

# Accréditation en auto-immunité : retour d'expérience

S. COITO<sup>1</sup>

## RÉSUMÉ

L'auto-immunité est complexe et l'accréditation dans ce domaine suscite de nombreuses questions, très précises, portant essentiellement sur le dossier de validation. Notre expérience de 6 ans d'audits nous a montré que, bien que le dossier de validation soit très important, il ne faut néanmoins pas négliger d'autres aspects comme les services supports. Les analyses d'auto-immunité étant majoritairement qualitatives, le point essentiel des dossiers de validation est l'analyse de risque. Il faut identifier avec précision les points critiques, et suivre les risques résiduels dans le temps. De même, les formations et habilitations du personnel sont indispensables pour s'assurer de la qualité des résultats d'analyse.

**MOTS-CLÉS :** accréditation, auto-immunité, analyses de risques, points critiques, risques résiduels, validation, vérification, traçabilité.

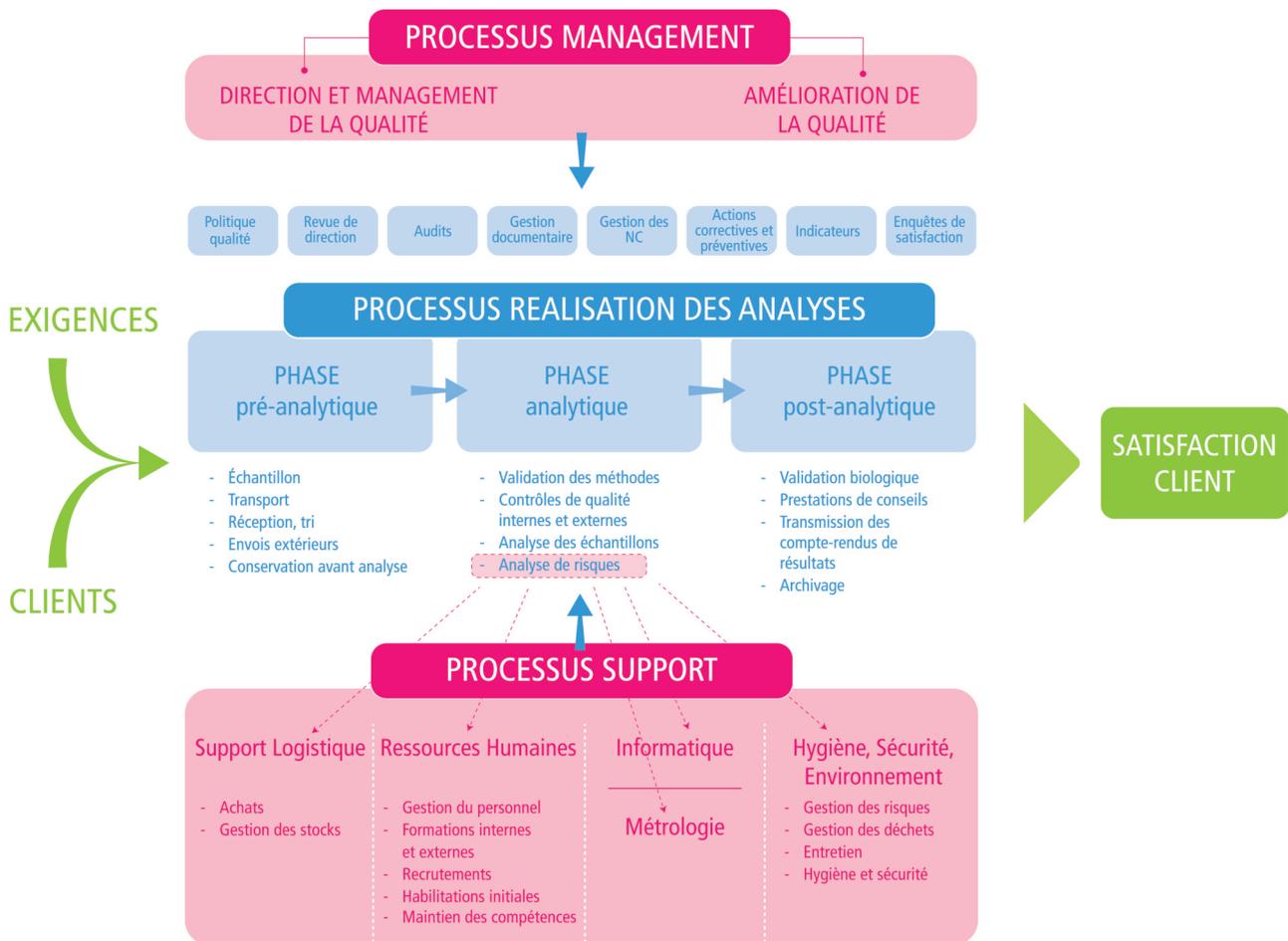
## I. - INTRODUCTION

Le secteur auto-immunité regroupe de nombreuses analyses courantes telles que la recherche des anticorps anti-nucléaires et d'autres, beaucoup plus spécialisées, comme la détection des anticorps anti-neuronaux, par exemple, qui ne sont effectuées que par quelques laboratoires. La diversité des anticorps recherchés, les différentes techniques proposées, et surtout l'existence d'une multitude de trousses de réactifs, rendent d'autant plus difficiles des comparaisons entre techniques. De plus, des contrôles de qualité externe ne sont pas disponibles pour tous les anticorps. L'accréditation du secteur auto-immunité est donc complexe comparativement à d'autres secteurs où les validations de dossiers sont beaucoup plus standardisées. En effet, de nombreux documents existent sur l'accréditation des analyses quantitatives comparativement aux analyses qualitatives (1), mais peu concernent le secteur de l'auto-immunité (2). Des ouvrages offrent une aide précieuse (3-4-5) et le retour d'expérience des laboratoires déjà accrédités peut apporter des précisions sur ce qui doit être mené (6). Notre laboratoire est accrédité depuis 6 ans et au fur et à mesure des audits, nous avons amélioré notre pratique quotidienne.

Le cœur de la biologie clinique est l'analyse biologique et tout gravite autour du résultat attendu. La validation de méthodes comprend aussi bien des validations de méthodes que des vérifications de performances des valeurs de résultats ou la prise en compte des facteurs pouvant avoir une influence sur ce résultat, que ce soit au niveau de la maintenance des automates, de l'habilitation du technicien qui examine une lame d'immunofluorescence indirecte (IFI) ou du biologiste qui doit conseiller son prescripteur en fonction du résultat, voire du contrôle de la pipette qui a servi à déposer le sérum sur la lame. Ainsi, les services supports interviennent de nombreuses façons dans le processus analytique (Figure).

Cet article traite de la phase analytique, mais prend en compte les différents rôles des services support ayant un impact sur celle-ci, et il souligne les points discutés lors des audits, ainsi que les éléments importants qui en sont ressortis pour la poursuite d'une démarche de qualité.

<sup>1</sup> Laboratoire Luxembourgeois d'Immuno-Pathologie (LLIP), 8, avenue du Swing, 4367 Belvaux, Luxembourg.



**Figure - Processus qualité.** Le processus « réalisation des analyses » est en interaction constante avec les autres services comme le management de la qualité ou les services supports. Tous les services interfèrent pour, au final, aboutir à des analyses de qualité qui satisferont les clients.

## II. - PROCESSUS ANALYTIQUE : LE DOSSIER DE VALIDATION

Le Comité français d'accréditation (Cofrac) a publié des guides (7) apportant des précisions sur les points de la norme ISO 15189 (8). Le guide de vérification et de validation des méthodes en biologie médicale reprend les différents points à connaître avant de faire le dossier de validation. Les informations pertinentes sont le type de flexibilité (A ou B), le type de méthode (quantitatif ou qualitatif), puis la vérification comprend trois points : l'étude de documents bibliographiques, la détermination des critères de performances pertinents et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes, et enfin la réalisation des vérifications expérimentales. Le Cofrac insiste bien sur le fait que les critères de performances et limites d'acceptabilité doivent être établis préalablement à l'étude expérimentale et doivent refléter l'état de l'art et de la pertinence clinique.

### A) Choix de la méthode

La détection des autoanticorps peut faire appel à différentes méthodes : immunofluorescence indirecte, immunoenzymologie, radio-immunologie, immunodiffusion,

immunonéphélométrie, immunodot, immunotransfert... Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de techniques standardisées. Les résultats dépendent ainsi des techniques utilisées, mais aussi du choix, par les fournisseurs, des préparations antigéniques qui peuvent être de différentes origines tout comme les procédés de production et d'utilisation. Ainsi, la présentation des antigènes est différente selon l'approche analytique : ELISA, immunodot, immunofluorescence indirecte, fluorimétrie en flux, chemiluminescence.

Par ailleurs, il existe des facteurs de variations tels que la nature de l'antigène fixé [recombinant ou purifié, origine,...], du conjugué et des calibrateurs, ou bien la composition du milieu réactionnel... limitant également les comparaisons entre les méthodes et techniques.

Ainsi, le choix d'une méthode doit être effectué préalablement au processus de validation. Il doit prendre en compte les avancées technologiques ainsi que la performance clinique. Il repose principalement sur l'analyse de la bibliographie, la lecture attentive du dossier technique du fournisseur, le marquage CE des réactifs et sur les performances des méthodes estimées lors d'expertises ou d'évaluations, et lors de communications scientifiques.

### Points clés

- Avancées technologiques
- Performance clinique
- Bibliographie
- Dossier technique du fournisseur potentiel
- Marquage CE des réactifs
- Performances des méthodes estimées lors d'expertises ou d'évaluations, lors de communications scientifiques
- Coût de la méthode

### B) Description du processus

Chaque étape doit être décrite du prélèvement jusqu'au compte rendu.

Les différents points peuvent être :

- **Analyte et mesurande** : définir les substances que l'on recherche ou mesure par la méthode évaluée
- **Matrice analysée** : à quels milieux biologiques s'applique cette méthode (sérum, LCR,...) ?
- **Principe de mesure** de la méthode évaluée : description très brève de celle-ci (ELISA, RIA, lecture microscopique, ...) et, le cas échéant, des différentes étapes
- **Type de récipient**, additifs (support de prélèvement, tubes...)
- **Prétraitement de l'échantillon** (centrifugation, dilution, élution, concentration,...)
- **Format des données brutes** (densité optique, ratio, données chiffrées issues d'une caméra) et format du résultat
- **Expression du résultat** : valeur chiffrée, score, positif/négatif, présence/absence, aspect de la fluorescence
- **Interprétation du résultat** : positif, négatif, douteux
- **Intervalles de références**
- **Marquage CE** ou non
- **Instruments** (liste des analyseurs automatiques, équipements intermédiaires, équipements informatiques et équipements de mesure raccordés ou non)... sans n° de série
- **Références des réactifs** (référence fournisseur, version notice) et des consommables : sans n° de lot
- **Matériaux d'étalonnage** (références : CIQ, témoins fabricant...)/nombre de niveaux et valeurs
- **Portée** : indiquer le type de portée auquel se rattache la méthode évaluée (A ou B) (9)
- **Type de méthode** (9)
  - **Quantitative** : elle fournit un résultat chiffré sur une échelle continue, à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité ou une activité donnée. Sont également assimilées au type quantitatif, les méthodes dont le résultat est extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable, interprété par rapport à un seuil et exprimé de manière qualitative (positif/négatif...).
  - **Qualitative** : le résultat est obtenu par observation ou lecture d'une réaction, par comparaison avec des témoins positif et, négatif, ou d'un titre fixé. Elle fournit une information sur la présence ou l'absence de l'analyte, ou bien sur une activité supérieure à celle du témoin donné.

### C) Analyse de risques

Il est important d'identifier les **facteurs d'influence** susceptibles d'introduire une variation sur le résultat (10). L'analyse de risques et l'**identification des points critiques** est l'étape cruciale en auto-immunité. Cette étape permet de lister toutes les étapes par l'analyse des 5M (milieu, main-d'œuvre, moyens, méthode, matière), d'identifier les points critiques, et les **moyens de détectabilité**. Cette étape est la plus importante lorsqu'il s'agit d'analyses qualitatives. Elle permet de vérifier si l'ensemble du processus est maîtrisé ou non. Il faut donc lister tous les points intervenant dans le rendu de résultats et pour chacun d'eux, évaluer la **gravité** (importance de l'impact sur un résultat d'analyse), la **fréquence** (nombre de fois qu'un risque est détecté ou susceptible de se produire pendant une durée déterminée), la **détectabilité** (probabilité de non-détection de la défaillance) et la **criticité** (influence sur un résultat d'analyse, mesuré en multipliant la fréquence avec la gravité et la détectabilité).

La gravité (G) de l'anomalie sur le processus analytique et ses incidences sur le diagnostic, le traitement ou l'épidémiologie de la pathologie considérée peut être cotée :

- 1, pour aucune incidence
- 2, pour une incidence probable
- 3, pour une incidence certaine

La fréquence (F) d'apparition des anomalies constatées par le laboratoire peut être également chiffrée :

- 1, pour une fréquence au plus d'une fois par an
- 2, pour une fréquence de deux à trois fois par an
- 3, pour une fréquence supérieure à trois fois par an

La détectabilité (D) de l'anomalie au cours du processus analytique incluant la phase pré- et post-analytique peut être aussi cotée :

- 1, pour une anomalie détectable au cours du processus analytique
- 2, pour une anomalie dont la détection peut être possible au cours du processus analytique
- 3, pour une anomalie indétectable au cours du processus analytique

L'indice de criticité (IC) peut être alors calculé en utilisant la formule suivante :

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

Quelques exemples existent dans d'autres secteurs notamment en bactériologie (11).

L'analyse de risque doit préciser l'étape critique, les risques potentiels et leur détection si possible, les moyens de leurs maîtrises et la vérification de l'efficacité de ces actions sur la maîtrise du risque. **Les points critiques résiduels** avec leurs indicateurs seront synthétisés dans le dossier de validation.

Ainsi, pour chaque événement potentiel défavorable identifié, le laboratoire doit pouvoir démontrer qu'il a, *a priori* identifié les différents risques qui doivent être revus *a posteriori*, afin d'intégrer le cas échéant ces nouvelles données à l'analyse de risque.

Les points à évaluer sont, par exemple :

- **Revue de la demande**
- **Modalités de prélèvement**
- **Échantillon** : type et qualité de l'échantillon reçu pour analyse, tels que l'aspect du sérum, ...
- **Réactifs** : conditions d'acheminement, stockage, stabilité, péremption
- **Modes opératoires**
- **Personnel** (qualification, habilitation) : préciser les références des procédures et enregistrements
- **Matériel d'analyse** utilisé : automate, logiciel associé, pipettes, microscope, lecteur de radioactivité, ...
- **Équipement, logiciel** : exigences métrologiques (définir les paramètres critiques), exigences informatiques spécifiques (algorithmes décisionnels, connexion, paramétrage, ...)
- **Réactifs utilisés** : trousse commerciale, réactifs préparés au laboratoire, ...
- **Conditions ambiantes** requises (température, organisation des locaux, bruit, vibrations, éclairage, ...)
- **Matériaux de référence** : calibrants, témoins positifs ou négatifs, ...
- **Matériaux de contrôles/évaluations de qualité**, internes et externes (CIQ et EEQ) : CIQ commercialisés, CIQ « maison », EEQ commercialisés, EEQ inter-laboratoires, ...
- **Transferts informatiques**

Les actions éventuelles à mettre en place peuvent être :

- Acquisition ou qualification de matériel
- Formations ou informations nécessaires (personnel ou clients)
- Mise à jour de procédures
- Modifications dans le système informatique et logiciel (SIL) ou les interfaces
- Gestion des réactifs, contrôles, matériaux de référence (achat, gestion des stocks)

### 1) Le personnel

Un facteur de risque critique en biologie est une mauvaise formation et habilitation du personnel, notamment lorsque les résultats rendus sont qualitatifs. Ainsi, chaque dossier personnel doit comprendre le diplôme, l'autorisation d'exercer si nécessaire, la fiche de fonction, la fiche de poste, ainsi que les documents prouvant l'habilitation initiale et le maintien des compétences dans le temps selon une procédure établissant la périodicité de ce maintien. Tout personnel nouvellement recruté doit avoir un plan de formation, sa formation doit être suivie et les preuves de l'habilitation initiale doivent être enregistrées. Cependant, la question se pose avec les personnels déjà présents au laboratoire, parfois depuis de longues années, et considérés comme compétents de par leur expérience. Il faut néanmoins tracer leur habilitation. Un document reprenant les années d'expérience, la participation aux EEQ et le nombre de non-conformités suffit pour l'habilitation initiale de ces personnels. Cependant, après cette première étape, le maintien des compétences est indispensable, même pour des opérateurs expérimentés. La fré-

quence est à définir en fonction du risque. Ainsi, une vérification ponctuelle de l'expertise, une fois par an ou tous les deux ans, peut être suffisante si le biologiste est consulté régulièrement, si le personnel participe aux EEQ et s'il n'y a pas de non-conformités récurrentes. Cette fréquence peut être diminuée s'il n'y a aucun moyen de détecter une dérive dans l'activité d'un individu. Le but de ces contrôles est de diminuer au maximum le risque de rendre un résultat erroné, d'où l'importance de l'analyse de risque. Des auto-évaluations doivent être également organisées pour que chacun puisse s'interroger sur sa pratique et, le cas échéant, envisager une formation adaptée. De plus, il faut également définir l'habilitation après une absence de longue durée (congé maternité, congé parental, longue maladie...). Le temps d'absence nécessitant une nouvelle habilitation doit être spécifié. Enfin, il ne faut pas oublier l'habilitation des biologistes. Lorsqu'il y a plusieurs biologistes, le chef de service peut habiliter ses collègues, mais se pose la question de comment habiliter initialement et comment assurer le maintien des compétences du chef de service ? Une procédure sur l'habilitation initiale et continue reprenant les points nécessaires à l'habilitation initiale et continue doit permettre de répondre à cette question.

Comme la formation en cytohématologie (12), l'expertise en auto-immunité est complexe et nécessite un savoir-faire qui s'acquiert sur plusieurs années. Le maintien continu des compétences s'appuie sur la participation de tous les intervenants aux EEQ, sur la comparaison de lectures microscopiques entre techniciens et biologistes, sur le partage d'informations des cas intéressants, sur la participation à différentes formations internes comme externes, à des congrès, séminaires ou colloques, mais surtout sur la connaissance de ses propres limites et sur le fait de faire intervenir le biologiste si nécessaire.

### Points clés : dossier personnel

- Diplôme
- Autorisation d'exercice si nécessaire
- Fiche de fonction
- Fiche de poste
- Plan de formation
- Habilitation initiale
- Maintien des compétences

### 2) Le matériel

Le matériel comprend l'équipement et les réactifs. Il faut s'assurer que les fournisseurs réalisent une qualification opérationnelle à l'installation, c'est-à-dire qu'ils vérifient que toutes les spécifications annoncées soient respectées (volume, temps, température) et qu'ils forment le personnel. Le laboratoire doit, quant à lui, enregistrer le matériel et les produits liés (logiciel, imprimante, douche). Il doit également établir un programme de maintenance et la procédure à suivre en cas de non-respect du délai, s'assurer que le rapport de maintenance est suffisamment détaillé (liste de vérification si nécessaire), daté

et signé, et que l'automate est apte au fonctionnement.

De même, chaque panne et intervention doivent être tracées, l'impact sur les résultats et le rendu de résultats doivent être notifiés ainsi que les modalités pour déterminer si l'appareil est apte au fonctionnement ou non. Une procédure dégradée doit préciser la conduite à tenir en cas d'impossibilité de rendre les résultats dans les délais prévus.

Tous les documents doivent être tracés et enregistrés.

### **Points clés : matériel**

Fournisseur :

- Qualification opérationnelle
- Formation du personnel

Laboratoire :

- Enregistrement du matériel
- Programme de maintenance
- Procédure en cas de non-respect des dates programmées
- Contrôle que le rapport de maintenance est complet (liste de vérification si nécessaire), daté et signé
- Traçabilité des pannes, impact sur le délai du rendu des résultats
- Procédure dégradée en cas de panne

### **3) Réactifs**

Les réactifs doivent être inspectés lors de leur réception, les versions des notices doivent être vérifiées et les performances contrôlées, notamment par la validation des CIQ.

### **4) Matières**

Il doit exister une documentation précisant les exigences pré-analytiques des échantillons. Le document (manuel ou guide de prélèvement) doit préciser l'identification des échantillons primaires, le matériel nécessaire et les contraintes imposées (délai et température de conservation des échantillons).

### **5) Milieu**

Une procédure des locaux et conditions environnementales doit indiquer les conditions de bruit, de lumière, de vibrations. En effet, travailler dans le bruit tout comme dans un local trop éclairé peut perturber l'observation microscopique de la fluorescence et les vibrations d'une centrifugeuse peuvent gêner le dépôt d'un produit biologique/réactif sur un support.

### **6) Métrologie**

De nombreuses méthodes biologiques diagnostiquant les maladies auto-immunes ne sont pas encore automatisées et, de ce fait, le contrôle des pipettes est essentiel en raison des faibles volumes liquidiens souvent prélevés (13). Les certificats d'étalonnage peuvent être réalisés en interne ou en externe, le prestataire externe devant alors être accrédité. Il faut définir les écarts acceptables et les bases de cette acceptation. De même, la fréquence des ca-

librations doit être réfléchie, revue et adaptée si nécessaire. Ainsi, une erreur de calibration d'une pipette n'aura pas la même conséquence sur le résultat d'une analyse en fonction de l'usage de celle-ci (réalisation de dilutions ou de lavages, par exemples). Le laboratoire doit déterminer si la pipette utilisée pour effectuer des dilutions doit être calibrée aussi fréquemment qu'une pipette assurant des lavages. De même, une erreur de calibration d'une pipette de 10 µl n'a pas le même impact qu'une erreur sur une pipette de 1 ml et la fréquence de vérification en dépendra. Un autre point à prendre en considération est la fréquence d'utilisation du matériel. S'il s'agit d'une pipette qui sert une fois par jour à reconstituer un CIQ ou qui est utilisée pour des séries d'analyses, la fréquence de vérification peut différer. Enfin, un point important est la détectabilité d'une erreur ou d'une dérive éventuelle de pipetage. Si la pipette permet la reconstitution d'un CIQ, l'anomalie du matériel peut être rapidement décelée. Mais si elle est employée pour une série d'analyses de détection, par IFI, de facteurs anti-nucléaires dans le sérum de sujets par exemple, les puits de la lame peuvent être « négatifs » sans que l'œil de l'opérateur soit frappé lors de l'examen microscopique. Il est vraiment important de faire une analyse de risque. Il n'y a pas de solution standard extrapolable d'un laboratoire à un autre. Enfin, il faut revoir à plus ou moins longue échéance (selon l'utilisation) si la fréquence des contrôles métrologiques décidée initialement est toujours justifiée ou non.

Les autres secteurs de la métrologie doivent être considérés de la même façon, à savoir selon l'analyse de risque. Ainsi, les températures des réfrigérateurs, des chambres froides, des congélateurs et des locaux doivent être définies et enregistrées. De même, l'analyse de risque doit prendre en compte l'utilité de vérifier les chronomètres et le cas échéant, il faut définir comment effectuer le contrôle d'exactitude.

### **Points clés : synthèse de l'analyse de risque**

- Établir la liste exhaustive des facteurs ayant potentiellement une influence sur les résultats
- Définir les différents risques à chaque étape
- Définir leur gravité, leur fréquence, leur détectabilité
- Définir la criticité en découlant
- Argumenter comment ils sont maîtrisés
- Synthèse de l'analyse de risque : détermination des risques résiduels et des moyens de détection
- Révision périodique
- Pour les facteurs dont l'influence n'est pas significative, justifier le fait d'en négliger la prise en compte

### **7) Informatique**

Les transferts informatiques entre l'automate et le SIL doivent être vérifiés (14). Il n'est pas indispensable que ces données soient dans le dossier de validation ; cependant, on doit pouvoir les retrouver dans le dossier matériel, par exemple.

## D) Validation/Vérification

Les objectifs analytiques doivent être préalablement définis, mais peu de référentiels existent ; le choix peut être difficile et doit s'appuyer sur la littérature. Il existe les critères comme ceux de Vassault, qui détermine les limites d'acceptabilité de certains paramètres essentiellement en biochimie et hormonologie, mais pas du tout en auto-immunité (15). À cette étape, les limites d'acceptabilité de la méthode doivent être mentionnées, en fonction de l'état de l'art et de la pertinence clinique.

Le Cofrac fournit des fiches pour la vérification ou la validation. Le laboratoire peut s'appuyer sur les fiches quantitatives (16) ou qualitatives (17) qui reprennent les différents points à connaître et/ou à vérifier. Selon que les analyses seront en portée de type A ou de type B (9), ces différents points seront à tester.

Les fiches de type quantitatif ne posent pas de problèmes particuliers. Les formules de calcul de la fidélité, de la justesse et l'estimation de l'incertitude sont clairement expliquées dans les guides Cofrac. Les contrôles de contamination, de stabilité ne sont pas difficiles à mettre en œuvre. Enfin, les comparaisons avec une autre méthode et l'analyse des discordances sont aisées dès lors qu'il existe une autre méthode similaire, ce qui, hélas, n'est pas toujours le cas en auto-immunité. En effet, on peut passer d'une technique ELISA, quantitative, à une technique d'immunofixation (*dot blot*), qualitative. Dans cette situation, l'analyse des discordances des interprétations est plus importante que les comparaisons de valeurs absolues.

Les fiches de type qualitatif sont *a priori* plus simples car moins d'items doivent être renseignés. Cependant, l'analyse de risque doit être très exhaustive pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

Si la vérification de performances sur site est impossible à effectuer, la vérification bibliographique critique est essentielle dans ce cas. Inversement, la vérification expérimentale sur site est plus limitée et s'appuie fortement sur l'étude des performances des EEQ, sur l'étude des risques ou encore sur la qualification des opérateurs.

Certains points sont à préciser :

- **La robustesse** est la résistance au changement des résultats produits par la méthode quand des modifications contrôlées ont lieu par rapport aux conditions expérimentales décrites dans la procédure (changement d'instrument, d'opérateur ou de lot de réactif, de concentration d'un réactif, du pH d'une solution, de la température d'une réaction, d'incubation, de position sur un support...).
- **La sensibilité diagnostique** est la probabilité qu'un résultat soit positif en présence de la substance dans la matrice. Elle peut être donnée par la littérature, évaluée par détermination du nombre de faux négatifs, par comparaison des résultats obtenus à ceux établis par une méthode de référence, par l'étude de méthodes

complémentaires (tests d'identification ou de confirmation, autres paramètres biologiques), par cohérence avec les données cliniques, par l'utilisation de sérums archivés (sérothèque), par l'étude des CIQ et des EEQ.

- **La spécificité analytique** est la capacité de la méthode à détecter ou quantifier spécifiquement le paramètre souhaité. Pour les méthodes quantitatives, elle se vérifie par la justesse, par l'étude des interférences, par les comparaisons de méthodes. Pour les méthodes pour lesquelles le résultat est exprimé de manière qualitative, elle peut être évaluée par le pourcentage de résultats faussement positifs, données par la bibliographie ou déterminée au laboratoire en comparant les résultats à ceux fournis par des méthodes de référence ou de confirmation, des tests complémentaires, aux données cliniques...
- **La comparaison** avec une méthode de référence nécessite de choisir suffisamment d'échantillons (patients, CIQ, EEQ) reprenant les différentes interprétations possibles, de les classer par interprétation en relevant des discordances et de les analyser (conservation des échantillons ? conditions expérimentales ? erreurs aléatoires ? erreurs systématiques de la nouvelle méthode ?...). Si la méthode de comparaison n'est pas une méthode validée comme référence, il faut analyser les résultats par rapport à ceux d'autres méthodes (sous-traitance pour expertise par une méthode de référence, par rapport à des tests complémentaires (identification, confirmation, autres paramètres associés), par rapport à la pertinence clinique des résultats...

On peut choisir de valider analyse par analyse ou par bloc d'analyses. Par exemple, la validation des facteurs anti-nucléaires est complexe. L'image observée lors de leur dépistage par IFI induit des analyses complémentaires pour confirmation ou identification. Ainsi, l'interprétation des facteurs anti-nucléaires doit se faire en fonction de l'aspect du noyau, du cytoplasme et des mitoses observées et des analyses complémentaires de recherche et dosage des anticorps anti-ADN, de l'identification et titrage des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) et anti-cytoplasme. Un dossier de recherche des anticorps anti-transglutaminases doit se faire en complément de celui de la recherche des anticorps anti-endomysium. De même, la recherche des anticorps anti-VGKC doit être complétée avec l'identification sur cellules transfectées des anticorps anti-Caspr et Lgi1. Enfin, il est plus simple de constituer un dossier « ANCA / MPO-PR3 » globalement plutôt qu'individuellement. En effet, chaque validation analytique sera différente, mais l'analyse de risque sera très semblable, et surtout, la concordance de méthodes est commune. Il est intéressant de corrélérer si l'image observée, soit en fixation éthanol, formol ou méthanol, est de type C-ANCA ou P-ANCA et de la rapporter à l'identification anti-MPO ou PR3 ou NANA.

Il convient d'insister sur le fait que la quantification des anticorps est entachée d'une imprécision importante : variabilité intra-série, inter-série, inter-lot. Il est important de tenir compte de cette variabilité pour interpréter des valeurs proches du seuil de positivité.

## E) Suivi du processus

Une fois le dossier validé, les analyses peuvent être mises en production en routine. Cependant, des éléments complémentaires sont nécessaires pour un suivi de processus. Il s'agit du calcul de l'incertitude de mesure, s'il est réalisable, ainsi que de la politique d'incertitude de mesure. Les éléments de validation continue sont l'exploitation des CIQ, les éléments de suivi du processus (dysfonctionnements et tendances), l'exploitation des EEQ et tous les autres éléments de preuve de stabilité de son processus (statistique de résultats, retour de prescripteurs...).

### 1) Les contrôles internes de qualité

Le Cofrac a publié un guide sur les contrôles de qualité en biologie médicale (18). Une procédure doit mentionner les modalités de passage des CIQ en y intégrant la notion de série et de fréquence. L'exploitation des résultats doit être tracée et en cas de résultats non-conformes, elle doit préciser la conduite à tenir. Dans la mesure du possible, pour les analyses quantitatives, le biais et l'incertitude de mesure doivent être calculés. Les contrôles proposés dans les trousse de dosage radio- ou immunoenzymologique d'auto-anticorps ne sont pas véritablement des CIQ. Dès lors, comment valider une série d'analyses et à quelle fréquence ? Est-il nécessaire d'analyser d'autres CIQ ? Cette question se pose également pour le dépistage des auto-anticorps par IFI. Doit-on tester un CIQ négatif et positif sur chaque lame ? À chaque série d'examen ? Seule l'analyse de risque doit permettre de répondre à cette question. Quel est le risque de n'avoir pas déposé le sérum ou le conjugué dans les puits de la lame, de se tromper d'une dilution ou de ne pas reconnaître l'aspect de la fluorescence ? La gestion des CIQ doit se faire en fonction de cette réflexion. L'observation microscopique est-elle effectuée par un ou deux opérateurs ? Au laboratoire, nous verrons le rendu de résultat en effectuant systématiquement une lecture microscopique des lames par un technicien et par un biologiste. L'utilisation d'un nouveau lot de réactifs ou de conjugué nécessite une validation par un CIQ. L'expérience nous permet également de reconnaître l'aspect de la fluorescence si le sérum ou le conjugué a été oublié (formation, maintien des compétences).

#### Points clés

- Modalités de passage des CIQ
- Fréquence ?
- Que faire si non-conformes ?
- Exploitation

#### a) Les « contrôles » fournisseurs

L'absence de CQ commerciaux avec des valeurs cibles et fourchettes validées sur différents systèmes analytiques pose problème. Les CIQ quantitatifs disponibles sont donc liés à une technique et proviennent du fournisseur de celle-ci. Ce sont le plus souvent les « contrôles de la trousse de réactif ». Ils sont insuffisants puisque dans la plupart des cas, ils changent avec le lot de réactifs : ils ne permet-

tent donc pas de détecter une dérive dans la quantification des résultats d'un lot à l'autre de réactifs. Il est donc indispensable de disposer de contrôles quantitatifs indépendants de la trousse commerciale. Il en existe peu et ils proviennent du fournisseur de la technique. Dans certains cas, il n'y a pas de CIQ ou les CIQ ne conviennent pas (absence de courbe d'étalonnage, matrice inadaptée...). Dans ces cas, le laboratoire doit cependant pouvoir s'assurer de la qualité de ses résultats.

#### b) Les CIQ « maison »

Le biologiste est donc contraint d'utiliser des contrôles « maison » dès lors qu'une procédure d'élaboration et de suivi existe. Il s'agit d'un contrôle fabriqué dans le laboratoire à partir d'échantillons de patients. Le CIQ « maison » doit être utilisé comme un CIQ commercial, avec une fiche technique s'y référant, précisant la date de sa fabrication et les échantillons ayant servi à le constituer, les résultats attendus déterminés pendant une période probatoire, la date limite de son utilisation, l'ensemble étant bien évidemment enregistré. Il faut disposer d'une quantité suffisante d'échantillons pour assurer à la fois la validation du contrôle (avec calcul de fourchette et de cible) et son utilisation sur une durée suffisamment longue. Il faut pouvoir assurer la qualité de la conservation du CIQ « maison » tout au long de son utilisation ainsi que la stabilité de sa valeur quantitative, ce qui est parfois difficile.

#### Points clés : CIQ « maison »

- Procédure de fabrication
- Température et durée de conservation
- Modalité d'utilisation
- Quantité suffisante

#### c) Suivi de tendance

Il faut s'assurer de la stabilité des résultats dans le temps quels que soient les réactifs utilisés : ainsi, les CIQ servent au suivi de tendances. Le même CIQ « maison » sera testé dans les différentes séries et permettra de déceler l'influence éventuelle des changements de réactifs. De même, lorsqu'un CIQ est disponible dans la trousse de réactif, nous testons le CIQ du lot qui se termine dans la série avec le nouveau lot, ce qui nous permet également de vérifier que les valeurs obtenues restent stables quel que soit le lot de réactifs.

### 2) Les contrôles externes de qualité

#### a) EEQ commerciaux

Les EEQ permettent aux laboratoires de vérifier l'exactitude des résultats fournis (valeurs cibles, limites acceptables). Pour les EEQ, l'absence de standardisation crée des limites à l'exploitation des comparaisons inter-laboratoires. Aucune comparaison inter-techniques n'est envisageable, puisque l'absence de standardisation et le plus souvent de techniques de référence rendent impossibles l'établissement d'une valeur « vraie ».

La valeur cible peut correspondre (19) :

- soit à la valeur obtenue par le plus grand nombre de participants,
- soit à la valeur obtenue avec la même méthode,
- soit à la valeur obtenue par des laboratoires de référence utilisant une méthode de référence, ou avec une méthode reconnue pour sa spécificité.

La seule comparaison possible est celle au sein de groupes de pairs utilisant la même technique, les mêmes réactifs restreignant l'information au fournisseur utilisé. Le choix d'un organisme d'EEQ doit être réfléchi et parmi les critères de sélection peuvent être la qualité des réponses, le nombre de participants,... Le fournisseur d'EEQ étant un fournisseur critique, il doit être évalué.

#### *b) Contrôles inter-laboratoires*

Toutes les analyses ne bénéficiant pas d'EEQ commerciaux, le biologiste est amené à s'organiser avec d'autres laboratoires afin de contrôler ses résultats d'analyses. Il faut définir les analyses et établir une fréquence de ces contrôles inter-laboratoires, tout comme les EEQ commerciaux en fonction de la fréquence des analyses dans la routine et du risque d'erreur de résultats. Ce choix appartient à chaque laboratoire. Au retour des résultats, il faut étudier les discordances éventuelles et s'il en existe, il faut les analyser de la même manière qu'un EEQ commercial.

#### ***Points clés : éléments de suivi de processus mis en place***

- Règles de suivi du paramètre (CIQ) : (dysfonctionnements et tendances)
- Exploitation des EEQ
- Suivi de l'incertitude de mesure et/ou de l'analyse de risque
- Éléments de dysfonctionnement (statistique de résultats,

retour de prescripteurs...)

- Analyse de tendances

### **III. - CONCLUSION**

L'auto-immunité est une discipline complexe en raison du nombre conséquent de méthodes et techniques de détection et d'identification des auto-anticorps disponibles, des différentes présentations antigéniques proposées par les firmes, de l'existence de nombreuses approches analytiques qui ne sont pas toujours automatisées (par exemple, l'immunofluorescence indirecte d'organes spécialisés) et qui nécessitent une grande expérience. Nous avons beaucoup appris lors des différents audits des six années passées, notamment que les auditeurs examinent les dossiers de validations mais aussi, comme d'autres secteurs de la biologie médicale, l'habilitation du personnel et la gestion du matériel qui peuvent influencer les résultats d'analyses. Il ne faut pas non plus négliger la métrologie, ni les conditions ambiantes, sources possibles d'écarts. La manière de travailler dans un laboratoire n'est pas transposable d'un laboratoire à l'autre, mais il faut s'interroger sur sa pratique, vérifier l'harmonisation du travail. Il faut surtout avoir l'esprit critique sur sa pratique, éviter la sur-qualité inutile, et savoir justifier ce que l'on fait lors des audits. De ces six années d'audit dans tous les secteurs du laboratoire, il ressort que l'accréditation est avant tout une réflexion sur l'utilité et la pertinence des actions qui sont menées (20).

Conflit d'intérêt : aucun.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Klein JP, Gorsy T. L'accréditation en hématocytologie : de la théorie à la pratique. *Rev Fr Lab* 2012 ; **441** : 75-89.
- (2) Fortenfant F, Taillefer MF. L'accréditation en auto-immunité. *Rev Fr Lab* 2010 ; **424bis** : 40-3.
- (3) Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale N°1 : Phase pré-analytique / Phase analytique. *Ann Biol Clin* 2010 ; **68** : Hors-série n°1.  
[www.jle.com/fr/revues/abc/sommaire.phtml?cle\\_parrution=3491](http://www.jle.com/fr/revues/abc/sommaire.phtml?cle_parrution=3491)
- (4) Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale N° 2 : Phase post-analytique / Biologie délocalisée. *Ann Biol Clin* 2012 ; **70** : Hors-série n°1.  
[www.jle.com/fr/revues/abc/sommaire.phtml?cle\\_parrution=3653](http://www.jle.com/fr/revues/abc/sommaire.phtml?cle_parrution=3653)
- (5) Daunizeau A. Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale N° 3 : Management de la qualité / Processus support. *Ann Biol Clin* 2013 ; **71** : Hors-série n°1.  
[www.jle.com/fr/revues/abc/sommaire.phtml?cle\\_parrution=3853](http://www.jle.com/fr/revues/abc/sommaire.phtml?cle_parrution=3853)
- (6) Klein JP, Gorsy T. Accréditation en bactériologie et en hématocytologie : de l'évaluation initiale à l'évaluation de surveillance. *Feuillets de Biologie* 2013 ; **311** : 43-58.
- (7) Cofrac. Guide technique d'accréditation en biologie médicale. SH GTA 01. Révision 00-Mai 2011.
- (8) NORME NF EN ISO 15189. Laboratoires d'analyses de biologie médicale. Exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR ; Décembre 2012.
- (9) Cofrac. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. Documentation SH GTA 04 Révision 01-2015.
- (10) Cofrac. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale SH GTA 14. Révision 00-2011.
- (11) Klein J-P, Hammad M, Garnier JM, Hidri N, Carod JF. Évaluation des points critiques en laboratoire de biologie médicale : l'exemple de la bactériologie clinique. *Feuillets de Biologie* 2013 ; **314** : 45-64.
- (12) Martin C, Thoinet S, Frebet E, Donnard M, Gachard N, Trimoreau F. Contraintes et opportunités pour l'accréditation de la Formule Sanguine au microscope. *Spectra Biologie* 2013 ; **202** : 27-41.
- (13) Le Vacon F. Qualification des matériels. *Transfus Clin Biol* 2005 ; **12** : 200-4.
- (14) Cofrac. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale SH GTA 02 Révision 00-2013.
- (15) Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin* 1999 ; **6** : 685-95.
- (16) Cofrac. SH FORM 43. Fiche type quantitatif – Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. Révision 00-2011.
- (17) Cofrac. SH FORM 44. Fiche type qualitatif – Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. Révision 00-2011.
- (18) Cofrac. Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale SH GTA 06 Révision 00-2012.
- (19) Vassault A. Conduite à tenir en cas de résultats d'EEQ non-conformes. *Feuillets de Biologie* 2013 ; **313** : 35-8.
- (20) Klein JP. L'accréditation : un questionnement pour une pratique efficiente. *Spectra Biologie* 2014 ; **210** : 45-50.