'expérience du CT2M dans l'accompagnement des laboratoires de biologie médicale sera présentée.

2- Contenu des dossiers et exemples : quel est le contenu et le temps nécessaire pour rédiger ces dossiers ?

3- Amélioration : la validation des méthodes et l'estimation des incertitudes ne sont pas seulement une obligation pour répondre à la réglementation. Ils sont également très utiles pour l'interprétation des résultats, pour l'amélioration de la qualité des analyses et pour une meilleure connaissance des sources de variabilité dans la pratique quotidienne.

DES EVOLUTIONS IMPORTANTES

EVOLUTIONS DE LA NOTION DE VALIDATION DE METHODES

Avec la biologie médicale, des nouvelles notions apparaissent dans le domaine de l'accréditation de méthodes non normalisées : la vérification de méthodes, l'adaptation et l'adoption de méthodes.

Adapter une méthode (SH GTA 04) :

« Modifier une méthode validée pour l'ajuster aux besoins du LBM / du client (patient / prescripteur) ».

♦ Portée B : Validation de méthode

La portée B concerne aussi les méthodes développées par le laboratoire

Adopter une méthode (SH GTA 04) :

« Intégrer dans la portée d'accréditation une méthode reconnue (méthode normalisée, méthodes « fournisseur » correspondant à des DM-DIV marqués CE, etc...) ».

♦ Portée A : Vérification de méthode

La vérification de méthode n'est pas un « doublon » des études approfondies faites par le fournisseur pour le marquage CE.

C'est une démonstration que le processus d'analyse dans sa globalité correspond, dans les conditions opératoires du laboratoire, à l'utilisation prévue.

EVOLUTIONS DANS LE DOMAINE DES INCERTITUDES

« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est **pertinent** et **possible**. »

« *pertinent* » = *aux seuils de décision clinique et pour la comparaison de résultats (antériorité) (quasiment pour toutes les analyses quantitatives)*

« *possible* » = *techniquement possible (analyses quantitatives)*

Cette notion de « pertinence » n'apparaît pas dans l'ISO 17025.

EVOLUTIONS DU COFRAC

Le Cofrac fournit un guide pour la validation et la vérification des méthodes en LBM, un guide pour l'estimation des incertitudes et des trames pour les dossiers de vérification et de validation de méthodes. Aucun autre domaine d'activité n'a fait l'objet de telles attentions, mais le nombre de laboratoires, le nombre d'analyses concernées et les enjeux d'une accréditation obligatoire justifient une implication et un souci de cohérence de la part du COFRAC.

ORGANISATION

PAR OU COMMENCER ?

Tous les laboratoires désirant obtenir une accréditation COFRAC sont confrontés à la difficulté de mettre en place les exigences de la norme d'accréditation tout en maintenant leur activité. Pour les laboratoires de biologie médicale (LBM), c'est encore plus critique au vue du nombre d'analyses et du délai obligatoire fixé par la réglementation. Une démarche coordonnée et une organisation spécifique sont donc obligatoires.

Outre la mise en place d'un Système de Management de la Qualité, un des points bloquants et longs est la réalisation des dossiers de vérifications et de validations de méthodes incluant l'estimation des incertitudes.

C'est donc par là qu'il est conseillé aux laboratoires de débuter. Une lecture poussée du guide SH GTA 04 du Cofrac et une formation sont nécessaires. Puis, il est nécessaire de rédiger une procédure ou plusieurs procédures associées : procédure de validation de méthodes, de vérification de méthodes, d'estimation des incertitudes et de gestion de la procédure flexible.

En terme de types d'analyses, les LBM n'ont pas vraiment le choix : un dossier de

vérification/validation de méthode quantitative et un quantitatif sont obligatoires pour passer l'accréditation partielle de 2014, à moins que le laboratoire soit déjà accrédité sur une ou plusieurs analyses.

Par contre, le laboratoire doit faire un choix stratégique important du ou des secteurs ou analyses qu'il souhaite accréditer en premier. Le laboratoire doit avant tout prendre en compte les éléments suivants :

- Changements d'automate, de méthodes
- Déménagements prévus
- Méthode adaptée (accréditation en portée B) ou méthode adoptée (accréditation en portée A): une validation de méthode étant beaucoup plus longue et complexe qu'une vérification de méthode, il est conseillé de partir sur une méthode adoptée rapport à celle du fournisseur.

Les LBM partent souvent sur des analyses en Biochimie, en Hématologie ou en Hémostase. D'autres secteurs comme la bactériologie ou la biologie moléculaire où les laboratoires ont souvent développés leurs propres méthodes, passent souvent pour des méthodes plus difficiles et longues à valider.

COMMENT GAGNER DU TEMPS ET OPTIMISER LE TRAVAIL ?

Les conseils ci-dessous donnés pour gagner du temps et optimiser le travail sont issus de l'expérience du CT2M dans l'accompagnement des LBM :

- Définir un pilote interne ou externe pour coordonner les actions. Il est souhaitable que ce pilote est une bonne connaissance des documents du COFRAC et ait été formé, mais il n'est pas obligatoire qu'il ait une parfaite connaissance des analyses.
- Définir et réunir un groupe de travail regroupant une personne (biologiste de préférence) par secteur à accréditer
- Rédiger une procédure commune
- Rédiger deux trames de dossiers de vérification/validation de méthodes : une quantitative et une qualitative. Si ces trames ne sont pas sous Excel (comme les trames du Cofrac qui sont sous word), il faudra également prévoir des fichiers Excel pour exploiter les données
- Réaliser un dossier de chaque type de méthodes et réadapter la procédure et la trame de dossier si nécessaire
- Imprimer et conserver toutes les données brutes

Nos diverses expériences d'accompagnement nous montrent que l'organisation retenue en Centre Hospitalier et en LBM privés est très variée. Ainsi, s'il n'existe pas une façon de faire à privilégier, le contenu des dossiers et la façon de faire est souvent très similaires et très proches des documents publiées par le COFRAC. C'est ce que nous allons voir dans le paragraphe suivant.

CONTENU DES DOSSIERS

Que ce soit de la validation ou de la vérification de méthodes, le contenu du dossier suit sensiblement la même trame et peut être résumé en 5 parties :

- 1) Décrire la méthode
- 2) Définir des performances à évaluer et des limites acceptables (objectifs à atteindre)
- 3) Réaliser la vérification bibliographique
- 4) Réaliser la vérification expérimentale dans le laboratoire et le traitement statistique des résultats
- 5) Conclure concernant l'aptitude de la méthode

1) Décrire la méthode

Cela consiste à rassembler les informations suivantes :

- Analyte / Mesurande
- Principe et méthode de mesure
- Type d'échantillons
- Type de tubes
- Prétraitements de l'échantillon
- Unités
- Intervalle de référence
- Marquage CE
- Référence du réactif
- Référence des étalons / raccordement métrologique
- Type d'étalonnage

2) Définir des performances à évaluer et des limites acceptables (objectifs à atteindre)

Important : le choix des critères de performance à évaluer et des limites acceptables pour une méthode donnée doit se faire préalablement à l'étude expérimentale.

On s'appuiera sur les **recommandations des sociétés savantes**, de groupes de travail, de publications scientifiques (SFBC, Ricos, ...) et on confrontera les résultats aux **données du fournisseur**.

3) Réaliser la vérification bibliographique

Les LBM doivent regrouper les informations bibliographiques ci-dessous ou faire référence à des documents et s'assurer que ces performances annoncées répondent à leurs besoins et à l'utilisation prévue des résultats.

| Analyses quantitatives | Analyses qualitatives |
|---|--------------------------|
| Spécificité analytique | Spécificité analytique |
| Fidélité | Sensibilité diagnostique |
| Justesse | Robustesse |
| Intervalle de mesure (LQ et domaine de linéarité) | |
| Interférences | |
| Contamination entre échantillons | |
| Stabilité des réactifs | |
| Comparaison avec une méthode de référence | |

4) Vérification expérimentale dans le laboratoire et traitement statistique des résultats

Portée A :

| Analyses quantitatives | Analyses qualitatives |
|--|----------------------------------|
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | |
| Justesse (dès que possible) | |
| Incertitude | Incertitude (Analyse de risques) |
| Contamination inter-échantillons pour les paramètres sensibles | |
| Comparaison avec une méthode déjà utilisée au labo (si possible) | |

Si besoin, d'autres performances pourront être évaluées : intervalle de mesure (LQ et domaine de linéarité), interférences, intervalles de référence, ...

Portée B :

| Analyses quantitatives | Analyses qualitatives |
|--|--|
| Spécificité | Spécificité analytique et sensibilité diagnostique |
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | |
| Justesse (dès que possible) | |
| Intervalle de mesure (LQ et limite de linéarité) | |
| Incertitude | Incertitude (Analyse de risques) |
| Contamination entre les échantillons | |
| Stabilité des réactifs | |
| Robustesse (si besoin) | Robustesse |
| Interférences | |
| Intervalles de référence | |
| Comparaison avec une méthode de référence (si existe) | |
| Comparaison avec une méthode déjà utilisée au labo (si possible) | |

Le LBM devra présenter les résultats obtenus et annexer les données brutes.

Il devra également préciser :

- Le ou les opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification / validation
- La référence de la procédure de vérification / validation utilisée
- La période d'évaluation

5) Conclusion et décision concernant l'aptitude de la méthode

Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude ou d'inaptitude de la méthode par rapport au besoin.

Le dossier doit préciser

- le nom et la signature de la personne autorisant la mise en service de la méthode (biologiste)
- La date de mise en service

METHODOLOGIE

La méthodologie pour évaluer les différentes performances est pour de nombreux paramètres décrite dans le SH GTA 04.

Les parties les plus longues de ces dossiers sont sans doute la vérification bibliographique et l'analyse des risques et leurs maîtrises (partie Incertitudes).

La méthode pour l'estimation d'incertitudes pour les analyses quantitatives dénote des méthodes « classiques » par son pragmatisme, sa simplicité et sa rapidité. Elle présente également le gros avantage d'utiliser des données existantes dans le laboratoire.

Deux composantes principales d'incertitudes sont retenues et doivent permettre d'englober la majeure partie des facteurs d'influence (sauf le pré-analytique) :

- 1) La composante de fidélité estimée en conditions de fidélité intermédiaire :

Il est demandé aux LBM de :

- Exploiter au moins 30 valeurs de CIQ (du même lot) sur une période la plus longue possible.
- Calculer le Coefficient de Variation (CV) :

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

Avec S_{FI} : écart-type de reproductibilité interne des valeurs du CIQ exploitées (voir annexe 1)
 m : moyenne des valeurs du CIQ exploitées

L'incertitude de fidélité pour le niveau de concentration C_i sera donc :

$$u_{\text{fidélité}} = CV \times C_i$$

- 2) La composante de justesse estimée à l'aide des Evaluations Externes des LBM :

Pour chaque résultat d'EEQ, le laboratoire peut calculer les erreurs de justesse E_i obtenues :

$$E_i = X_{\text{labo}} - X_{\text{ref}}$$

- $i = 1 \dots n$, n étant le nombre total d'EEQ exploitées sur la période la plus courte possible.
- X_{ref} étant déterminé par l'organisateur de l'EEQ

Il faudra exploiter les résultats :

- du Contrôle Qualité National (CQN),
- des EEQ ponctuels
- les confrontations externes du CIQ

Le calcul de u_{justesse} par niveau de concentration se fera ensuite en divisant l'erreur de justesse maximale (en valeur absolue) par $\sqrt{3}$:

$$u_{\text{justesse}} = \frac{\text{Max}|E_i|}{\sqrt{3}}$$

Cette approche qui pourrait paraître simpliste donne toutefois une approche intéressante dont de nombreux autres domaines d'activités pourraient s'inspirer.

Elle pourrait toutefois évoluer un peu avec la sortie du SH GTA 14.

Avantages de la méthode :

- Méthode rapide et simple y compris en terme de calculs
- Méthode ne nécessitant pas de réaliser de nouvelles expériences

Limites de la méthode :

- Difficulté de prendre en compte les phases pré analytiques, l'échantillonnage, ...
- Nécessité d'avoir un nombre d'essais inter laboratoires suffisant pour avoir une estimation valable de la composante de justesse
- Impossibilité de connaître la contribution de chaque facteur d'influence

TEMPS NECESSAIRE POUR LA REDACTION DE CES DOSSIERS ET COMMENT TENIR LES ECHEANCES DE LA REFORME ?

Il faut évidemment dissocier les cas des dossiers de validation de méthodes des cas de vérification de méthodes.

Il est très difficile voir impossible de chiffrer le temps nécessaire à une validation de méthodes car les cas peuvent être très variés : méthodes complètement développées par le laboratoire ou au contraire adaptation de quelques éléments de la méthode, comme le choix des réactifs par exemple.

Il est par contre plus facile de quantifier le temps pour vérifier une méthode car le nombre d'essais est bien cadré :

- Cas des méthodes quantitatives :

Notre expérience nous prouve que le premier dossier de vérification prend environ 5 jours. Ensuite, il faut compter environ une journée par analyse pour réaliser le dossier de vérification complet à transmettre au Cofrac.

On voit immédiatement que le temps nécessaire est très important pour accréditer toutes les analyses (200 à 600 en LBM).

Même pour ceux qui ont démarré dès la parution du décret, début 2010, vont devoir tenir

un planning très strict et faire preuve de volontarisme pour tenir les délais.

Les LBM vont également avoir tendance à limiter le nombre de méthodes développées ou adaptées, ou à les sortir de leur périmètre d'accréditation.

De plus, un phénomène important est actuellement observé dans la biologie médicale, publique ou privée : la mutualisation des moyens à travers la création de laboratoires multi-sites ou de plateforme d'analyses. La réalisation de ces dossiers n'en est certes pas la raison principale (qui est financière), mais ces restructurations sont également forcément liées au sentiment d'être face à une quantité de travail insurmontable qu'ont les biologistes.

Mais en même temps, ont-ils vraiment le choix ?

Voici donc quelques conseils pour tenir les échéances de la réforme ?

- commencer le plus tôt possible
- former son personnel
- mettre à contribution son fournisseur (notamment pour la vérification bibliographique et lors de l'achat d'un nouvel automate)
- définir un ou des pilotes et si nécessaire des groupes de travail
- définir un planning et faire des points réguliers : autrement dit, faire de la gestion de projet

VALIDATION/VERIFICATION DES METHODES ET ESTIMATION DES INCERTITUDES ET AMELIORATION CONTINUE

Même si comme on le disait dans le paragraphe précédent, la constitution de ces dossiers prend un temps considérable, elle devrait amener des sources importantes d'amélioration pour les LBM pour à condition qu'ils aient le temps de les exploiter et de les mettre à profit.

Le premier point est l'utilisation de l'incertitude pour :

- connaître en interne le niveau de confiance associé à sa mesure et d'en permettre le suivi dans le temps car l'incertitude de mesure devra être actualisée régulièrement par les laboratoires.
- se comparer par rapport aux incertitudes annoncées par les sociétés savantes (SFBC, Ricos, ...), et si l'incertitude est trop importante,

de trouver des pistes pour la diminuer (problèmes de justesse ou de fidélité)

- conseiller le prescripteur sur l'interprétation des résultats fournis aux niveaux des seuils thérapeutiques pour une interprétation clinique pertinente.

- comparer deux résultats obtenus sur un même échantillon par deux laboratoires, deux méthodes ou deux instruments différents. Cela sera utile pour corréliser deux méthodes ou deux automates par exemple.

Les résultats de validation/vérification de méthodes seront également une source importante d'amélioration :

- les écarts-types de répétabilité et les de fidélité intermédiaire obtenus permettront de fixer des critères objectifs de repasses (ISO 5725-6 : $2,8xS_r$ pour deux résultats uniques obtenus en conditions de répétabilité et $2,8xS_{FI}$ pour deux résultats uniques obtenus en conditions de fidélité intermédiaire

- les résultats des comparaisons de méthodes aideront à l'interprétation des antécédents de patients lors d'un changement de méthodes et à répondre à l'exigence suivante de l'ISO 15189 :

« § 5.5.7 Si le laboratoire envisage de modifier une procédure analytique de sorte que les résultats ou leur interprétation risquent de différer significativement, les implications doivent être expliquées aux utilisateurs par écrit avant d'appliquer le changement. »

- l'analyse des risques permettra de prévenir les problèmes, d'agir en préventif et éviter l'immobilisation de l'instrument en raison de paramètres d'influences qui ne seraient pas maîtrisés.

- réfléchir au plus tôt à ses besoins et à l'utilisation prévue des résultats afin de ne pas se retrouver avec un automate ou une méthode qui n'y correspond pas.

CONCLUSION

Même si la quantité de travail est très importante, les LBM qui relèveront le défi se retrouveront en 2018 avec le sentiment d'avoir énormément progressé dans la connaissance et la fiabilité des analyses. Est-ce que cela ira de pair avec la qualité des soins prodigués au patient ? C'est toute la question qui anime les professionnels de la biologie en ce moment.

Références

[1] LAB GTA 14 – Guide d'évaluation des incertitudes de mesures des analyses de biologie médicale – Novembre 2006 – www.cofrac.fr .

[2] ISO 5725 – Application de la statistique Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure, Décembre 1994.

[3] SH GTA 04 – Guide technique d'accréditation de vérification / validation des méthodes en Biologie Médicale – Avril 2011 – www.cofrac.fr .