



**HAL**  
open science

# Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*

Flora Bochereau

► **To cite this version:**

Flora Bochereau. Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-02019209

**HAL Id: dumas-02019209**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02019209>**

Submitted on 14 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. de Pharmacie

Année universitaire 2017/2018



MÉMOIRE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu publiquement le 19 janvier 2018

Par Mme BOCHEREAU Flora, née le 30 mars 1988

Conformément aux dispositions du décret du 10 septembre 1990

Tient lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

**Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel  
multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et  
*Mycoplasma genitalium***

---

Membres du jury

Président : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU d'Amiens

Assesseurs : Madame le Professeur CASTELAIN Sandrine, CHU d'Amiens

Madame le Docteur PLASSART Claire, CH de Beauvais

Madame le Docteur SERAPHIN Hélène, CH de Beauvais

Madame le Docteur DECROIX Véronique, CHU d'Amiens





UNIVERSITÉ PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. de Pharmacie

Année universitaire 2017/2018



MÉMOIRE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu publiquement le 19 janvier 2018

Par Mme BOCHEREAU Flora, née le 30 mars 1988

Conformément aux dispositions du décret du 10 septembre 1990

Tient lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

**Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel  
multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et  
*Mycoplasma genitalium***

---

Membres du jury

Président : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU d'Amiens

Assesseurs : Madame le Professeur CASTELAIN Sandrine, CHU d'Amiens

Madame le Docteur PLASSART Claire, CH de Beauvais

Madame le Docteur SERAPHIN Hélène, CH de Beauvais

Madame le Docteur DECROIX Véronique, CHU d'Amiens

UNIVERSITÉ PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. de Pharmacie

Année universitaire 2017/2018

MÉMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie)

Nom : BOCHEREAU

Prénom : Flora

Titre du mémoire : Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*

Mots clés : vérification de méthode, norme ISO 15189, PCR temps réel, vérification continue

---

**Résumé :** En mars 2017, au laboratoire du centre hospitalier de Beauvais, un appareil de PCR en temps réel est installé. Ce travail décrit la vérification de méthode, en portée A de la trousse de PCR triplexe en temps réel, Urethritis basic®, FTD, pour la détection qualitative de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*. Pour répondre à la norme NF 15189, une analyse des risques ainsi que la vérification de certains critères de performance ont été réalisées sur site. La fidélité intermédiaire pour *N. gonorrhoeae* a été évaluée sur 2 échantillons donnant des résultats douteux au premier passage. Lors des passages suivants les résultats sont négatifs. La comparaison avec l'ancienne méthode en point final (GenoQuick®CT, Hain Lifescience) pour la recherche de *C. trachomatis* a été réalisée sur 46 échantillons. Quatre résultats sont discordants (tous positifs avec l'ancienne méthode et négatifs avec la nouvelle). L'exactitude est vérifiée grâce à deux EEQ pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* : les résultats sont conformes. Nos essais de contamination inter-échantillons en alternant échantillons positifs et négatifs ont permis de montrer l'absence de contamination. Enfin, nous avons mis en place une vérification continue à l'aide de représentations de Levey-Jennings construites à partir des « Cycles threshold » des contrôles. Ce travail nous a permis de conclure à l'aptitude de la méthode tout en confirmant l'intérêt de contrôler les échantillons trouvés douteux pour le gonocoque. Il propose également un outil de surveillance continue des performances.

---

Membres du jury

Président : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU d'Amiens

Assesseurs : Madame le Professeur CASTELAIN Sandrine, CHU d'Amiens

Madame le Docteur PLASSART Claire, CH de Beauvais

Madame le Docteur SERAPHIN Hélène, CH de Beauvais

Madame le Docteur DECROIX Véronique, CHU d'Amiens

UNIVERSITÉ PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. de Pharmacie

Année universitaire 2017/2018

MÉMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie)

Nom : BOCHEREAU

Prénom : Flora

Titre du mémoire : Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*

Mots clés : vérification de méthode, norme ISO 15189, PCR temps réel, vérification continue

---

**Résumé :** In March 2017, at the Beauvais hospital laboratory, a real time PCR system has been acquired. This work describes the method verification of a real time PCR kit, Urethritis basic®, FTD, in range A, for the qualitative detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium*. According to the ISO 15189 standard, a risk analysis and a verification of some performance criteria were performed on site. Intermediate precision for *N. gonorrhoeae* was evaluated on two samples giving equivocal results. Following runs gave negative results. Comparison between the new and the previous end-point PCR method (GenoQuick®CT, Hain Lifescience) for the detection of *C. trachomatis* was performed on 46 samples. Four samples showed discordant results (all positive with the previous method and negative with the new one). Accuracy was assessed by two EQA (External Quality Assessment) for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* and gave expected results. Our tests of carry-over contamination, by alternating positive and negative samples, did not identify any contamination. Finally, we implemented continuous verification by Levey-Jennings charts established using threshold cycles of controls. This work let to conclude on the ability of the method while confirming the interest of controlling equivocal *N. gonorrhoeae* results. In addition, it provides a tool to continuously monitor the performance.

---

Membres du jury

Président : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU d'Amiens

Assesseurs : Madame le Professeur CASTELAIN Sandrine, CHU d'Amiens

Madame le Docteur PLASSART Claire, CH de Beauvais

Madame le Docteur SERAPHIN Hélène, CH de Beauvais

Madame le Docteur DECROIX Véronique, CHU d'Amiens

## **Remerciements**

**A mon président de jury :**

**Professeur Saïd KAMEL**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

*Laboratoire de Biochimie*

*Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens*

Sans hésitation, vous avez accepté la présidence de mon jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**A mes assesseurs :**

**Professeur Sandrine CASTELAIN**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

*Chef du service de Bactériologie*

*Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens*

Pour me faire l'honneur de juger ce travail, mais aussi pour m'avoir accueillie dans votre service avec enthousiasme, soyez assurée de toute ma gratitude.

**Docteur Hélène SERAPHIN**

*Praticien hospitalier*

*Chef du laboratoire de Biologie Médicale*

*Centre Hospitalier de Beauvais*

Je te remercie, avant toute chose, de m'avoir si gentiment accueillie dans ton service, de m'avoir permis de découvrir la biologie polyvalente et de m'avoir fait confiance. J'ai été très heureuse que tu acceptes de faire partie de mon jury de thèse, sois assurée de toute ma reconnaissance.

**Docteur Véronique DECROIX**

*Praticien Hospitalier*

*Laboratoire de Bactériologie*

*Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens*

Merci pour avoir accepté de juger ce travail, merci également pour m'avoir accompagnée et fait profiter de tes connaissances au quotidien pendant mes stages. Sois assurée de ma plus sincère considération.

**A ma directrice de thèse :**

**Docteur Claire PLASSART**

*Praticien Hospitalier*

*Laboratoire de Biologie Médicale*

*Centre Hospitalier de Beauvais*

Je te remercie pour m'avoir si bien guidée dans ce travail que tu m'as confié. Merci pour ton investissement, pour avoir passé des heures à me conseiller et à corriger mon manuscrit avec toujours beaucoup de précision. Ce fut réellement agréable de réaliser ce travail avec toi, je t'adresse pour cela mon respect le plus sincère.

**A Charlotte, Régine, Nathalie, Florence, Virginie et Olivier et plus largement à toutes les personnes du laboratoire de Beauvais :**

Merci pour votre gentillesse, votre humour, votre très grande disponibilité et bien sur toute votre aide.

A Charlotte, merci pour m'avoir très gentiment accueillie dans ton bureau, que de bons moments passés ensemble !

### **A mes amis du lycée :**

Charlène, Mathias, Marion, Maud, Jeannie, Sophie, Anne-Hélène, Clarisse, Anaïs. Merci pour les soirées, les sorties Tartifume, les fous rires en classe et à la cafet ! J'ai toujours beaucoup de plaisir à vous retrouver après toutes ces années.

### **A mes amies de la fac :**

Alba, Camille, Elia, Fanny, Marine et Sandrine. J'ai été entourée des meilleures sur les bancs de la fac, comme en soirée, vous avez rendu ces années inoubliables et folles. Pourvu que nous puissions toujours créer les occasions de nous retrouver. Merci pour tout...

### **A mes co-internes :**

Merci pour la solidarité, l'amitié, les fous rires, les potins, les bons petits plats en garde, je suis très heureuse de vous avoir rencontré et j'espère que nous garderons des liens d'amitié sincère.

### **A ma famille :**

Mes parents, mon frère, ma sœur, ma belle-sœur, mon neveu, merci pour votre immense soutien, depuis toujours, pour m'avoir fait confiance pour tous mes projets et m'avoir sans arrêt encouragée pendant mes études et dans ma vie en général.

Christophe, pour me faire confiance, pour m'avoir suivie les yeux fermés jusqu'en Picardie ...  
Je t'aime.

## **Liste des abréviations**

CeGIDD : Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic

CEI : Commission Electrotechnique Internationale

CHB : Centre Hospitalier de Beauvais

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CSP : Code de la Santé Publique

Ct : Cycle threshold

CTCB : Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie

CV : Coefficient de Variation

EEQ : Evaluation Externe de Qualité

GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale

HAS : Haute Autorité de Santé

HSV : Herpes Simplex Virus

ISO : International Organization for Standardization (= Organisation Internationale de Normalisation)

IST : Infections Sexuellement Transmissibles

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LGV : LymphoGranulomatose Vénérienne

NAAT : Nucleic Acid Amplification Test (= Test d'Amplification d'Acides Nucléiques)

NABM : Nomenclature des Actes de Biologie Médicale

PCR : Polymerase Chain Reaction (= Réaction en Chaîne par Polymérase)

PID : Pelvic Inflammatory Disease (= Algie Inflammatoire Pelvienne)

QCMD : Quality Control for Molecular Diagnostics (= Contrôle de Qualité pour le Diagnostic)

par Biologie Moléculaire)

SD : Standard Deviation (= Déviation Standard)

SMQ : Système de Management de la Qualité

VCAT : Vancomycine, Colistine, Amphotéricine B, Triméthoprime

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## **Liste des figures**

Figure 1 : Distribution des cas de Chlamydirose par tranche d'âge et selon le sexe, d'après le réseau Rénachla en 2013 .....	18
Figure 2 : Nombre de diagnostics positifs par année, selon le réseau Rénago .....	21
Figure 3 : Bandelette de révélation GenoQuick®CT .....	28
Figure 4 : Principe de la révélation en temps réel utilisant les sondes TaqMan® (32).....	29
Figure 5 : Courbe de fluorescence (33) .....	30
Figure 6 : Diagramme cause-effet d'Ishikawa .....	33
Figure 7 : Roue de Deming .....	34
Figure 8 : Cycle de l'accréditation .....	37
Figure 9 : Critères de performance à évaluer (SH-GTA-04) (35).....	40
Figure 10 : Exemple de courbe douteuse pour <i>N. gonorrhoeae</i> .....	48
Figure 11 : Plan de plaque pour l'essai de contamination avec les résultats attendus.....	50
Figure 12 : Thermocycleur AB7500 (Applied Biosystems®) .....	53
Figure 13 : Représentation de Levey-Jennings pour <i>C. trachomatis</i> (contrôle positif).....	59
Figure 14 : Représentation de Levey-Jennings pour <i>N. gonorrhoeae</i> (contrôle positif) .....	60
Figure 15 : Représentation de Levey-Jennings pour <i>M. genitalium</i> (contrôle positif) .....	61
Figure 16 : Représentation de Levey-Jennings pour le contrôle interne (dans le contrôle négatif).....	62
Figure 17 : Arbre décisionnel en cas de résultat douteux pour le gonocoque.....	65

## **Liste des tableaux**

Tableau 1: Règles de Westgard (40) .....	43
Tableau 2 : Échantillons douteux pour le gonocoque.....	49
Tableau 3 : Étude de la stabilité des échantillons pour <i>C. trachomatis</i> .....	54
Tableau 4 : Étude de la stabilité des échantillons pour <i>N. gonorrhoeae</i> .....	54
Tableau 5 : Étude de la stabilité des échantillons pour <i>M. genitalium</i> .....	54
Tableau 6 : Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire pour <i>N. gonorrhoeae</i> (échantillon A).....	55
Tableau 7 : Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire pour <i>N. gonorrhoeae</i> (échantillon B).....	55
Tableau 8 : Résultats de 2 EEQ du CTCB.....	56
Tableau 9 : Résultats de la comparaison de méthodes pour <i>C. trachomatis</i> .....	57
Tableau 10 : Résultats des essais de contamination .....	58
Tableau 11 : Principales causes de dérive en fonction des contrôles concernés .....	68

## Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>16</b>
A. Les agents pathogènes : <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> et <i>M. genitalium</i> .....	17
1. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	17
a) Épidémiologie .....	17
b) Physiopathologie de l'infection à <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	18
c) Diagnostic et traitement .....	19
2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	21
a) Épidémiologie .....	21
b) Physiopathologie de l'infection à <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	22
c) Diagnostic et traitement .....	22
3. <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	24
a) Épidémiologie .....	24
b) Physiopathologie de l'infection à <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	24
c) Diagnostic et traitement .....	24
B. La PCR (Polymérase Chain Reaction) .....	26
1. Historique - principe général .....	26
2. Description des méthodes de PCR utilisées à Beauvais .....	27
a) Ancienne méthode : PCR avec révélation en point final (GenoQuick®CT, Hain Lifescience) .....	27
b) Nouvelle méthode : PCR multiplexe avec révélation en temps réel (Fast-Track Diagnostics).....	28
C. La qualité.....	32
1. Histoire de la qualité .....	32
2. Le management de la qualité .....	33
3. Contexte actuel de la qualité en biologie médicale .....	34
4. La norme NF EN ISO 15189 .....	35
5. Le COFRAC .....	36
6. Cycle de l'accréditation .....	36
7. Portées d'accréditation.....	37
8. Validation/vérification de méthode ..13.....	38

a) La fidélité intermédiaire.....	40
b) L'exactitude .....	41
c) La sensibilité et la spécificité analytique .....	41
d) La comparaison de méthodes.....	41
e) Essais de contamination .....	41
9. Validation / vérification continue.....	42
<b>Objectifs.....</b>	<b>44</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>45</b>
A. Dossier de vérification de méthode .....	45
1. Description du processus .....	45
2. Analyse de risques .....	46
3. Étude de la stabilité des échantillons .....	47
4. Critères de performance de la méthode .....	47
a) Bibliographie.....	47
b) Fidélité intermédiaire pour <i>N. gonorrhoeae</i> .....	47
c) Exactitude .....	49
d) Sensibilité et spécificité .....	49
e) Comparaison de méthodes pour <i>C. trachomatis</i> .....	50
f) Essais de contamination .....	50
g) Intervalle de référence.....	51
B. Vérification continue.....	51
C. Méthodes de PCR utilisées à Beauvais .....	51
1. Les échantillons utilisés.....	51
2. L'extraction des acides nucléiques.....	52
3. L'amplification .....	52
a) Ancienne méthode : GenoQuick®CT, Hain Lifescience.....	52
b) Nouvelle méthode : Urethritis basic®, FTD .....	52
<b>Résultats .....</b>	<b>54</b>
A. Dossier de vérification de méthode .....	54
1. Analyse de risques .....	54
2. Étude de la stabilité des échantillons .....	54
3. Critères de performance de la méthode .....	55
a) Fidélité intermédiaire pour <i>N. gonorrhoeae</i> .....	55

b) Exactitude .....	56
c) Sensibilité et spécificité .....	56
d) Comparaison de méthodes pour <i>C. trachomatis</i> .....	57
e) Essais de contamination .....	58
B. Vérification continue .....	59
1. Représentation de Levey-Jennings pour <i>C. trachomatis</i> (contrôle positif) .....	59
2. Représentation de Levey-Jennings pour <i>N. gonorrhoeae</i> (contrôle positif).....	60
3. Représentation de Levey-Jennings pour <i>M. genitalium</i> (contrôle positif) .....	61
4. Représentation de Levey-Jennings pour le contrôle interne (dans le contrôle négatif)	62
<b>Discussion .....</b>	<b>63</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>69</b>
<b>Annexe : Dossier de vérification de méthode (SH-FORM-43).....</b>	<b>70</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>90</b>

## **Introduction**

Les infections sexuellement transmissibles (IST) sont provoquées par différents agents infectieux viraux (VIH, HSV...), bactériens (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum*...), ou parasitaires (*Trichomonas vaginalis*). Les IST bactériennes non syphilitiques sont un enjeu majeur de santé publique en raison de leur prévalence élevée, de leur contagiosité, de leur caractère souvent asymptomatique et de leurs complications éventuellement graves. En effet, au-delà des symptômes qui peuvent se manifester en phase aiguë, ces infections peuvent se compliquer, devenir invasives, chroniques, avoir des localisations secondaires diverses, certaines peuvent entraîner une stérilité, des infections néonatales... (1).

Ces infections nécessitent donc des méthodes de dépistage à la fois performantes sur le plan analytique, compatibles avec des cadences soutenues pour répondre aux besoins des centres de dépistage, et permettant la détection des co-infections qui sont fréquentes.

Les méthodes de dépistage et de diagnostic de ces infections ont progressé avec notamment les techniques de diagnostic direct comme les NAAT (Nucleic Acid Amplification Tests). En France, ces méthodes font désormais partie intégrante des recommandations de la Haute Autorité de Santé (2).

Depuis l'ordonnance du 13 janvier 2010 les laboratoires de biologie médicale doivent entrer dans une démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 (3). Dans ce cadre, la validation ou la vérification des méthodes utilisées pour la réalisation de chaque analyse est indispensable et permet de prouver la fiabilité des résultats rendus par le laboratoire.

## **A. Les agents pathogènes : *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium***

### **1. *Chlamydia trachomatis***

#### **a) Épidémiologie**

*Chlamydia trachomatis* est la première cause bactérienne d'infection sexuellement transmissible (IST) en Europe. Le nombre de cas rapportés d'infections à *C. trachomatis* augmente constamment en Europe depuis 2004 (4). Ceci peut être en partie expliqué par une meilleure politique de dépistage (il y a plus de dépistages systématiques avec la mise en évidence de porteurs asymptomatiques) et par l'utilisation d'outils de diagnostic de plus en plus performants. Une grande étude épidémiologique a été menée au niveau national en France en 2006 (4). L'enquête NatChla a permis d'évaluer la prévalence de l'infection à *Chlamydia trachomatis* dans la population générale âgée de 18 à 44 ans. En 2006, la prévalence en France était donc de 1.4% chez les hommes et de 1.6% chez les femmes. En 2013, la prévalence de l'infection à *C. trachomatis* en Europe était de 182 cas rapportés pour 100000 habitants (4). Cette infection touche plus souvent les femmes (207 cas rapportés / 100000 femmes) que les hommes (153 cas rapportés / 100000 hommes). La prévalence la plus forte étant observée chez les femmes âgées de 20 à 24 ans avec 1717 cas rapportés pour 100000 habitants (4). En France, la surveillance épidémiologique des infections à *C. trachomatis* est réalisée par un réseau de laboratoires de microbiologie volontaires : Rénachla et un réseau de cliniciens exerçant quasi exclusivement dans des structures spécialisées telles que les CeGIDD : le résIST. D'après le réseau Rénachla, le nombre d'infections uro-génitales à *C. trachomatis* a augmenté de 10% entre 2013 et 2015. En 2015 la proportion de patients asymptomatiques était de 45% chez les femmes et 46% chez les hommes. Cette proportion a diminué par rapport à 2014 ce qui suppose une diminution du nombre de dépistages systématiques (5).

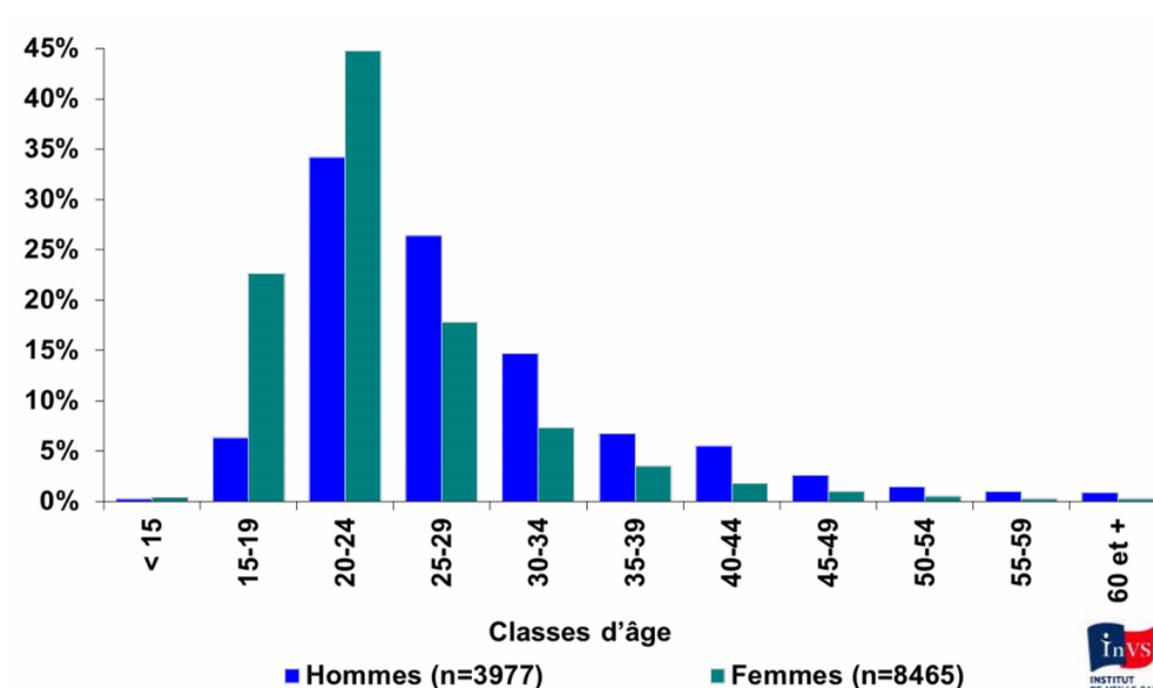


Figure 1 : Distribution des cas de Chlamydie par tranche d'âge et selon le sexe, d'après le réseau Rénachla en 2013

### b) Physiopathologie de l'infection à *Chlamydia trachomatis*

*C. trachomatis* est un pathogène obligatoire strictement humain. Il ne fait jamais partie de la flore commensale. Cette espèce est composée de 19 sérovars, chacun associé à différentes manifestations cliniques. Les sérovars A à C sont responsables de trachomes, les sérovars D à K sont responsables d'IST, enfin les sérovars L1, L2 et L3 sont responsables de lymphogranulomatoses vénériennes (LGV) (6).

Les infections génitales à *C. trachomatis* sont asymptomatiques dans 50% des cas pour les hommes et dans 70% des cas pour les femmes (6). Chez l'homme, l'infection peut se manifester par une urétrite et se compliquer par une épididymite (6). Chez la femme, l'infection peut provoquer une cervicite et se compliquer par une endométrite et/ou une salpingite (6,7). L'infection chronique à *C. trachomatis* chez la femme peut conduire à un syndrome inflammatoire pelvien et augmente le risque d'hypofertilité, de grossesses ectopiques et de douleurs pelviennes chroniques (7).

Le cycle de multiplication de *C. trachomatis* est important dans la physiopathologie de l'infection à cette bactérie. Il peut se décomposer en trois parties correspondant aux trois stades du cycle évolutif de la bactérie. Le corps élémentaire est une forme extracellulaire,

infectieuse, qui ne se multiplie pas et qui est responsable de la contamination des cellules alentour ou de la transmission à un hôte. Le corps réticulé, intracellulaire, n'est pas une forme infectieuse mais est capable de se multiplier au sein d'une cellule. Enfin le corps aberrant, serait responsable de la persistance de l'infection en entretenant une réaction inflammatoire. D'une part, cette inflammation est généralement peu importante et l'infection est alors asymptomatique. D'autre part, en intracellulaire, *C. trachomatis* va émettre des signaux anti-apoptotiques à la cellule et ainsi permettre à l'infection de devenir chronique (8–10).

### ***c) Diagnostic et traitement***

*Chlamydia trachomatis* est une bactérie à multiplication intracellulaire obligatoire. Ceci explique les difficultés pour la cultiver et donc l'intérêt des techniques de biologie moléculaire pour la détecter. Son cycle de multiplication entraîne des conséquences sur le prélèvement. En effet celui-ci doit contenir des cellules : écouvillon d'endocol, vaginal, urétral, premier jet d'urine... (10) De la qualité du prélèvement dépend la sensibilité des techniques de diagnostic.

Différentes méthodes de diagnostic direct de *C. trachomatis* existent : la culture qui est longue et très difficile, n'est pas réalisable en routine.

La biologie moléculaire est aujourd'hui la technique de référence pour le diagnostic des infections à *C. trachomatis* (11,12). Il est démontré depuis longtemps que la sensibilité de la PCR est très largement supérieure à celle de la culture ainsi qu'à celle de l'immunofluorescence directe (13,14). De plus la biologie moléculaire est suffisamment sensible pour être réalisée sur de nombreux types de prélèvements et en particulier sur des urines (premier jet) (14) ce qui est non invasif contrairement, par exemple, à un prélèvement urétral, douloureux. Il est également possible pour les femmes de réaliser un auto-prélèvement vaginal. Un prélèvement non invasif, acceptable et simple à réaliser permet de dépister un plus large éventail de la population et en particulier plus de porteurs asymptomatiques. La Nomenclature des Actes de Biologie Médicale a été modifiée en 2011 et n'autorise le remboursement du diagnostic direct de l'infection à *C. trachomatis* que par biologie moléculaire.

Compte tenu de la multiplication intracellulaire de *C. trachomatis*, le traitement doit être composé d'antibiotiques ayant une bonne diffusion intracellulaire. Il est recommandé de traiter par doxycycline en voie orale à la dose de 100mg deux fois par jour pendant 7 jours ou par azithromycine en dose unique de 1g en voie orale (15). Le dépistage et le traitement du partenaire sont indispensables.

## 2. *Neisseria gonorrhoeae*

### a) Épidémiologie

En France, deux réseaux surveillent les gonococcies au niveau national : résIST, depuis 2004, et Rénago (réseau de laboratoires de microbiologie volontaires), depuis 1986. D'après ces réseaux, le nombre de cas de gonococcies est en recrudescence depuis 1998 (16). L'incidence en France en 2012 dans la population âgée de 15 à 59 ans était de 39/100000 habitants (17). L'augmentation du nombre de dépistages et de diagnostics positifs, en particulier depuis 2008, est en partie expliquée par le fait que la culture est aujourd'hui de plus en plus souvent accompagnée voire remplacée par une méthode plus sensible : la biologie moléculaire. Entre 2011 et 2012, la proportion de souches résistantes au céfixime est passée de 0.7% à 3.0% (18). La baisse de la sensibilité des souches aux céphalosporines augmente avec l'âge des patients et est plus fréquente pour les souches pharyngées (18).

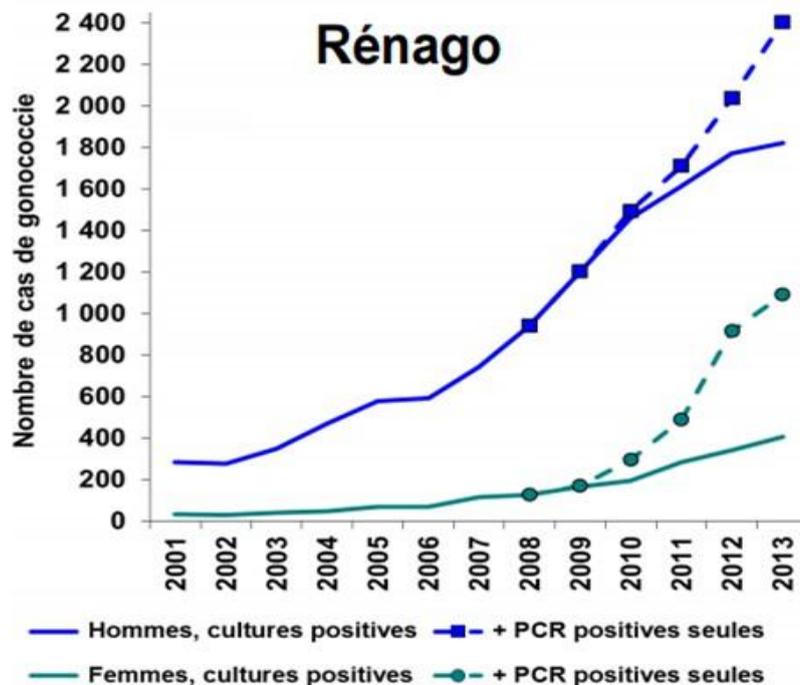


Figure 2 : Nombre de diagnostics positifs par année, selon le réseau Rénago

## ***b) Physiopathologie de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae****

*Neisseria gonorrhoeae* est une bactérie aérobie stricte qui se présente sous la forme de cocci à Gram négatif, immobiles, en diplocoques. Contrairement aux autres espèces du genre *Neisseria* qui sont des espèces commensales, *N. gonorrhoeae* est un pathogène obligatoire responsable d'IST (gonococcie ou blennorragie). L'infection à gonocoque est le plus souvent localisée au niveau uro-génital. Chez l'homme, l'infection est en général symptomatique et elle se traduit par une urétrite aiguë. Elle peut se compliquer d'une prostatite ou d'une orchio-épididymite. Chez la femme l'infection est communément asymptomatique ou bien donne des symptômes non spécifiques (le plus souvent elle se manifeste par une cervicite). L'absence de symptôme entraîne souvent un retard diagnostique et l'infection risque de devenir chronique, voire de se compliquer d'une algie inflammatoire pelvienne (PID), d'une salpingite, avec une augmentation du risque d'infertilité tubaire ou du risque de grossesse extra-utérine. En dehors des formes uro-génitales, il existe des localisations pharyngées ou rectales, qui sont le plus souvent un portage asymptomatique. Il y a également des formes conjonctivales, notamment chez le nouveau né. Enfin il existe aussi des formes articulaires et même, rarement, des infections disséminées.

## ***c) Diagnostic et traitement***

La méthode de diagnostic de référence est la culture. Il s'agit d'une bactérie très fragile, il faut doncensemencer le prélèvement le plus rapidement possible, sur gélose type sang cuit ou sur un milieu sélectif type VCAT (Vancomycine, Colistine, Amphotéricine B, Triméthoprime). L'incubation doit durer 24 à 48 heures à 35-37°C sous atmosphère enrichie avec 5% de CO<sub>2</sub>. Aujourd'hui, la biologie moléculaire, avec la PCR, permet d'avoir une meilleure sensibilité tout en conservant une excellente spécificité par rapport à la culture (19). La culture conserve cependant un intérêt car elle permet la réalisation d'un antibiogramme. Elle doit donc toujours être réalisée en parallèle de la biologie moléculaire pour le diagnostic chez le patient symptomatique. L'antibiogramme permet de suivre l'évolution des CMI notamment aux céphalosporines de troisième génération : le céfixime et la ceftriaxone.

Selon l'évaluation de la HAS de 2015, dans un contexte de diagnostic chez un patient symptomatique, la culture est la méthode de référence. Elle peut être accompagnée de la biologie moléculaire pour augmenter la sensibilité. Dans le cadre d'un dépistage chez un patient asymptomatique, la biologie moléculaire seule est préconisée. En cas de positivité du dépistage, la culture doit être réalisée afin de permettre la réalisation d'un antibiogramme (20).

Le traitement de première intention est une injection unique de 500 mg de ceftriaxone en intramusculaire ou en intraveineuse. Compte-tenu du nombre non négligeable de co-infections *C. trachomatis* / *N. gonorrhoeae*, et selon les recommandations de la société française de dermatologie de février 2016, il est conseillé d'ajouter en systématique un traitement contre *C. trachomatis* (21). On utilisera alors, en première intention, l'azythromycine 1g en monodose (22).

En France, en 2015, 10% des patients diagnostiqués pour une gonococcie étaient co-infectés par le VIH (5). Cela suggère l'importance de prescrire des sérologies, VIH en particulier, mais également VHB, VHC et Syphilis au moment de la découverte d'une infection à *N. gonorrhoeae*.

### **3. *Mycoplasma genitalium***

#### **a) *Épidémiologie***

Une étude française réalisée entre septembre 2014 et janvier 2015 sur 16 centres hospitalo-universitaires a montré une prévalence de l'infection à *Mycoplasma genitalium* de 3.4% (23). La prévalence est significativement supérieure chez les patients positifs à *C. trachomatis* ou à *N. gonorrhoeae* par rapport aux patients mono-infectés (23).

#### **b) *Physiopathologie de l'infection à Mycoplasma genitalium***

Les mycoplasmes sont des bactéries qui ne possèdent pas de paroi et ne sont pas colorables par le Gram. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme. *M. pneumoniae* est responsable d'infections respiratoires. *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *U. parvum* et *M. genitalium* sont responsables d'infections uro-génitales.

L'infection à *M. genitalium* est sexuellement transmissible (24). C'est un pathogène obligatoire. Chez la femme, cette bactérie est responsable de cervicites, de maladies inflammatoires pelviennes, augmente le risque d'infertilité, d'accouchements prématurés et de fausses couches spontanées (25). Chez l'homme *M. genitalium* semble responsable d'urétrites aiguës et chroniques (26,27), de balanites, de prostatites chroniques et d'épididymites aiguës (27).

#### **c) *Diagnostic et traitement***

La culture de *M. genitalium* est difficile et n'est pas réalisable en routine car c'est une bactérie fastidieuse à croissance lente. Les NAAT sont aujourd'hui les méthodes de référence pour diagnostiquer l'infection à *M. genitalium*.

La sensibilité aux antibiotiques de *M. genitalium* peut être évaluée par des techniques de PCR en temps réel avec une étape de culture cellulaire mais ceci n'est pas réalisable en routine. *M. genitalium* est une bactérie intracellulaire qui ne possède pas de paroi. Par conséquent les antibiotiques agissant sur la paroi ainsi que ceux qui ont une mauvaise diffusion intracellulaire seront inactifs. La doxycycline et l'azithromycine sont les traitements de référence. Cependant il y a de nombreux échecs thérapeutiques avec la doxycycline (28). Les fluoroquinolones peuvent également être efficaces en seconde ou troisième ligne, en particulier la moxifloxacin (29).

## **B. La PCR**

### **1. Historique - principe général**

La PCR est une technique de biologie moléculaire décrite par Kary Mullis en 1985. Il a reçu pour cela le prix Nobel de chimie en 1993.

C'est une méthode très sensible et spécifique mais qui comporte néanmoins des contraintes. Elle nécessite des locaux adaptés et entretenus de façon appropriée pour limiter le risque de contamination. Le personnel doit être spécifiquement formé pour la réalisation de cette méthode. La PCR nécessite également un suivi métrologique des congélateurs (pour la conservation des réactifs et des contrôles) et des pipettes dédiées (les volumes manipulés sont très petits, de l'ordre du microlitre).

Le principe de la PCR est basé sur une réaction d'amplification d'ADN à l'aide d'amorces spécifiques d'un gène que l'on souhaite mettre en évidence et/ou amplifier. C'est un processus composé de différentes étapes.

L'ADN se trouvant à l'intérieur du noyau, lui-même à l'intérieur de la cellule, il faut commencer par une étape d'extraction des acides nucléiques. Pour cela on procède à la lyse chimique des membranes, plasmiques et nucléaires, et des protéines. On récupère à la fin de cette étape un extrait d'ADN.

Il faut ensuite préparer le milieu réactionnel (le mix) qui va permettre l'amplification. Il s'agit de mélanger un couple d'amorces spécifiques du gène à amplifier, des désoxyribonucléotides et une ADN-polymérase. L'extrait d'ADN à tester est ajouté au mix.

L'étape suivante est l'amplification en elle-même. Elle se décompose en 3 séquences :

- La dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage à 95°C environ.
- L'hybridation : le couple d'amorce vient s'hybrider sur les brins d'ADN dénaturés au niveau des séquences qui lui sont complémentaires et qui entourent le gène à amplifier. Cette étape se réalise à environ 52°C.

- L'élongation : l'ADN polymérase, qui fonctionne à 72°C, va permettre l'élongation des brins d'ADN grâce aux désoxyribonucléotides qui lui servent de substrat.

L'étape finale de révélation permet de mettre en évidence les produits d'amplification (les amplicons). Il existe deux grands moyens de révéler les produits d'amplification :

- La révélation en point final
- La révélation en temps réel

## **2. Description des méthodes de PCR utilisées à Beauvais**

### ***a) Ancienne méthode : PCR avec révélation en point final (GenoQuick®CT, Hain Lifescience)***

L'ancienne méthode est une technique de PCR conventionnelle avec une révélation en point final permettant la détection de *Chlamydia trachomatis* uniquement. Notre kit permet l'amplification de 2 séquences hautement conservées du gène MOMP se trouvant sur le plasmide cryptique de *C. trachomatis*.

Après l'étape d'amplification, la révélation se fait sur bandelette grâce à la technologie GenoQuick®.

Les produits d'amplification, ou amplicons, sont thermiquement dénaturés et hybridés à une sonde spécifique contenant un site de liaison à l'or. La bandelette doit être placée dans le mélange amplicon-sonde et tampon de migration (running buffer). L'hybride amplicon-sonde se lie à l'or colloïdal qui se trouve tout en bas de la bandelette et le mélange migre par capillarité jusqu'au site de liaison spécifique des amplicons. Une réaction colorée se produit et des lignes apparaissent au niveau des zones de lecture. La lecture se fait après 10 minutes de migration à température ambiante.

L'interprétation du résultat sur la bandelette se fait grâce à trois zones (Figure 3). Dans la zone CC (Conjugate Control) une ligne doit apparaître. C'est le témoin que la révélation a bien fonctionné. La zone AC (Amplification Control) témoigne du succès de l'amplification

(contrôle interne), une ligne doit apparaître dans cette zone pour que le test soit valide. Enfin, la zone CT (*C. trachomatis*) est la zone test. L'apparition d'une ligne à cet endroit signifie que le test est positif. L'intensité de la coloration ne présage pas de la quantité d'ADN de *C. trachomatis* présent dans l'échantillon de départ.

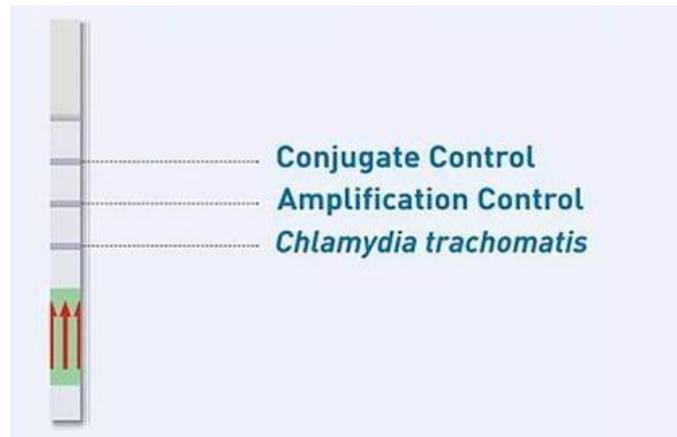


Figure 3 : Bandelette de révélation GenoQuick®CT

**b) Nouvelle méthode : PCR multiplexe avec révélation en temps réel (Fast-Track Diagnostics)**

La méthode mise en place au laboratoire de Beauvais est une trousse de PCR triplexe en temps réel de chez Fast-Track Diagnostics pour la détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*.

*La technologie TaqMan®*

La révélation en temps réel nécessite la présence dans le milieu réactionnel de sondes nucléotidiques, complémentaires d'une séquence du gène d'intérêt à amplifier, qui portent un fluorophore (30). Notre méthode utilise des sondes TaqMan®.

La technologie TaqMan® utilise les propriétés exonucléasiques 5' – 3' de la Taq polymérase (31). Une sonde, composée de nucléotides, complémentaire à une partie du gène à

amplifier, est ajoutée au milieu réactionnel avant l'amplification. Une molécule possédant une fluorescence intrinsèque est fixée à son extrémité 5' et un quencher, absorbant la fluorescence, est fixé à l'extrémité 3' (Figure 4). Tant que la sonde est intacte, le quencher absorbe la fluorescence émise par le fluorophore : il n'y a donc pas de fluorescence émise dans le milieu réactionnel.

Au cours de l'élongation, la Taq polymérase, qui possède une activité exonucléasique 5' – 3', va hydrolyser la sonde et ainsi séparer le fluorophore du quencher : la fluorescence est alors émise.

A chaque nouveau cycle, la Taq polymérase hydrolyse les sondes TaqMan®, la fluorescence s'additionne et augmente de cycle en cycle de façon exponentielle dans le milieu réactionnel. Elle est mesurée après chaque cycle d'amplification. On obtient à la fin de la réaction une courbe de fluorescence exponentielle (Figure 5).

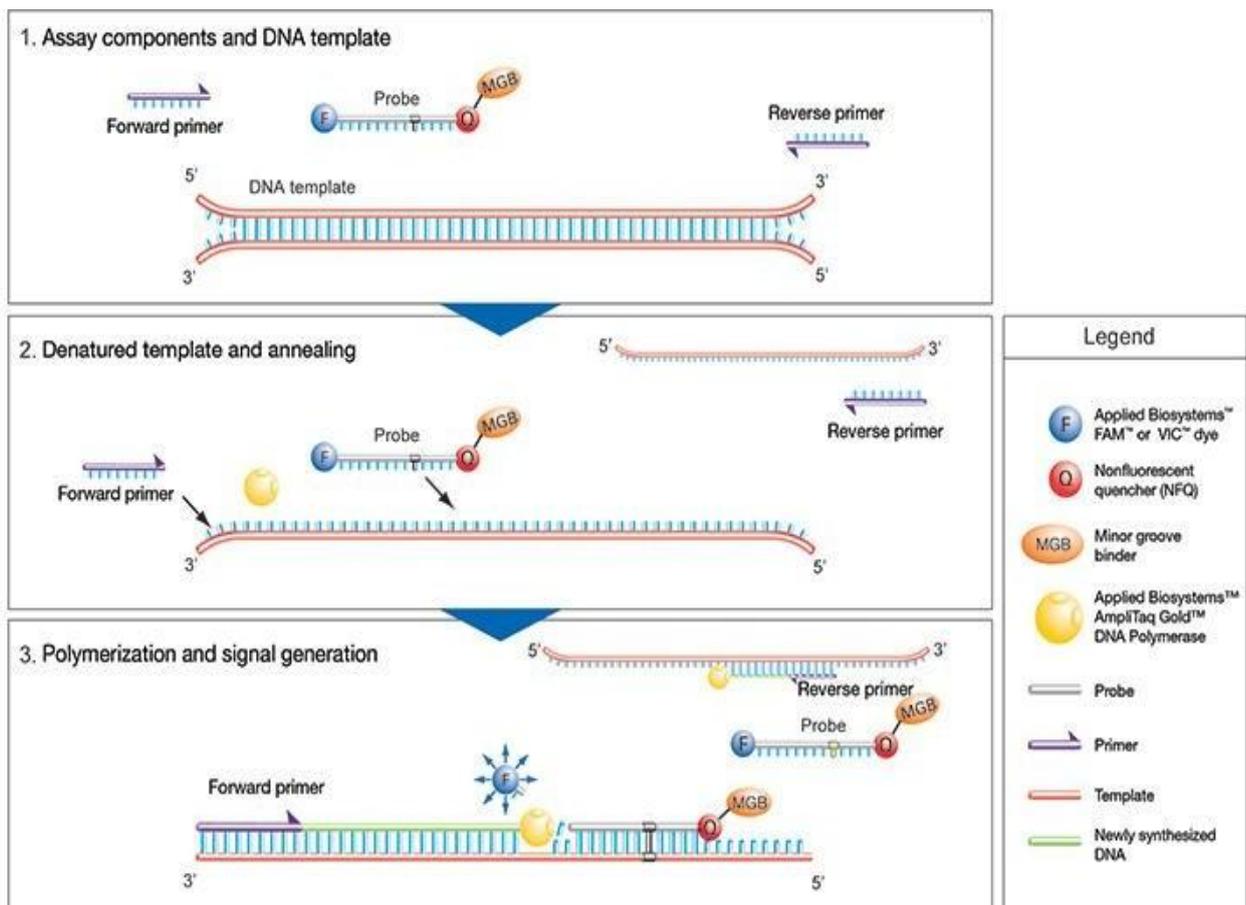
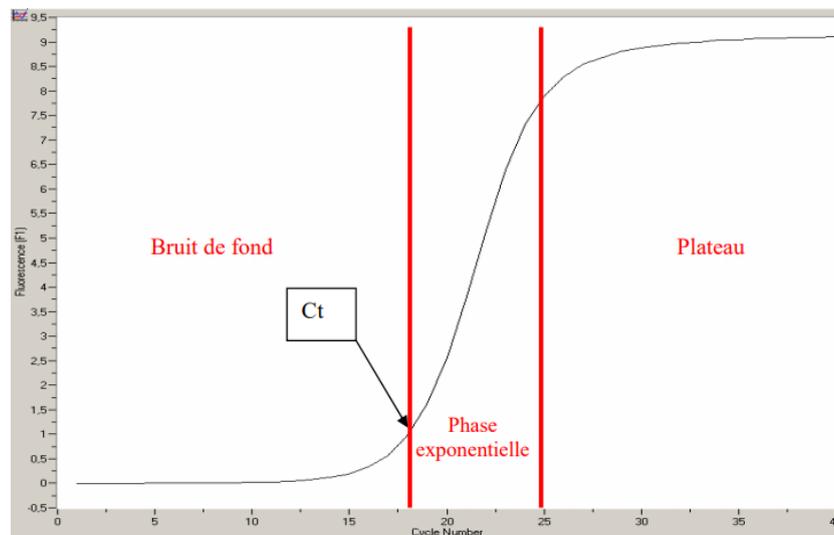


Figure 4 : Principe de la révélation en temps réel utilisant les sondes TaqMan® (32)

## *La PCR en temps réel*

Dans ce type de PCR, la révélation des produits d'amplification se fait de façon concomitante à l'étape d'amplification. Cela permet de suivre en continu le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits néo formés. À la fin de la réaction, on obtient une courbe de fluorescence que l'on peut découper en trois parties. La première partie correspond au bruit de fond, la seconde partie correspond à la phase exponentielle de la réaction d'amplification, la dernière partie correspond à une phase de plateau (33) (Figure 5).

Au bout d'un certain nombre de cycles d'amplification, le signal de fluorescence devient statistiquement significatif par rapport au bruit de fond. On détermine alors le cycle seuil (ou cycle threshold = Ct). Plus le cycle threshold est petit, plus le gène d'intérêt se trouve en grande quantité dans l'échantillon de départ.



**Figure 5 : Courbe de fluorescence (33)**

## *La PCR multiplexe*

Le principe d'une PCR multiplexe est de permettre l'amplification de plusieurs gènes de façon concomitante. Dans le milieu réactionnel, avant l'amplification, plusieurs couples d'amorces, sans compétition entre eux, sont ajoutés. Ces amorces vont permettre d'amplifier

plusieurs gènes appartenant à différents agents pathogènes au cours d'une même série de PCR. Dans notre cas, la méthode de PCR que nous installons à Beauvais est une méthode triplexe qui nous permet de rechercher, sur un même extrait, à la fois *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*.

## *C. La qualité*

### **1. Histoire de la qualité**

Le concept de qualité est très ancien. Jusqu'au XIXe siècle, pendant l'ère artisanale, la qualité est garantie par la connaissance du métier et la conscience professionnelle. La demande est limitée et les clients sont fidèles. Une relation de confiance existe naturellement entre le producteur et son client.

Au XXe, siècle c'est l'ère industrielle : la demande augmente, il faut produire plus et plus vite. L'absence de contrôle engendre des dysfonctionnements et des incidents. On cherche donc, dans la première moitié du XXe siècle, à augmenter le niveau de qualité par la mise en place d'un contrôle final unitaire des produits. Rien ne change dans les procédés de fabrication, mais à la fin, des contrôleurs trient les produits (contrôle qualité) et retirent ceux qui présentent des non-conformités. Cela demande donc plus de main d'œuvre (des contrôleurs) et entraîne plus de déchets (les produits non-conformes) pour au final obtenir toujours le même nombre de ventes. Avec le besoin de produire en masse, pour répondre à une demande toujours grandissante et à une économie de marché concurrentielle, les industries se sont retrouvées confrontées à l'impossibilité de contrôler l'ensemble de leur production de façon unitaire. Il a donc fallu améliorer les méthodes de contrôle.

Dans les années soixante au Royaume-Uni, le concept d'assurance qualité fait son apparition. Le principe est de réaliser la fabrication des produits dans des conditions idéales pour que ceux-ci soient conformes du premier coup et pour qu'il y ait le moins de rebuts possible. Il faut donc maîtriser l'ensemble des paramètres des procédés de fabrication. Cela est impossible car leur nombre est infini. Mais pour s'en approcher, on peut classer ces paramètres dans 5 catégories, les 5 M : la Main d'œuvre (personnel compétant), la Méthode (bonnes pratiques de travail), le Matériel (équipements adaptés), la Matière (matériaux adaptés), le Milieu (maîtrise des paramètres environnementaux). Ces 5 catégories sont représentées dans le célèbre diagramme d'Ishikawa (ou diagramme de causes-effets) (Figure 6). Le but de l'assurance qualité est de s'assurer que tout est mis en œuvre afin d'obtenir la qualité attendue du produit final. Ce concept est valable pour les productions industrielles mais peut également s'appliquer aux prestations de services.

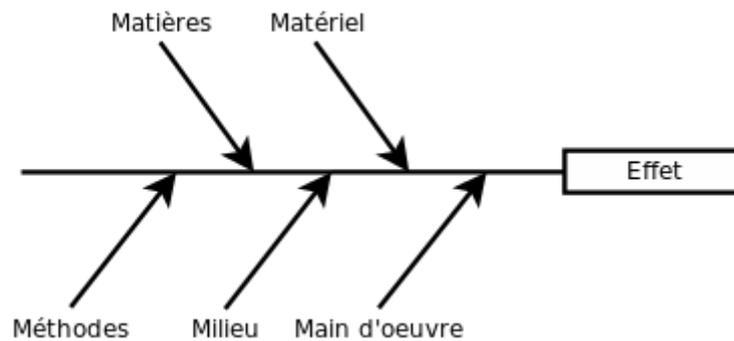


Figure 6 : Diagramme cause-effet d'Ishikawa

De nos jours, la qualité vise de plus en plus la satisfaction globale du client. Il faut désormais tenir compte de la qualité de la relation client-producteur (ou client-prestataire de services) et de la perception par le client du service rendu. Cela passe par le management de la qualité. Les entreprises s'organisent maintenant pour donner à leurs employés l'envie de bien faire leur travail : c'est le système de management de la qualité (SMQ).

## 2. Le management de la qualité

Le Système de Management de la Qualité est l'ensemble des activités par lesquelles un organisme définit, met en œuvre et revoit sa politique et ses objectifs qualité conformément à sa stratégie. La norme ISO 9001 prévoit une approche par processus lors du développement, de la mise en œuvre et de l'amélioration de l'efficacité d'un système de management de la qualité, ce qui permet d'intégrer pour toutes les activités de l'entreprise le principe d'amélioration continue.

La roue de Deming (Figure 7) est un outil qui permet la gestion de la qualité et l'amélioration continue. Il se décompose en 4 phases : PDCA (Plan ; Do ; Check ; Act) :

- Plan : Il faut commencer par identifier le problème et préparer ce que l'on va réaliser.

- Do : Cette étape consiste ensuite à mettre en œuvre, à réaliser ce que l'on a prévu de faire.
- Check : Puis il faut contrôler que les résultats obtenus sont conformes à ce qui était prévu, que les solutions mises en œuvre sont efficaces. On se sert par exemple d'indicateurs qualité.
- Act : Enfin cette étape consiste à agir pour ajuster les écarts observés, à rechercher les axes d'amélioration.



Figure 7 : Roue de Deming

### 3. Contexte actuel de la qualité en biologie médicale

Tout laboratoire de biologie médicale est tenu de contrôler la bonne exécution des examens qu'il réalise. Une première version du GBEA (= Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale) est parue suite à l'arrêté du ministre chargé de la santé du 2 novembre 1994 et une seconde version est publiée en 2002.

En 2008, le règlement n°765/2008/CE du Parlement européen et du Conseil du 9 juillet 2008 impose aux États membres de désigner chacun un seul organisme d'accréditation. En France, l'organisme désigné est le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Initialement, la démarche d'accréditation des laboratoires de biologie médicale était basée sur le volontariat. Puis l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 rend obligatoire

l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO 15189. L'article L. 6221-1 du CSP interdit désormais aux laboratoires de réaliser des examens de biologie médicale sans accréditation. De plus, la démarche d'accréditation doit porter sur les trois phases de l'examen : la phase pré-analytique, la phase analytique et la phase post-analytique.

La loi du 30 mai 2013 instaurant la réforme de la biologie médicale précise le calendrier de mise en place de l'accréditation par paliers successifs : elle était obligatoire pour 50 % des actes au 1<sup>er</sup> novembre 2016, 70 % des actes au 1<sup>er</sup> novembre 2018 et 100 % des actes au 1<sup>er</sup> novembre 2020. Cependant devant le nombre très important de laboratoires et d'examens de biologie médicale à accréditer, le COFRAC n'a pas pu répondre à toutes les demandes d'accréditation. Ainsi la loi du 9 décembre 2016 relative à la transparence, à la lutte contre la corruption et à la modernisation de la vie économique reporte au 31 décembre 2017 la première échéance d'accréditation des laboratoires de biologie médicale, et supprime le cap à franchir en 2018.

#### **4. La norme NF EN ISO 15189**

La norme ISO 15189 a été conçue par l'organisation internationale de normalisation (ISO) qui regroupe tous les organismes nationaux de normalisation au niveau mondial. La dernière version de cette norme a été publiée en décembre 2012(3). Elle ne s'applique qu'aux laboratoires de biologie médicale. En France, elle est rendue obligatoire par la loi HPST (= loi Hôpital, Patient, Santé, Territoire) de 2010.

Cette norme définit les exigences de compétence et de qualité propres aux laboratoires de biologie médicale. Elle se base sur deux normes qui étaient déjà existantes :

- la norme ISO 9001 relative aux systèmes de management de la qualité
- la norme ISO/CEI (= Commission Electrotechnique Internationale) 17025 relative aux exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

La norme 15189 est composée de deux grandes parties : une partie dédiée aux exigences relatives au management (proche de la norme ISO 9001) et une partie relative aux exigences techniques.

Enfin, cette norme internationale laisse aux laboratoires de biologie médicale le libre choix de ses méthodes de validation et de son organisation. Cependant, toutes les démarches effectuées et les résultats obtenus doivent être enregistrés.

## **5. Le COFRAC**

Suite au règlement n°765/2008/CE du Parlement européen et du Conseil du 9 juillet 2008 le Comité Français d'Accréditation (=COFRAC) est désigné comme étant la seule instance française d'accréditation. Depuis sa création en 1994, le COFRAC est chargé de reconnaître la compétence et l'impartialité des organismes accrédités et d'obtenir la reconnaissance au niveau international, de leurs compétences et leurs prestations. Le COFRAC est décomposé en quatre sections qui gèrent les accréditations chacune dans leur domaine. La section chargée d'évaluer et d'accréditer les laboratoires de biologie médicale est la section Santé Humaine.

## **6. Cycle de l'accréditation**

Le processus d'accréditation selon la norme ISO 15189 des LBM est long et rigoureux. Il se décompose en quatre grandes parties :

- Le laboratoire dépose une demande d'accréditation auprès du COFRAC qui va étudier la recevabilité du dossier. Une convention est ensuite établie entre le COFRAC et le laboratoire demandeur.
- Le laboratoire est évalué au cours d'un audit initial sur des bases factuelles. Une équipe d'évaluateurs est désignée en fonction de leurs compétences et des domaines de la biologie médicale qui sont évalués lors de l'audit. Cette équipe est toujours composée à la fois d'auditeurs qualitatifs et d'auditeurs techniques (ces derniers sont des biologistes).
- Le rapport de l'évaluation est examiné par une commission qui décide ou non d'accréditer le LBM.

- La décision d'accréditation est finalement notifiée par le directeur du COFRAC. Une attestation qui précise le champ et la durée de l'accréditation est délivrée au laboratoire.

Initialement, l'accréditation est accordée pour 4 ans. Pendant ce premier cycle, le laboratoire est de nouveau évalué lors d'audits de surveillance (évaluation allégée) tous les ans. À la fin de ce premier cycle de 4 années, un audit de renouvellement est organisé avec une évaluation de l'ensemble des exigences de la norme 15189. L'accréditation est alors reconduite pour une durée maximale de 5 ans entrecoupée tous les 15 mois d'audit de surveillance.



Figure 8 : Cycle de l'accréditation

## 7. Portées d'accréditation

Une portée d'accréditation est un énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire demande l'accréditation (34).

La section santé humaine du COFRAC répartit dans le SH-INF-50 toutes les lignes de portée d'accréditation en domaines, familles, sous-domaines et sous-familles. Chaque sous-famille est composée de plusieurs lignes de portée d'accréditation. La PCR bactérienne est

concernée par la ligne BA8 (domaine « Biologie médicale », famille « Microbiologie », sous-domaine « Microbiologie », sous-famille « Bactériologie »).

Deux types de portées d'accréditations sont proposés par la norme ISO 15189.

- L'accréditation d'une analyse en portée A : dans ce cas l'analyse est réalisée selon une méthode reconnue. Le laboratoire adopte une méthode validée par le fournisseur qu'il doit utiliser selon les recommandations du fournisseur.
- L'accréditation d'une analyse en portée B : dans ce cas le laboratoire peut développer lui-même, ou adapter une méthode. Le laboratoire doit alors valider sa méthode.

## **8. Validation/vérification de méthode**

Selon la norme NF EN ISO 15189, un laboratoire doit vérifier (portée A) ou valider (portée B) une méthode avant de l'utiliser en routine. Le but d'une validation/vérification de méthode est de s'assurer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et que les résultats rendus sont fiables.

Ainsi le laboratoire réalise un dossier de validation/vérification de méthode qui, comme expliqué dans le guide du COFRAC SH-GTA-04, doit comporter :

- Une description de la méthode à mettre en place : il s'agit d'expliquer l'intérêt et le principe de la méthode, de décrire le processus (il peut s'agir d'un processus simple ou d'un processus complexe avec plusieurs sous-processus) et le caractère quantitatif ou qualitatif de la méthode.
- Les détails de la mise en œuvre de la validation/vérification de méthode
- Une étude de la maîtrise des risques
- Un rapport de l'évaluation des performances de la méthode sur site
- Enfin, la déclaration d'aptitude

Pour guider les laboratoires, le COFRAC propose un modèle à suivre : le formulaire SH-FORM-43.

La version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 précise les notions de processus simple et de processus complexe (35). Lorsqu'un examen de biologie médicale est un processus simple, l'examen ne comporte qu'une seule méthode, par opposition aux processus complexes qui comportent plusieurs sous-processus indépendants les uns des autres. Dans le cadre d'un processus complexe, chaque sous-processus doit faire l'objet d'une évaluation des critères de performance.

Une méthode peut être quantitative, lorsque les résultats sont issus de données numériques, on obtient alors un résultat chiffré, une quantité d'analyte. À l'inverse, les méthodes donnant des résultats issus de données non numériques (présence ou absence, lecture subjective...) sont dites qualitatives. Dans ce cas la méthode ne donne pas d'information sur la quantité mais seulement sur la présence ou l'absence de l'analyte.

Selon le caractère quantitatif ou qualitatif de la méthode et selon le type de portée choisi (A ou B), tous les critères de performance ne sont pas forcément à évaluer sur site (Figure 9). Le fournisseur doit procurer au laboratoire un dossier de validation de méthode. Si le laboratoire choisi la portée d'accréditation de type A, il s'appuie sur le dossier de validation du fournisseur et juge de la nécessité de chaque essai de vérification à réaliser sur site. Pour chaque critère de performance que le laboratoire choisi de ne pas vérifier, il faut argumenter les raisons de ce choix.

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Justesse/exactitude</b> (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
<b>Comparaison</b> avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir <sup>9</sup> , EBMD) et analyse des discordances <sup>10</sup>	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure ( <b>Limite de quantification et limites de linéarité</b> )	Bibliographie	/	Essai	/
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Robustesse</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Intervalle de référence</b> (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Limite de détection</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Spécificité/sensibilité analytique</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>11</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>				

Figure 9 : Critères de performance à évaluer (SH-GTA-04) (35)

Dans ce travail nous allons notamment aborder la fidélité intermédiaire, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité analytique, la comparaison de méthodes et les essais de contamination.

#### a) La fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire est la reproductibilité intra laboratoire. On vérifie que les résultats obtenus à partir d'un même échantillon, restent semblables lorsque l'analyse est réalisée par différents opérateurs, à différents jours (35).

### ***b) L'exactitude***

L'exactitude est l'étroitesse d'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. L'exactitude se vérifie à l'aide d'échantillons standards, les Évaluations Externes de Qualité (EEQ) (35).

L'exactitude est une performance qui fait partie de la vérification continue d'une méthode. En effet, elle doit être vérifiée avant la mise en place de la méthode mais également régulièrement (la fréquence est à définir) tout au long de l'utilisation de la méthode.

### ***c) La sensibilité et la spécificité analytique***

La sensibilité analytique est la probabilité que la méthode à évaluer donne un résultat positif lorsque l'échantillon testé est connu comme étant positif (36).

La spécificité analytique est la probabilité que la méthode à évaluer donne un résultat négatif lorsque l'échantillon testé est connu comme étant négatif (36).

### ***d) La comparaison de méthodes***

Il s'agit de tester les échantillons en parallèle sur les deux méthodes et de comparer les résultats. Il faut que les résultats obtenus par la nouvelle méthode soient concordants à ceux obtenus par l'ancienne. Si ce n'est pas le cas il faut analyser les causes de discordances.

### ***e) Essais de contamination***

La contamination est un point critique de la PCR. Il faut donc réaliser des essais permettant de démontrer que tout au long du processus analytique il n'y a pas de contamination d'un échantillon négatif par un échantillon ou un contrôle positif.

## 9. Validation / vérification continue

La vérification / validation d'une méthode comprend deux grandes phases : une phase initiale (avant la mise en œuvre en routine de la méthode) puis une phase de vérification / validation continue.

Cette seconde phase permet de s'assurer que la méthode reste performante dans le temps. Elle répond aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 en permettant la maîtrise du processus analytique pendant toute la durée de l'utilisation de la méthode et en apportant la preuve permanente de la validité des résultats.

La vérification / validation continue est réalisée en routine dans le cadre du fonctionnement normal et quotidien du laboratoire (37). Elle est mise en œuvre grâce à l'utilisation, la gestion et le suivi des Contrôles Internes de Qualité (CIQ).

Le passage de CIQ en biologie permet (37) :

- Au quotidien de s'assurer que les résultats rendus sont valides et de prendre les mesures nécessaires en cas de rejet (étude d'impact, action corrective),
- A plus long terme, sur plusieurs jours (ou plusieurs séries) les CIQ permettent de voir les tendances, de détecter les phénomènes de dérive et de mettre en place des actions préventives.

Le diagramme de Levey-Jennings est un outil crucial pour la vérification continue. Il est construit à partir d'une quinzaine de passages de CIQ minimum (38). On calcule la moyenne des différents résultats obtenus ainsi que l'écart-type (la déviation standard ou SD).

Les règles de Westgard définissent les limites d'acceptabilité et de rejet des contrôles en se basant en général sur des intervalles calculés : [moyenne +/- 1SD], [moyenne +/- 2SD] et [moyenne +/- 3SD].

Règles	Description
$1_{2s}$	1 valeur éloignée de plus de 2 écarts-types de la moyenne
$1_{3s}$	1 valeur éloignée de plus de 3 écarts-types de la moyenne
$2_{2s}$	2 valeurs consécutives éloignées de plus de 2 écarts-types du même côté de la moyenne
$R_{4s}$	2 valeurs consécutives éloignées l'une de l'autre de plus de 4 écarts-types
$4_{1s}$	4 valeurs consécutives éloignées de plus de 1 écart-type du même côté de la moyenne
$10_x$	10 valeurs consécutives situées du même côté de la moyenne

**Tableau 1: Règles de Westgard (39)**

## **Objectifs**

Ce travail a pour objectif principal la mise en place et la vérification de méthode initiale, en portée A, de la trousse de PCR : Urethritis basic<sup>®</sup> (Fast-Track Diagnostics) pour la détection qualitative de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*.

Secondairement, nous établirons un suivi continu des performances à partir des contrôles.

## **Matériels et méthodes**

### ***A. Dossier de vérification de méthode***

Pour réaliser le dossier de vérification de méthode nous nous sommes basés sur différents documents de référence. Parmi les documents du COFRAC, nous avons utilisé en particulier le SH-GTA-04, le SH-FORM-43, le SH-INF-50, le SH-GTA-01 et le SH-REF-08.

#### **1. Description du processus**

Il faut tout d'abord choisir selon l'utilisation prévue, le type de portée d'accréditation adapté (35). Dans le cas présent nous choisissons la portée d'accréditation de type A puisque nous utiliserons la méthode selon les recommandations du fournisseur et que notre kit est marqué CE.

Le caractère simple ou complexe du processus est à définir (35). Bien que notre méthode soit composée de plusieurs étapes (extraction, préparation des mix, amplifications) elles sont complètement indissociables les unes des autres et l'ensemble est considéré comme un processus simple donnant un résultat final et unique. Il n'est pas possible de considérer la PCR comme un processus complexe au sens du COFRAC (avec plusieurs sous-processus) car il faudrait alors réaliser la vérification des performances de l'extraction séparément de la vérification des performances de l'amplification.

Ensuite il faut définir le caractère quantitatif ou qualitatif des résultats (35). Pour notre technique de PCR en temps réel les résultats sont qualitatifs. En effet, ils sont rendus en termes de présence ou d'absence d'ADN bactérien détecté. De plus, malgré le fait que le résultat soit basé sur un seuil numérique, le Ct (cycle threshold), notre fournisseur précise dans son manuel d'utilisation que la positivité se définit par la présence d'un tracé d'amplification, c'est-à-dire un tracé exponentiel de la courbe de fluorescence.

Le type d'échantillon analysé est rappelé ainsi que le support utilisé pour collecter ces échantillons. Les unités d'expression des résultats et les critères d'interprétation sont précisés.

Enfin, les références des appareils utilisés et celles des réactifs sont précisées.

## 2. Analyse de risques

L'analyse de risques est réalisée selon une approche par processus (40) :

- Processus pré-analytique :
  - Demande d'analyse, transcription de la prescription
  - Préparation du patient, prélèvement de l'échantillon biologique
  - Acheminement
  - Enregistrement de la demande
  - Conservation de l'échantillon
- Processus analytique :
  - Prétraitement de l'échantillon
  - Extraction
  - Préparation des mix
  - Amplification
  - Vérification technique et analytique (contrôles)
- Processus post-analytique :
  - Interprétation des résultats
  - Validation biologique
  - Réalisation du compte-rendu et communication des résultats
  - Traitement administratif et facturation
  - Stockage des échantillons biologiques

Pour chaque étape (sous-processus) de chaque phase (processus) de l'analyse, les risques sont répertoriés dans un tableau résumant les dangers ainsi que leurs effets. Pour chaque risque il faut apporter un ou plusieurs points de maîtrise. La criticité du risque initial et du risque après la mise en œuvre des points de maîtrise est calculée. Pour cela on score pour chaque risque la fréquence (F) de 1 à 3, la gravité (G) de 1 à 3 et la détectabilité (D) de 1 à 3. On multiplie ces scores entre eux pour obtenir un score de criticité. Les points de maîtrise mis en place sont destinés à diminuer la criticité (41).

### **3. Étude de la stabilité des échantillons**

Des échantillons positifs pour chacun des trois pathogènes lors d'une première série sont repassés dans la série de PCR suivante, afin de nous assurer que la stabilité des échantillons n'est pas altérée en une semaine (ce qui est le délai maximum entre deux séries de PCR). Les échantillons sont conservés à 4°C.

### **4. Critères de performance de la méthode**

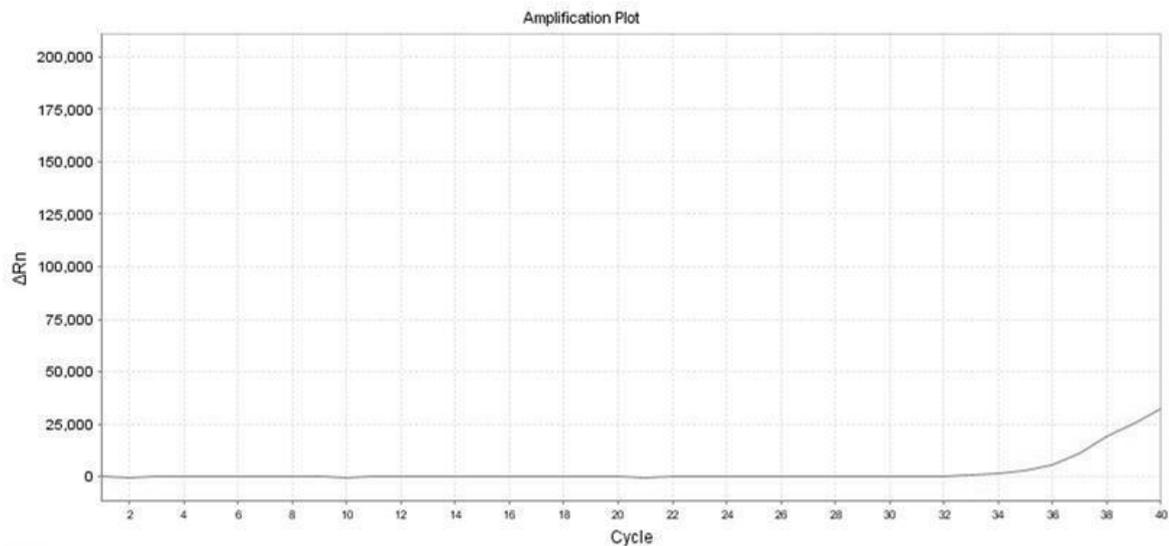
#### ***a) Bibliographie***

Pour décider des critères de performance qui sont à évaluer sur site, nous nous sommes appuyés sur différents documents : le dossier de validation de méthode réalisé par notre fournisseur, le Quamic 2017, les recommandations des sociétés savantes telles que la SFBC (42) et le guide du COFRAC (SH-GTA-04) (35).

#### ***b) Fidélité intermédiaire pour *N. gonorrhoeae****

Dans ce travail, nous choisissons de vérifier la fidélité intermédiaire des résultats faibles positifs ou douteux pour la recherche de *N. gonorrhoeae*. En effet pour les deux autres agents pathogènes nous n'avons pas obtenu de résultats ambigus pendant la période d'étude.

Nous décidons de repasser nos échantillons donnant des résultats faibles positifs ou douteux pour *N. gonorrhoeae*, c'est-à-dire ceux présentant un signal tardif ( $Ct > 35$ ) et/ou dont l'aspect exponentiel de la courbe de fluorescence est équivoque (Figure 10).



**Figure 10 : Exemple de courbe douteuse pour *N. gonorrhoeae***

Les échantillons donnant ce type de résultats dans une première série sont à nouveau testés dans une ou plusieurs autres séries, par un technicien différent à chaque fois. Les échantillons sont congelés entre deux séries.

Deux échantillons sont ainsi testés :

Échantillon	Date de la série	Ct de <i>N. gonorrhoeae</i>	Aspect de la courbe	Ct du contrôle interne
A	06/07/2017	36,67	Équivoque / Ascension tardive et plateau non visible	23,82
B	08/08/2017	35,89	Équivoque / Ascension tardive et plateau non visible	22,26

Tableau 2 : Échantillons douteux pour le gonocoque

### c) *Exactitude*

Notre programme d'EEQ est un programme du Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie (CTCB) (référence BACM). Il comporte quatre évaluations annuelles. Il évalue la recherche d'ADN de *Chlamydia trachomatis* et/ou *Neisseria gonorrhoeae* uniquement. Au cours de l'élaboration de ce travail, 2 EEQ sont passés.

Le dossier de validation de notre fournisseur comporte une évaluation de l'exactitude de notre méthode à partir d'EEQ différents (panels Instand e.V. et panels QCMD pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*).

### d) *Sensibilité et spécificité*

La sensibilité et la spécificité sont des performances délicates à vérifier car le nombre de patients positifs est relativement faible. La réalisation de ces vérifications serait trop lourde et trop coûteuse. Nous nous baserons donc sur la bibliographie disponible ainsi que sur le dossier de validation de notre fournisseur qui comporte une évaluation de la sensibilité et de la spécificité.

### e) Comparaison de méthodes pour *C. trachomatis*

46 échantillons positifs et négatifs pour *Chlamydia trachomatis* sont testés avec les deux méthodes. Les discordances sont analysées par une troisième méthode lorsque que cela est possible (envoi des échantillons au laboratoire Cerba - méthode de PCR temps réel Abbott®).

### f) Essais de contamination

3 échantillons négatifs sont extraits en alternance avec 3 échantillons positifs (rendus positifs par l'ancienne méthode) pour *Chlamydia trachomatis*. Puis on réalise l'étape de PCR en alternant de la même manière des échantillons négatifs avec les échantillons positifs. Tous les échantillons attendus négatifs doivent donner un résultat négatif à la fin de l'analyse pour pouvoir conclure à l'absence de contamination inter-échantillons.

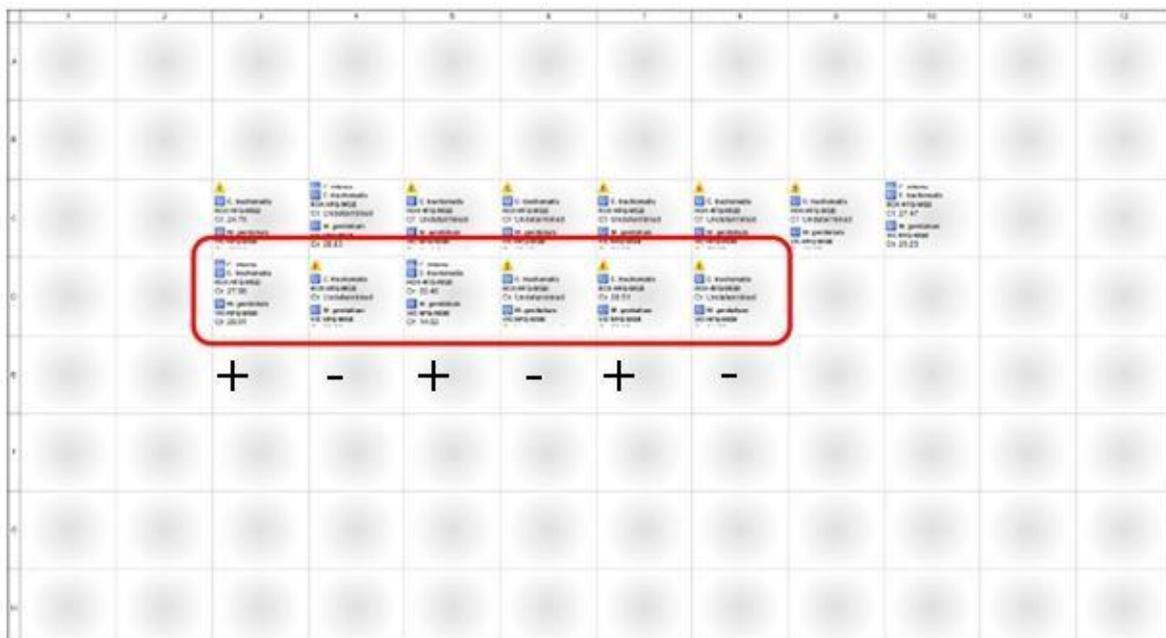


Figure 11 : Plan de plaque pour l'essai de contamination avec les résultats attendus

### ***g) Intervalle de référence***

La définition d'un intervalle de référence n'est pas réalisée puisqu'il correspond à l'absence de pathogène.

### ***B. Vérification continue***

La vérification continue est réalisée à partir de l'exploitation des résultats de quatre paramètres :

- Ct de *C. trachomatis* du contrôle positif
- Ct de *N. gonorrhoeae* du contrôle positif
- Ct de *M. genitalium* du contrôle positif
- Ct du contrôle interne du contrôle négatif

Les contrôles sont ainsi inclus dans chaque série de PCR. La moyenne et l'écart-type sont calculés pour chacun d'eux. Pour chaque contrôle une représentation graphique de Levey-Jennings est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Excel<sup>®</sup>. Les coefficients de variation sont calculés sur l'ensemble de la période.

### ***C. Méthodes de PCR utilisées à Beauvais***

#### **1. Les échantillons utilisés**

L'étude a porté sur 46 échantillons dont 40 prélèvements de 1<sup>er</sup> jet d'urine et 6 prélèvements vaginaux. Les prélèvements d'urine sont recueillis sur des tubes sans conservateur. Les prélèvements vaginaux sont recueillis sur écouvillons secs avec une tige en aluminium (Copan<sup>®</sup>) ou sur écouvillon eSwab (Copan<sup>®</sup>) avec milieu de transport.

## **2. L'extraction des acides nucléiques**

Les échantillons ont été extraits sur l'extracteur automatique EZ One (Qiagen®) à l'aide des kits DNA Tissue et selon le protocole « bactérie ».

## **3. L'amplification**

### ***a) Ancienne méthode : GenoQuick®CT, Hain Lifescience***

Les échantillons sont amplifiés à l'aide de la trousse GenoQuick®CT et grâce au thermocycleur AB2720 Thermal Cycle (Applied Biosystems®).

Les amorces sont spécifiques de l'ADN bactérien de *Chlamydia trachomatis* : 2 séquences hautement préservées du gène MOMP du plasmide cryptique.

Le contrôle positif fourni par le coffret ne doit pas être extrait. De l'eau stérile est utilisée comme contrôle négatif.

### ***b) Nouvelle méthode : Urethritis basic®, FTD***

Les échantillons sont amplifiés grâce la trousse Urethritis basic® sur le thermocycleur AB7500 (Applied Biosystems®).



Figure 12 : Thermocycleur AB7500 (Applied Biosystems®)

Les amorces sont spécifiques du gène ORF1 du plasmide cryptique pour *Chlamydia trachomatis*, du gène pta pour *Neisseria gonorrhoeae* et du gène mgpB pour *Mycoplasma genitalium*.

Les sondes de révélation sont de type TaqMan<sup>®</sup> avec un fluorophore spécifique pour chaque gène amplifié (ROX pour *C. trachomatis*, FAM pour *N. gonorrhoeae*, VIC pour *M. genitalium* et CY5 pour le contrôle interne) et un quencher non fluorescent.

Les contrôles négatif, positif et interne sont fournis dans la trousse. Le contrôle négatif doit être extrait. Le contrôle interne doit être extrait également et est donc ajouté à chaque échantillon et au contrôle négatif avant l'extraction. Le contrôle positif en revanche ne doit pas être extrait et ne doit pas contenir de contrôle interne.

## **Résultats**

### ***A. Dossier de vérification de méthode***

#### **1. Analyse de risques**

L'analyse de risques est présentée en annexe.

#### **2. Étude de la stabilité des échantillons**

Échantillons	Date de prélèvement	Nature du prélèvement	1 <sup>er</sup> passage le 22/03/2017	2 <sup>nd</sup> passage le 29/03/2017
CTpos1	15/03/2017	1 <sup>er</sup> jet d'urine	+	+
CTpos2	18/03/2017	Écouvillon vaginal	+	+
CTpos3	20/03/2017	1 <sup>er</sup> jet d'urine	+	+
CTpos4	20/03/2017	1 <sup>er</sup> jet d'urine	+	+

**Tableau 3 : Étude de la stabilité des échantillons pour *C. trachomatis***

Échantillons	Date de prélèvement	Nature du prélèvement	1 <sup>er</sup> passage le 16/11/2017	2 <sup>nd</sup> passage le 21/11/2017
NGpos1	14/11/2017	1 <sup>er</sup> jet d'urine	+	+

**Tableau 4 : Étude de la stabilité des échantillons pour *N. gonorrhoeae***

Échantillons	Date de prélèvement	Nature du prélèvement	1 <sup>er</sup> passage le 31/10/2017	2 <sup>nd</sup> passage le 07/11/2017
MGpos1	30/10/2017	1 <sup>er</sup> jet d'urine	+	+

**Tableau 5 : Étude de la stabilité des échantillons pour *M. genitalium***

### 3. Critères de performance de la méthode

#### a) Fidélité intermédiaire pour *N. gonorrhoeae*

Nos 2 échantillons donnant des résultats douteux pour *N. gonorrhoeae* sont repassés dans 2 autres séries de PCR par 2 autres techniciens. Les échantillons sont congelés entre deux passages.

Échantillon A :

Passages	Technicien	Ct de <i>N. gonorrhoeae</i>	Aspect de la courbe	Ct du contrôle interne	Résultat
1 <sup>er</sup> passage le 06/07/17	NM	36,67	Équivoque	23,82	Faiblement positif / Douteux
2 <sup>nd</sup> passage le 11/07/17	VV	Indéterminé	Absence de fluorescence	27,81	Négatif
3 <sup>ème</sup> passage le 08/08/17	OB	Indéterminé	Absence de fluorescence	26,08	Négatif

Tableau 6 : Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire pour *N. gonorrhoeae* (échantillon A)

Échantillon B :

Passages	Technicien	Ct de <i>N. gonorrhoeae</i>	Aspect de la courbe	Ct du contrôle interne	Résultat
1 <sup>er</sup> passage le 08/08/17	OB	35,89	Équivoque	22,26	Faiblement positif / Douteux
2 <sup>nd</sup> passage le 16/08/17	FBG	Indéterminé	Absence de fluorescence	26,95	Négatif
3 <sup>ème</sup> passage le 24/08/17	VV	Indéterminé	Absence de fluorescence	31,47	Négatif

Tableau 7 : Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire pour *N. gonorrhoeae* (échantillon B)

### ***b) Exactitude***

Au cours de l'élaboration de ce travail, 2 EEQ du CTCB sont passés.

	<b>1<sup>er</sup> EEQ passé le 19/04/17</b>	<b>2<sup>ème</sup> EEQ passé le 06/07/17</b>
Ct pour <i>C. trachomatis</i>	23,81	22,33
Ct pour <i>N. gonorrhoeae</i>	Indéterminé	16,30
Ct pour <i>M. genitalium</i>	30,72	34,02
Ct pour le contrôle interne	27,25	27,46
Résultats	<b>Positif pour <i>C. trachomatis</i> (CONFORME) Négatif pour <i>N. gonorrhoeae</i> (CONFORME) (Positif pour <i>M. genitalium</i> : non évalué par l'EEQ)</b>	<b>Positif pour <i>C. trachomatis</i> (CONFORME) Positif pour <i>N. gonorrhoeae</i> (CONFORME) (Positif pour <i>M. genitalium</i> : non évalué par l'EEQ)</b>

**Tableau 8 : Résultats de 2 EEQ du CTCB**

### ***c) Sensibilité et spécificité***

Le dossier de validation de notre fournisseur nous informe que ses essais ont montré une sensibilité de 100% pour des quantités d'ADN supérieures ou égales à 10<sup>4</sup> copies/ml.

Notre fournisseur affiche une spécificité de 100% pour les trois pathogènes recherchés grâce à des échantillons négatifs et des échantillons contenant différents agents pathogènes (bactéries, virus et parasites) autres que *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*. Aucun d'eux ne donne de résultats positifs.

Dans une communication affichée du CHRU de Tours pour la RICAI 2013 traitant des performances de la PCR multiplexe Fast-Track Diagnostics Urethritis basic® on note une sensibilité est de 86,7% et une spécificité de 100% pour *C. trachomatis* par rapport à la technique RealTime CT/NG Abbott® prise comme référence (43).

*d) Comparaison de méthodes pour C. trachomatis*

Date	Numéro d'échantillon	Nature du prélèvement	Ancienne méthode (Hain Lifescience)	Nouvelle méthode (FTD)	Concordant / Discordant
16/03/2017	1	urine	-	-	Concordant
	2	vagin	+	-	<b>Discordant</b>
	3	urine	-	-	Concordant
	4	urine	+	+	Concordant
	5	urine	-	-	Concordant
	6	urine	+	-	<b>Discordant</b>
	7	urine	+	-	<b>Discordant</b>
	8	urine	+	-	<b>Discordant</b>
	9	vagin	+	+	Concordant
	10	urine	+	+	Concordant
	11	urine	-	-	Concordant
	12	urine	+	+	Concordant
	13	urine	-	-	Concordant
	14	urine	-	-	Concordant
	15	urine	-	-	Concordant
	16	urine	+	+	Concordant
	17	urine	-	-	Concordant
	18	urine	+	+	Concordant
	19	urine	-	-	Concordant
	20	urine	+	+	Concordant
	21	urine	-	-	Concordant
	22	urine	+	+	Concordant
	23	urine	-	-	Concordant
22/03/2017	24	vagin	-	-	Concordant
	25	urine	-	-	Concordant
	26	urine	+	+	Concordant
	27	urine	-	-	Concordant
	28	urine	-	-	Concordant
	29	urine	-	-	Concordant
	30	urine	-	-	Concordant
	31	urine	-	-	Concordant
	32	urine	-	-	Concordant
	33	urine	-	-	Concordant
	34	vagin	-	-	Concordant
	35	vagin	+	+	Concordant
	36	urine	-	-	Concordant
	37	urine	-	-	Concordant
	38	urine	+	+	Concordant
	39	urine	+	+	Concordant
	40	urine	-	-	Concordant
	41	urine	-	-	Concordant
	42	urine	-	-	Concordant
	43	urine	-	-	Concordant
	44	urine	-	-	Concordant
	45	vagin	-	-	Concordant
	46	urine	+	+	Concordant

Tableau 9 : Résultats de la comparaison de méthodes pour *C. trachomatis*

Parmi les 4 échantillons discordants deux ont pu être envoyés au laboratoire Cerba (échantillon n°2 et 6) pour rechercher *C. trachomatis* par une troisième méthode (PCR en temps-réel Abbott®). Ces deux prélèvements sont revenus négatifs.

***e) Essais de contamination***

Échantillons	Résultats attendus	Résultats obtenus
D3	+	+
D4 (eau distillée)	-	-
D5	+	+
D6 (eau distillée)	-	-
D7	+	+
D8 (eau distillée)	-	-

**Tableau 10 : Résultats des essais de contamination**

Tous les échantillons attendus négatifs sont rendus négatifs par notre nouvelle méthode.

**B. Vérification continue**

**1. Représentation de Levey-Jennings pour *C. trachomatis* (contrôle positif)**

Moyenne (m)	Écart-type (SD)	m-1SD	m-2SD	m-3SD	m+1SD	m+2SD	m+3SD	CV%
27,86	1,0696	26,78	25,72	24,65	28,93	30,00	31,07	3,84

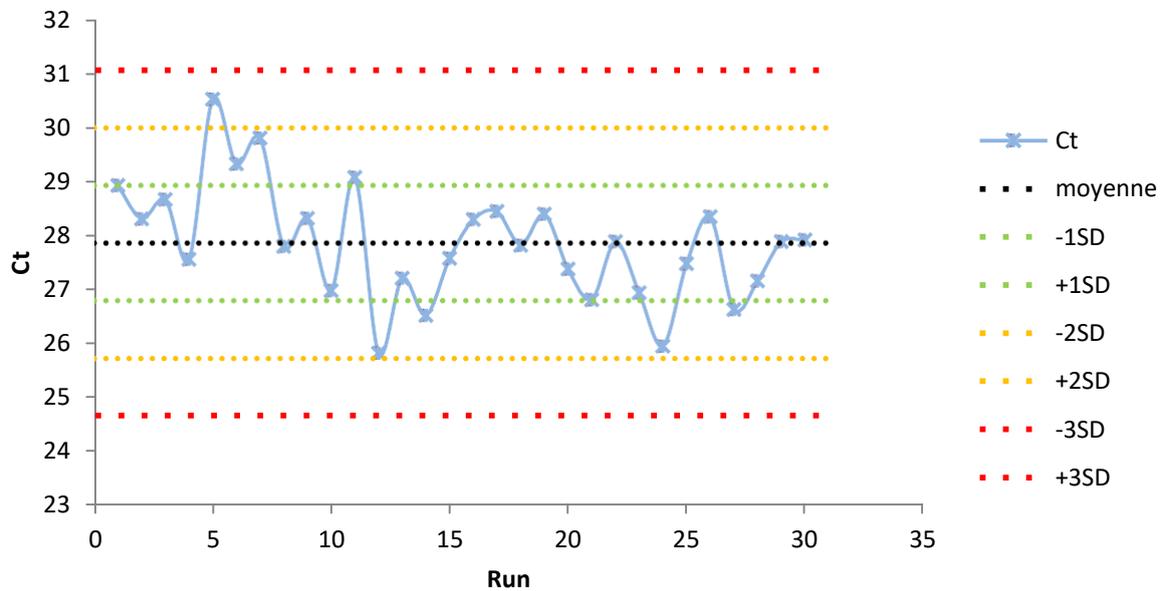


Figure 13 : Représentation de Levey-Jennings pour *C. trachomatis* (contrôle positif)

## 2. Représentation de Levey-Jennings pour *N. gonorrhoeae* (contrôle positif)

Moyenne (m)	Écart-type (SD)	m-1SD	m-2SD	m-3SD	m+1SD	m+2SD	m+3SD	CV%
27,25	0,9681	26,28	25,32	24,35	28,22	29,19	30,16	3,55

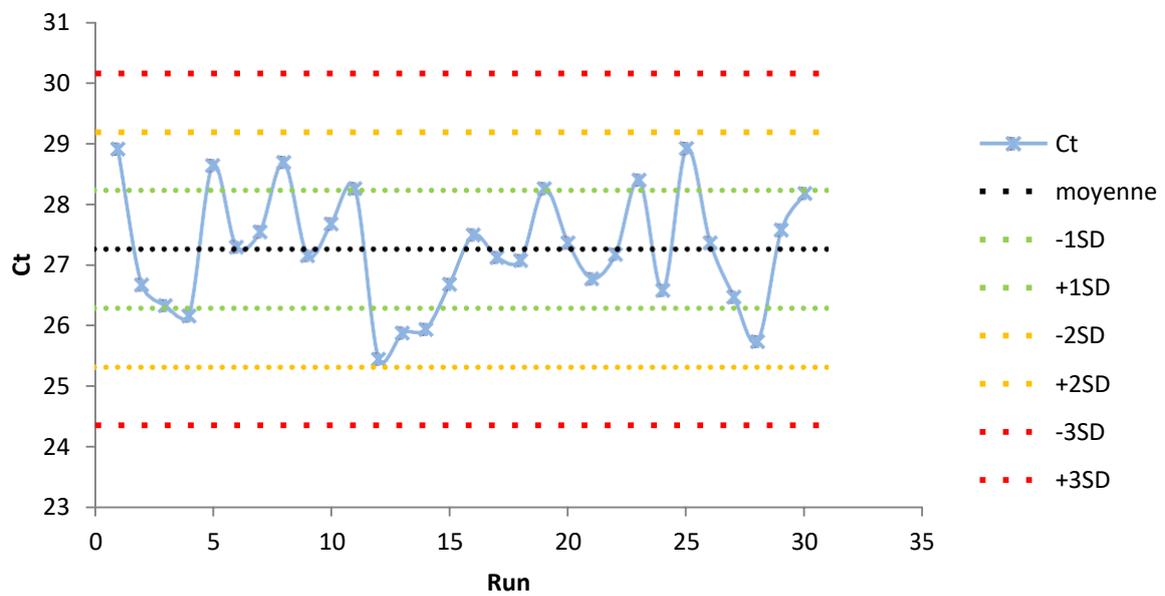


Figure 14 : Représentation de Levey-Jennings pour *N. gonorrhoeae* (contrôle positif)

### 3. Représentation de Levey-Jennings pour *M. genitalium* (contrôle positif)

Moyenne (m)	Écart-type (SD)	m-1SD	m-2SD	m-3SD	m+1SD	m+2SD	m+3SD	CV%
29,00	2,00	27,00	25,00	23,00	31,00	33,00	35,00	6,91

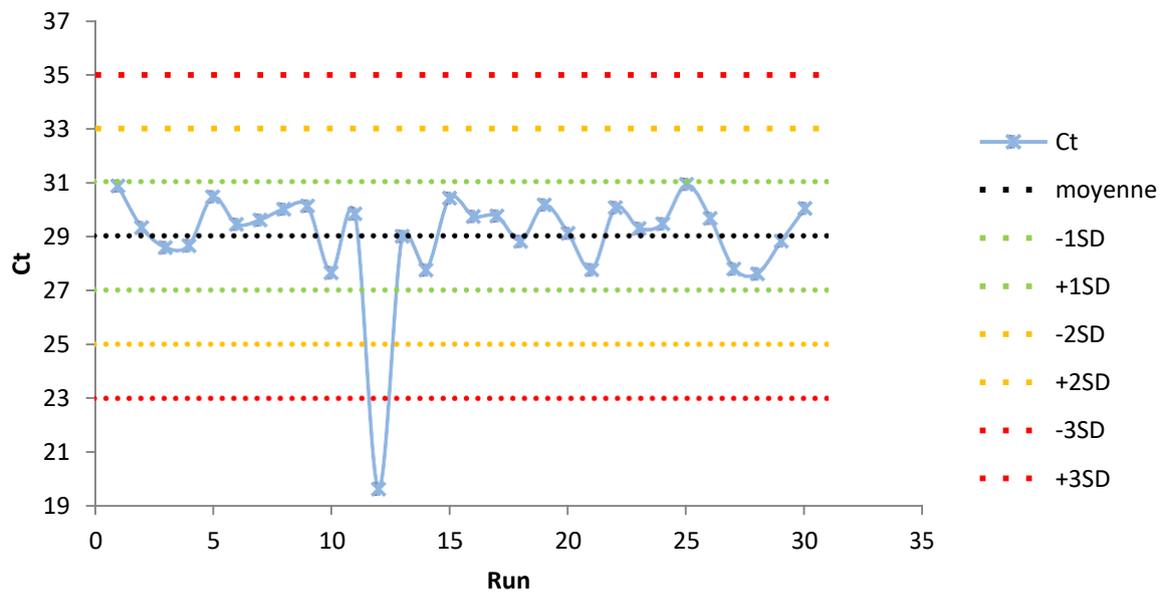


Figure 15 : Représentation de Levey-Jennings pour *M. genitalium* (contrôle positif)

#### 4. Représentation de Levey-Jennings pour le contrôle interne (dans le contrôle négatif)

Moyenne (m)	Écart-type (SD)	m-1SD	m-2SD	m-3SD	m+1SD	m+2SD	m+3SD	CV%
27,74	1,6930	26,04	24,35	22,66	29,43	31,12	32,82	6,10

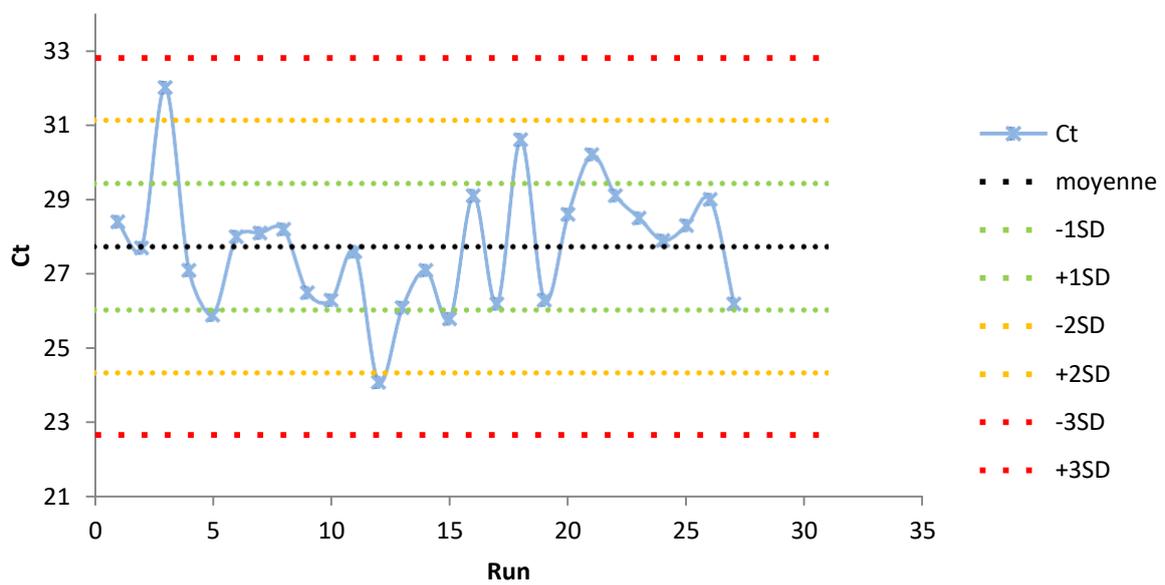


Figure 16 : Représentation de Levey-Jennings pour le contrôle interne (dans le contrôle négatif)

## **Discussion**

Ce travail a permis de réaliser la vérification de méthode sur site de la trousse de PCR triplexe en temps réel, Urethritis basic<sup>®</sup> (FTD).

Les essais de contamination inter-échantillons sont essentiels en biologie moléculaire. Nos essais montrent qu'il n'y a pas de contaminations inter-échantillons pendant la technique, ni au moment de l'extraction, ni lors de l'étape d'amplification et de révélation. Cependant ces essais ne permettent pas d'objectiver le risque global de contaminations inter-échantillons qui est constant dans tout laboratoire de biologie moléculaire. Ce risque est évalué dans l'analyse des risques, et les points de maîtrises sont conformes aux recommandations du COFRAC. Nos locaux sont conformes selon la norme avec une pièce pour la préparation des mix, une pièce pour l'extraction et une pièce pour l'amplification et la révélation (40). Nous appliquons ainsi le principe de la marche en avant (pas de retour depuis la pièce amplification vers la pièce préparation des mix par exemple). D'autre part, les étapes d'amplification et de révélation en temps réel sont réalisées dans un système complètement automatisé et fermé. Notre ancienne méthode avec révélation en point final, en système ouvert, nous faisait quelques fois suspecter des contaminations en particulier si dans la série un échantillon fortement positif était présent.

Les résultats des EEQ sont conformes aux résultats attendus par le CTCB. Une des principales limites de ce dossier de vérification de méthode est l'absence d'EEQ pour *Mycoplasma genitalium* commercialisé, à notre connaissance pendant la période de réalisation de ce travail, or il s'agit d'une obligation de la norme (3). Cependant, les 2 EEQ effectués sur la période sont revenus positifs à *M. genitalium*, ce qui est rassurant, bien que non évalué par le CTCB.

Les EEQ QCMD utilisés par notre fournisseur pour sa validation de méthode ne contiennent pas le paramètre *M. genitalium*. Après la mise en place de notre technique nous avons trouvé qu'il existait un EEQ QCMD pour *M. genitalium*, nous pensons qu'il n'est commercialisé que depuis quelques mois.

Nos essais de stabilité des échantillons avant l'analyse nous permettent de montrer que les échantillons restent stables pendant au minimum 7 jours pour *C. trachomatis*, *N.*

*gonorrhoeae* et *M. genitalium*. Compte-tenu de ces essais, du nombre moyen de demandes d'examens par semaine, de l'urgence relative de cet examen et de la disponibilité de notre personnel technique (un technicien dédié à la PCR pour la journée), cette stabilité est compatible avec la réalisation d'au moins une série hebdomadaire de PCR.

La fidélité intermédiaire n'est pas forcément à vérifier pour une méthode qualitative en portée A (42). Nous avons cependant décidé d'inclure celle-ci à notre vérification de méthode étant donné l'existence de résultats douteux pour le gonocoque au cours de nos essais. Nous n'avons pas été confrontés à ce type de résultats pour *C. trachomatis* et *M. genitalium* pendant la période sur laquelle nous avons réalisé de ce travail.

La grande limite des TAAN est son manque de valeur prédictive positive pour *N. gonorrhoeae* en particulier dans une population à faible prévalence (44). La HAS dans son argumentaire de novembre 2015 identifie notamment le signal d'amplification faible (tardif) comme un élément en faveur d'un manque de spécificité et laisse à l'appréciation du biologiste la nécessité de confirmer ces résultats par l'utilisation d'une sonde supplémentaire. Nous avons choisi dans un premier temps d'évaluer la reproductibilité de ces signaux faibles et douteux.

Notre vérification de méthode montre que lorsque l'on repasse les échantillons donnant des résultats douteux avec la même technique, ils sont alors négatifs, sans équivoque, à deux reprises. Les échantillons ayant été aliquotés et congelés dès leur 1<sup>er</sup> passage, nous excluons ainsi tout problème pré-analytique.

Nous pouvons émettre différentes hypothèses concernant ces signaux faibles et non reproductibles. Il peut s'agir d'une accroche non spécifique de la sonde entraînant une amplification faible avec un signal tardif. On sait notamment que les prélèvements au niveau des sites extra-génitaux sont susceptibles de provoquer des réactions croisées avec les *Neisseriae* commensales (20). Cependant, ceci est peu probable dans notre cas s'agissant de prélèvements de premier jet d'urine. Il peut éventuellement s'agir d'une quantité très faible de cible dans l'échantillon. On ne peut pas exclure une contamination. Nous excluons en revanche la formation de dimères d'amorces, la technologie Taqman® permettant de s'affranchir de ce phénomène.

Après avoir prouvé que ces signaux ne sont pas du tout reproductibles nous envisageons l'application de l'algorithme suivant (Figure 17) :

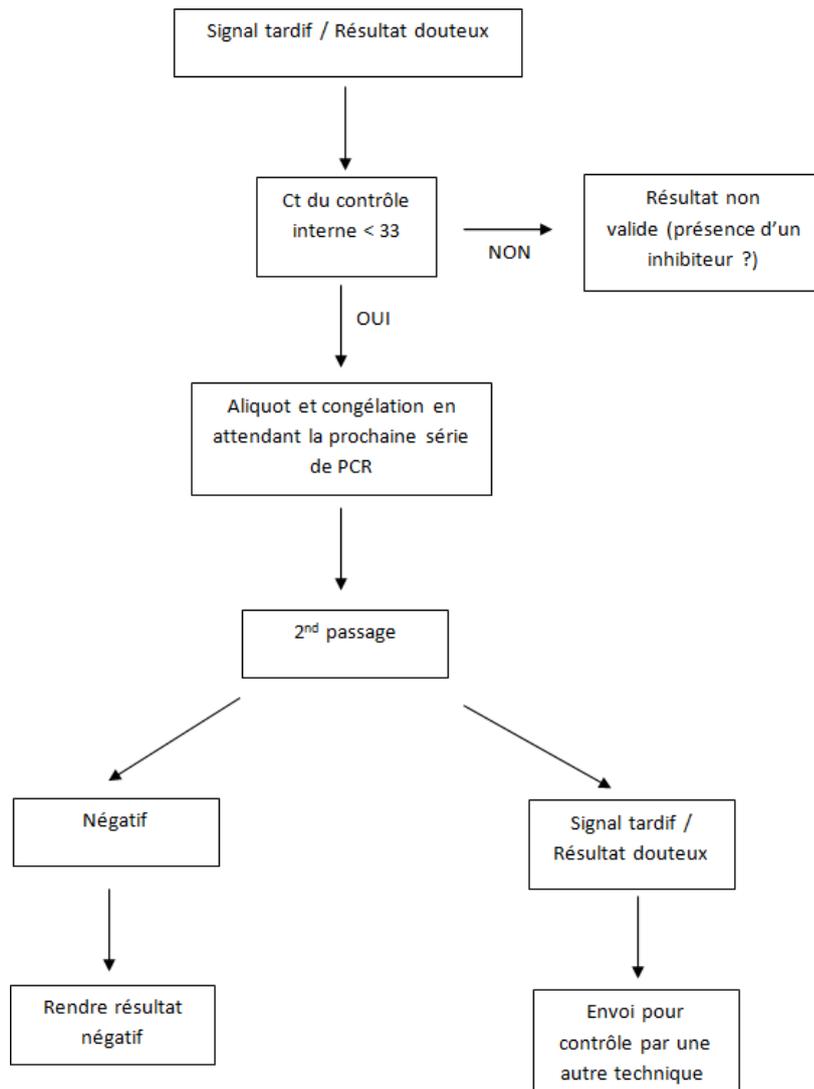


Figure 17 : Arbre décisionnel en cas de résultat douteux pour le gonocoque

Pour l’instant nous considérons un signal comme étant tardif lorsque le Ct est supérieur à 35. Ce seuil est fixé de façon arbitraire pour le moment, il faudra le déterminer de façon plus précise avec la pratique.

Suite à notre comparaison de méthodes pour la recherche de *C. trachomatis*, on observe 4 résultats discordants sur 46 (8.7%), uniquement dans le sens positif avec l’ancienne méthode et négatif avec la nouvelle méthode. Deux causes sont possibles :

- soit il s’agit de faux négatifs rendus par notre nouvelle méthode qui serait alors moins sensible que l’ancienne méthode,
- soit il s’agit de contaminations de l’ancienne méthode (méthode avec révélation en point final, en système ouvert).

Une communication affichée du CHRU de Tours pour la RICAI 2013(43) qui traite des performances de la PCR multiplexe Fast-Track Diagnostics Urethritis basic® montre une sensibilité de 86,7% et une spécificité de 100% pour *C. trachomatis* par rapport à la technique RealTime CT/NG Abbott® prise comme référence. Deux des prélèvements discordants ont pu être envoyés au laboratoire Cerba, qui utilise également la technique CT/NG RealTime Abbott®, et sont revenus négatifs.

L'hypothèse privilégiée est donc une contamination de l'ancienne méthode, ce qui confirme l'intérêt largement démontré de la PCR temps réel par rapport au point final en termes de contaminations. Notre nouvelle méthode remplit donc les exigences du QUAMIC 2017 (performances supérieures à celles de l'ancienne méthode).

L'objectif secondaire de ce travail était de proposer un outil de vérification continue des performances de notre méthode de PCR en temps réel grâce à des représentations de Levey-Jennings. En effet, bien que notre méthode soit qualitative, sa validité est basée sur les valeurs numériques des contrôles. Les contrôles internes du contrôle négatif et les contrôles positifs des trois paramètres doivent être inférieur à 33 pour valider la série. Nous décidons de suivre ainsi les Ct de ces quatre paramètres. Il n'est pas pertinent de suivre les valeurs des contrôles internes des échantillons patients dans la mesure où cette donnée est trop dépendante de l'échantillon lui-même (présence d'inhibiteur, phénomène de compétition).

À chaque série de PCR, la moyenne des différents contrôles suivis ainsi que les intervalles +/-1SD, +/-2SD, +/-3SD sont recalculés (moyenne flottante) grâce à des tableaux Excel. Le graphique de Levey-Jennings est alors mis à jour pour chacun de nos quatre contrôles. Nous considérons que lorsque la borne +2SD est supérieure ou égale à 33, un phénomène de dérive est en train d'apparaître. D'autre part, différentes règles de Westgard sont intéressantes dans le cadre de notre PCR pour nous permettre de repérer un phénomène de dérive : les règles 2.2s, R4s, et 10X (en particulier pour des valeurs au-dessus de la moyenne se rapprochant du seuil de 33).

Sur la période pendant laquelle ce travail a été réalisé, nous n'avons été confrontés qu'à une alerte où la règle R4s est violée pour le contrôle positif de *M. genitalium*. La représentation de Levey-Jennings pour ce contrôle nous donne une borne +2SD supérieure à 33. Cela est dû à une valeur aberrante, particulièrement basse (Ct à 19,64 le 10 mai 2017). Lors de cette série, le cycle threshold pour *M. genitalium* a été mal positionné. En effet, le bruit de fond a produit un signal linéaire avant l'amplification exponentielle qui a été

considéré à tort comme un signal positif. Si on retire des calculs la valeur aberrante en question, la borne +2SD du contrôle de *M. genitalium* passe de 35 à 31,24 et le coefficient de variation passe de 6,91% à 3,27%.

Nous avons remarqué au cours de ce travail que ce phénomène de bruit de fond mimant un signal positif apparaissait assez régulièrement sur le canal de fluorescence de *M. genitalium* sans que notre fournisseur ne puisse nous donner d'explication très satisfaisante. Cependant un bruit de fond trop important gêne le positionnement du cycle threshold, repoussant le vrai seuil de détection exponentielle vers des Ct plus élevés, plus proches de la borne de 33. Nous notons donc qu'un contrôle sortant avec un Ct particulièrement bas par rapport aux valeurs antérieures suggère un mauvais placement de cycle threshold (Ct placé dans le bruit de fond). Dans ce cas nous corrigeons simplement le placement du seuil avant de valider la série.

Pour chaque paramètre un coefficient de variation est calculé. Il est inférieur à 5% pour les 3 contrôles positifs (après retrait de la valeur aberrante pour *M. genitalium*). Cela nous semble tout à fait satisfaisant. Il existe très peu de données dans la littérature à ce sujet. Dans une publication traitant de la validation d'une méthode de PCR maison pour la recherche de Leishmanies, la validation continue par le suivi des contrôles donne un CV à 5% (45). Pour le contrôle interne dans le contrôle négatif, le coefficient de variation est de 6,10%. Ce coefficient de variation légèrement plus élevé pourrait être dû au fait que contrairement aux autres contrôles, le contrôle interne passe par l'étape d'extraction ce qui peut être un facteur de variation supplémentaire.

Le contrôle interne (du contrôle négatif) est le seul contrôle extrait (les contrôles positifs ne le sont pas). La représentation de Levey-Jennings pour ce paramètre nous permet donc principalement de suivre la qualité de l'extraction. Si un phénomène de dérive est observé pour ce contrôle uniquement, cela nous oriente vers un problème soit au niveau de l'extracteur, soit au niveau de la métrologie de la pipette qui sert à prélever le contrôle interne avant l'extraction. Cela peut également être un problème au niveau du canal de détection de la fluorescence du contrôle interne ou bien un lot défectueux de ce contrôle. En ce qui concerne les contrôles positifs, différents cas sont possibles. Soit le phénomène de dérive ne se produit que pour un seul des trois contrôles positifs, soit il touche les trois à la fois. Dans le cas où la dérive n'est observée que pour un contrôle, la cause peut être un problème au niveau du canal de détection de fluorescence correspondant. Dans le cas où les trois contrôles positifs sont touchés, les causes à évoquer sont un lot de contrôles défectueux ou une dérive métrologique de la pipette servant à la préparation des mix. Si un phénomène de dérive apparaît dans le

même sens pour les 4 contrôles suivis, il faut alors évoquer un problème de conservation des réactifs (en particulier de la Taq polymérase) et des contrôles (dérive métrologique des congélateurs) ou un problème technique au niveau du thermocycleur.

Les différentes possibilités de dérives et leurs causes principales peuvent ainsi être résumées dans le tableau suivant :

<b><u>Paramètres touchés par le phénomène de dérive</u></b>		<b><u>Causes principales</u></b>
Tous les contrôles		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problème technique du thermocycleur</li> <li>• Dérive métrologique du congélateur de stockage des réactifs (Taq+++) et contrôles</li> </ul>
Seulement le contrôle interne		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problème technique au niveau de l'extracteur</li> <li>• Dérive métrologique de la pipette du contrôle interne</li> <li>• Lot de contrôle interne défectueux</li> <li>• Dérive du canal de détection de la fluorescence du contrôle interne</li> </ul>
Seulement le(s) contrôle(s) positif(s)	Un seul contrôle positif	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dérive du canal de détection de la fluorescence du contrôle positif en question</li> </ul>
	Tous les contrôles positifs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dérive métrologique de la pipette de préparation des mix</li> <li>• Lot de contrôles positifs défectueux</li> </ul>

**Tableau 11 : Principales causes de dérive en fonction des contrôles concernés**

## Conclusion

Ce travail a permis de vérifier sur site notre méthode de PCR en temps réel sur un nouvel automate et avec une nouvelle trousse de PCR triplexe. Nous avons pu conclure à l'aptitude de la méthode sur site avec toutefois une non reproductibilité des résultats douteux pour le gonocoque qui nécessitent donc un nouveau passage. Grâce à cette trousse nous pouvons désormais mettre en évidence *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*, en plus de *C. trachomatis* (que nous recherchions déjà auparavant par PCR en point final). La détection simultanée, en particulier de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* nous paraît essentielle étant donné l'épidémiologie et les recommandations de la HAS.

L'autre partie importante de ce travail est la mise en place d'un outil pour la vérification continue de notre méthode. Cet outil nous permet de repérer une dérive et de nous orienter, en fonction de son type, vers une ou plusieurs causes en particulier. Nous nous assurons ainsi de maîtriser notre méthode tout au long de son utilisation.

Quelques points restent néanmoins en suspens :

D'une part nous considérons comme douteux tous les résultats de gonocoque dont le Ct est supérieur ou égal à 35. Le seuil de Ct à 35 est fixé arbitrairement, partant du principe que, au-delà, le signal est considéré comme faible et l'aspect exponentiel de la courbe est difficilement appréciable. Il faudra par la suite déterminer plus finement le seuil exact à partir duquel il sera nécessaire de contrôler un résultat faible pour le gonocoque.

D'autre part, devant l'existence de sites d'infections extra-génitales, il sera utile par la suite de valider notre méthode sur des prélèvements divers, notamment oro-pharyngés. Notre fournisseur n'ayant pas validé sa méthode pour ces prélèvements, cela relèvera d'une validation de méthode en portée B.



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



**Annexe : Dossier de vérification de méthode (SH-FORM-43)**

Examen de biologie médicale
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : PCR multiplexe <i>Chlamydia trachomatis Neisseria gonorrhoeae Mycoplasma genitalium</i>
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous processus...)

Description du processus				
	Eléments à vérifier (argumentation)	Limites d'acceptabilité	Modalités de vérification/validation	
Processus			<input type="checkbox"/> Répétabilité	
		Essais (Douteux faibles positifs pour <i>N. gonorrhoeae</i> )	<input checked="" type="checkbox"/> Fidélité intermédiaire	
			<input type="checkbox"/> Variabilité inter-opérateurs	
			<input type="checkbox"/> Justesse	
		Essais (EEQ)	<input checked="" type="checkbox"/> Exactitude	
		Dossier de validation du fournisseur	Sensibilité au moins égale à celle de l'ancienne méthode/Spécificité doit être >95% (QUAMIC 2017)	<input checked="" type="checkbox"/> Sensibilité et spécificité analytique
				<input type="checkbox"/> Incertitudes
				<input type="checkbox"/> Etendue de mesure
		Essais	Concordance des résultats ou performances supérieures/Sensibilité au moins égales (QUAMIC 2017)	<input checked="" type="checkbox"/> Comparaison de méthodes
		Dossier de validation du fournisseur		<input checked="" type="checkbox"/> Interférences
		Essais	Absence de contamination	<input checked="" type="checkbox"/> Contamination
				<input type="checkbox"/> Robustesse et fiabilité des réactifs
				<input type="checkbox"/> Intervalle de référence



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



**Détection d'ADN bactérien par extraction et PCR en temps réel**

Portée A  ; Portée B  (à justifier)

**DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Détection d'ADN bactérien dans des échantillons biologiques d'origine humaine
<b>Principe de la Méthode :</b>	Extraction des acides nucléiques. PCR avec sondes et amorces spécifiques
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	1 <sup>er</sup> jet d'urine, prélèvements génitaux et rectaux
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Pot stérile, tubes « Monovettes » sans conservateur, écouvillons eSwab (Copan), écouvillons secs rayon aluminium (Copan)
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Écouvillons secs déchargés dans tampon d'extraction Qiagen
<b>Unités :</b>	Absence ou présence d'ADN bactérien pour chacune des trois espèces (méthode qualitative)
<b>Critères d'interprétation :</b>	Courbe exponentielle croisant le threshold
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	Il n'existe pas de CNQ
<b>Équipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	Extracteur : Qiagen EZ1 Advanced XL Appareil de PCR en temps réel : Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System
<b>Référence du réactif :</b>	Fast-Track Diagnostics Urethritis basic FTD 33.1-32 FTD 33.1-64 Notice V3 du 2016_12
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	NA
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	NA

**MISE EN ŒUVRE**

<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	Techniciens référents : BARBET Olivier, MOREL Nathalie, VILLAIN Virginie, BROUDIN-GAUTIER Florence
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	CHB-D1 PR002 « Vérification Validation des méthodes d'analyses »
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	CHB - D1 PR003 « Gestion de la portée flexible »
<b>Période d'étude :</b>	Du : 16/03/17 au 29/03/17
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	29/03/17 (mise en route de l'automate)
<b>Autorisation de mise en service par :</b>	Claire PLASSART
<b>Période de réévaluation :</b>	NA
<b>Objet(s) de la réévaluation :</b>	NA



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



MAÎTRISE DES RISQUES : phase pré-analytique												
Activité	Danger	Effet	Cause	Criticité initiale				Point de maîtrise	Criticité résiduelle			
				F	G	D	T		F	G	D	T
<b>Prescription</b>	Prescripteur mal informé	Examens inappropriés	Modalités d'information sur les prestations du laboratoire non définies	4	2	3	<b>24</b>	Contrat clinico-biologique Prestation de conseil Guide des analyses	3	2	1	<b>6</b>
	Erreur ou absence d'identité du patient Absence de prescripteur Absence de renseignement clinique	Mauvaise prise en charge Retard de prise en charge	Prescription mal remplie Problème d'identification	4	2	3	<b>24</b>	Critères d'acceptation des demandes d'analyses définis Habilitation pré-analytique (Plan de formation - Evaluation réception des prélèvements CHB - G1-ENR026 - V05)	4	2	1	<b>8</b>
<b>Prélèvements</b>	Échantillon non conforme ou type de prélèvement non recommandé	Patient à reprélever Résultat erroné ou manque de sensibilité	Les modalités de réalisation d'un prélèvement ne sont pas formalisées et diffusées	4	3	2	<b>24</b>	Guide des analyses Contrat clinico-biologique Référénts pré-analytiques Critères d'acceptation des échantillons définis Habilitation pré-analytique (Plan de formation - Evaluation réception des prélèvements CHB - G1-ENR026 - V05) Prestation de conseil (commentaire sur le résultat)	3	3	1	<b>9</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



	Erreur d'identification	Patient à reprélever	Les modalités d'identification des échantillons ne sont pas formalisées et diffusées Identification manuelle des échantillons	3	3	3	<b>27</b>	Habilitation pré-analytique Critères d'acceptation des échantillons définis Utilisation des étiquettes <i>(Plan de formation - Evaluation réception des prélèvements CHB - G1-ENR026 - V05)</i>	2	3	2	<b>12</b>
	Non-respect des préconisations pré-analytiques	Patient à reprélever Résultats erronés Insatisfaction client	Les modalités de réalisation d'un prélèvement ne sont pas formalisées et diffusées	4	3	3	<b>36</b>	Habilitation préleveur (biologiste) <i>(Plan de formation -Evaluation Préleveur CHB - G1-ENR024 - V03)</i> Habilitation secrétaire <i>(Matrice des compétences - Plan de formation - Evaluation Poste Secrétariat CHB - G1-ENR028 - V05)</i> Préconisations pour le patient	2	3	3	<b>18</b>
	Incident en cours de prélèvement	Malaise, stress	Patient dépendant	2	4	1	<b>8</b>	Explication de l'examen Installation confortable Habilitation préleveur (biologiste) <i>(Plan de formation -Evaluation Préleveur CHB - G1-ENR024 - V03)</i>	2	3	1	<b>6</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



<b>Transport</b>	Non conforme	Conditions pré-analytiques non respectées	Pas d'organisation définie pour le transport des échantillons	3	2	2	<b>12</b>	<p>Plan de tournée défini (Formation des agents assurant la collecte et le transport des échantillons en dehors du CHB CHB - G1-ENR040 - V02)</p> <p>Mise à disposition de mallettes et pochettes réfrigérées.</p> <p>Conditions de transport validées</p> <p>Formation sur la Norme ADR pour les coursiers du CHB</p> <p>Critères d'acceptation des échantillons définis (Plan de formation - Evaluation réception des prélèvements CHB - G1-ENR026 - V05)</p>	2	2	1	<b>4</b>
<b>Enregistrement</b>	Erreur de saisie	Examen inapproprié Oubli d'un examen	Absence d'habilitation Absence de point de contrôle	4	3	3	<b>36</b>	<p>Habilitation secrétariat/pré-analytique (Matrice des compétences - Plan de formation - Evaluation Poste Secrétariat CHB - G1-ENR028 - V05)</p> <p>(Plan de formation - Evaluation réception des prélèvements CHB - G1-ENR026 - V05)</p> <p>Codes analyses sur feuille de demande</p> <p>Vérification de la demande au moment du rendu des résultats</p>	2	3	1	<b>6</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



<b>Conservation des échantillons</b>	Conservation dans de mauvaises conditions de température	Résultat erroné Patient à relever	Les modalités de traitement des échantillons ne sont pas formalisées et diffusées	3	2	2	<b>12</b>	Guide des analyses Procédure de conservation des échantillons ( <i>Conservation des échantillons CHB - C3-INS001 - V02</i> ) Suivi métrologique ( <i>Récapitulatif métrologie des enceintes thermostatées CHB - J2-ENR001 - V07</i> )	2	2	1	<b>4</b>
	Examen réalisé hors délai	Résultat erroné Patient à relever	Pas de personnel présent habilité pour réaliser la série hebdomadaire Prélèvement stocké au mauvais endroit	2	3	1	<b>6</b>	Etude de la stabilité des échantillons lors de la vérification de méthodes pour les trois pathogènes (Voir annexe 3) Planification d'une journée PCR hebdomadaire Liste des analyses attendues	1	3	1	<b>3</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



MAÎTRISE DES RISQUES : phase analytique												
Activité	Danger	Effet	Cause	Criticité initiale				Point de maîtrise	Criticité résiduelle			
				F	G	D	T		F	G	D	T
<b>Vérification des méthodes</b>	Travailler avec une méthode non valide	Pas de garantie de la performance de la technique Résultats rendus erronés Résultats discordants en fonction de l'automate utilisé	Méthode non vérifiée Modalité de vérification non définie Pas de déclaration d'aptitude Automates en miroir non comparés	1	3	3	<b>9</b>	Rédaction de la procédure de vérification de méthodes + formulaire de traçabilité + conclusion sur aptitude + vérification continue	1	1	1	<b>1</b>
<b>Réalisation des examens</b>	PSM Pipettes	Erreur de résultat : contamination inter-échantillons, erreur de volume (prise d'essai...), absence d'amplification	Matériels critiques non maîtrisés	3	3	3	<b>27</b>	Maintenance annuelle Suivi métrologique des pipettes critiques et PSM Pipettes dédiées à la PCR pour chaque étape	1	2	3	<b>6</b>
	Extracteur Thermocycleur			2	3	2	<b>12</b>	Contrat de maintenance Formation habilitation du personnel <i>(Utilisation de l'extracteur d'acides nucléiques CHB - D3 - MO013) (Utilisation de l'ABI 7500 CHB - D3 - MO023)</i>	1	2	2	<b>4</b>
	Identification des	Résultats mal	Erreur d'inattention	2	3	4	<b>24</b>	Formation habilitation du	1	3	4	<b>12</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



	puits	attribués	Plan de plaque mal réalisé					personnel (Utilisation de l'ABI 7500 CHB - D3 - MO023) Liste de travail Lecteur code à barre				
	Mauvaise conservation des réactifs ou consommables	Erreur de résultats, faux négatifs, faux positifs, série non valide	Enceinte thermostatée non raccordée à la métrologie Trop de cycles de congélation/décongélation	2	3	3	<b>18</b>	Suivi métrologique Passage de contrôles positifs négatifs et internes Formation et habilitation du personnel (Utilisation de l'ABI 7500 CHB - D3 - MO023) Aliquotage Gestion des péremptions sur Kalilab®	1	2	1	<b>2</b>
	Contamination des réactifs ou consommables	Faux positifs	Mauvaise manipulation des embouts de pipettes Pas de port de gants pour manipuler les réactifs Marche en avant non respectée Entretien des locaux non protocolisé	2	3	3	<b>18</b>	Passage de contrôles négatifs Formation et habilitation du personnel (Utilisation de l'ABI 7500 CHB - D3 - MO023) Locaux séparés en 3 pièces (Nettoyage et entretien CHB - L3-MO001 - V06)	1	3	2	<b>6</b>
	Utilisation du mauvais kit	Résultats erronés	Packaging non adapté Mauvaise organisation du rangement du réfrigérateur	2	3	3	<b>18</b>	Formation et habilitation du personnel (Utilisation de l'ABI 7500 CHB - D3 - MO023) Organisation des réfrigérateurs (signalétique)	1	3	3	<b>9</b>
	Contamination inter-échantillons	Risque de faux positifs	Fort positif dans la série Mauvaise	3	3	3	<b>27</b>	Formation habilitation du personnel (Utilisation de l'ABI 7500)	1	3	3	<b>9</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



			manipulation Mix contaminés					<i>CHB - D3 - MO023</i> Locaux divisés en trois secteurs distincts (préparation des mix, extraction et amplification) Principe de marche en avant Système d'amplification fermé Matériel dédié Entretien des locaux et équipement de protection PSM <i>(Nettoyage et entretien CHB - L3-MO001 - V06)</i>				
	Inhibiteurs de PCR	Risque de faux négatifs	Inhibiteurs de la Taq polymérase contenus dans les échantillons	2	3	3	<b>18</b>	Passage d'un contrôle interne pour chaque échantillon et pour le contrôle négatif	2	3	1	<b>6</b>
	Seuil de positivité (« threshold »)	Risque de rendre des faux positifs ou des faux négatifs	Seuil de positivité mal positionné	2	3	3	<b>18</b>	Formation habilitation du personnel <i>(Utilisation de l'ABI 7500 CHB - D3 - MO023)</i> Manuel d'utilisation	1	2	3	<b>6</b>
<b>Vérification technique et analytique</b>	Erreur de saisie des résultats	Résultats et conclusions incomplets voire erronés Prise en charge inappropriée du patient	Erreur d'inattention Erreur de cochage de la feuille de travail Absence de vérification de la saisie manuelle	4	3	3	<b>36</b>	Vérification des saisies manuelles dans le SIL (saisie en deux étapes distinctes) avant validation biologique Habilitation et formation du personnel Archivage et sauvegarde des résultats bruts	1	3	1	<b>3</b>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



<b>Evaluation externe de la qualité</b>	EEQ non réalisé ou effectué en retard	EEQ non exploitable	Pas de programmation pour la réalisation de l'EEQ	2	2	3	<b>12</b>	Programmation des EEQ sur Kalilab Saisie sur Kalilab des EEQ a posteriori pour exploitation ( <i>Traitement des EEQ CHB - D1-INS001 - V05</i> ) ( <i>Paramètres concernés par les EEQ CHB - D1-ENR002 - V06</i> )	2	2	1	<b>4</b>
---	---------------------------------------	---------------------	---	---	---	---	-----------	--	---	---	---	----------



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



MAÎTRISE DES RISQUES : phase post-analytique													
Activité	Danger	Effet	Cause	Criticité initiale				Point de maîtrise	Criticité résiduelle				
				F	G	D	T		F	G	D	T	
<b>Validation biologique, prestation de conseil</b>	Validation inadéquate	Rendu de résultats erronés Prise en charge inappropriée du patient	Personnel médical non habilité Erreur technique non détectée Erreur d'interprétation	2	3	3	<b>18</b>	Formation habilitation du personnel médical (Plan de formation-Evaluation – <i>Biologiste</i> CHB - G1-ENR031 - V02) Formation continue Documentation disponible (REMIC)	1	3	3	<b>9</b>	
<b>Transmission, communication des résultats</b>	Absence de communication des résultats	Retard prise en charge du patient Insatisfaction client	Problèmes informatiques Saisie incomplète	2	3	2	<b>12</b>	Serveur de résultats de back up Edition d'une liste de travail des examens en attente	1	3	2	<b>6</b>	
<b>Traitement administratif des dossiers, facturation</b>	Absence de facturation aux externes et établissements externes	Perte financière	Données administratives mal renseignées, pas d'extraction des données à facturer	4	2	2	<b>16</b>	Formation habilitation des secrétaires (Matrice des compétences - Plan de formation - Evaluation Poste <i>Secrétariat</i> CHB - G1-ENR028 - V05) Programmation d'une tâche pour l'extraction des données à facturer	2	2	1	<b>4</b>	



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



**ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE**

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

46 échantillons dont 6 prélèvements vaginaux et 40 échantillons de 1<sup>er</sup> jet d'urine.

<b>RÉPÉTABILITÉ: automate XXX</b> type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) Applicable ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>1</sup> )	Conclusion <sup>2</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : Non pertinent car il s'agit d'une méthode qualitative. Cependant le fournisseur a réalisé un test de répétabilité qui montre un coefficient de variation de Ct inférieur à 5%.

<b>FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE : automate XXX</b> type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, n° lot ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier)					
Échantillons	Passages (date)	Ct de <i>N. gonorrhoeae</i>	Aspect de la courbe	Ct du contrôle interne	Résultat
A (urine premier jet)	1 <sup>er</sup> passage le 06/07/17	36,67	Équivoque	23,82	Faiblement positif / Douteux
	2 <sup>nd</sup> passage le 11/07/17	Indéterminé	Absence de fluorescence	27,81	Négatif
	3 <sup>ème</sup> passage le 08/08/17	Indéterminé	Absence de fluorescence	26,08	Négatif
B (urine premier jet)	1 <sup>er</sup> passage le 08/08/17	35,89	Équivoque	22,26	Faiblement positif / Douteux
	2 <sup>nd</sup> passage le 16/08/17	Indéterminé	Absence de fluorescence	26,95	Négatif
	3 <sup>ème</sup> passage le 24/08/17	Indéterminé	Absence de fluorescence	31,47	Négatif

Argumentaire de la conclusion : Absence de reproductibilité des résultats douteux testés, ce type de résultats doit faire l'objet d'une repasse.

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

<sup>2</sup>Conforme/non conforme



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



**VARIABILITÉ INTER-OPÉRATEURS**

Applicable ; non applicable

<b>Opérateur évalué 1</b>	Essai sur site – résultats de la variabilité
<b>Opérateur évalué 2</b>	
...	

Argumentaire de la conclusion : Méthode automatisée. Pas d'appréciation subjective technicien-dépendante pour le rendu de résultat.

**JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) : automate XXX**

type et référence d'échantillon (nom du CIQE et numéro de lot)

Applicable ; non applicable (à justifier)

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Biais (%) /groupe de paires	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>3</sup>	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : Absence de CIQE

**EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)**

Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie (CTCB) : Bactériologie moléculaire : *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*

Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs

Échantillons	Nombre (N)	Cible (groupe de paires)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) limite	Automate 1			Conclusion <sup>5</sup>
					Valeur Labo	Biais (%) /groupe de paires	Biais (%) /moyenne générale	
Échantillon A	1	Positif pour <i>C. trachomatis</i> Positif pour <i>N. gonorrhoeae</i>	NA	NA	Positif pour <i>C. trachomatis</i> Positif pour <i>N. gonorrhoeae</i>	NA	NA	Conforme
Échantillon B	1	Positif pour <i>C. trachomatis</i> Positif pour <i>N. gonorrhoeae</i>	NA	NA	Positif pour <i>C. trachomatis</i> Positif pour <i>N. gonorrhoeae</i>	NA	NA	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes

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

<sup>4</sup> Conforme/non conforme

<sup>5</sup> Conforme/non conforme



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



**SENSIBILITÉ et SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE  
(étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)  
Applicable X ; non applicable (à justifier)**

<b>Vrais positifs</b>	
<b>Faux positifs</b>	
<b>Vrais négatifs</b>	
<b>Faux négatifs</b>	

Argumentaire de la conclusion :

Les données du fournisseur affichent une spécificité de 100% et une sensibilité de 100% pour une quantité de copies supérieure ou égale à  $10^4$  copies/ml. Dans une communication affichée du CHRU de Tours pour la RICA I 2013 traitant des performances de la PCR multiplexe Fast-Track Diagnostics Urethritis basic<sup>®</sup> : sensibilité de 86,7% et une spécificité de 100% pour *C. trachomatis* par rapport à la technique RealTime CT/NG Abbott<sup>®</sup> prise comme référence<sup>6</sup>.

<b>INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :</b> <b>Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul</b>		
	<b>Incertitudes calculées</b>	<b>Exigence de performances</b>
<b>Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :</b>		
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 1) :</b>		
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 2) :</b>		
<b>Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :</b>		

Argumentaire de la conclusion :

Méthode qualitative

<b>LIMITE DE DÉTECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/></b>	
<b>Limite de détection :</b>	$10^3$ copies/ml

Argumentaire de la conclusion :

Bibliographie fournisseur : le dossier de validation du fournisseur affiche une limite de détection à  $10^3$  copie/ml.

<sup>6</sup> Le Brun, C., Yzon, L., Mereghetti, L., Lanotte, P. Performances de la PCR multiplex Fast-Track Diagnostics Urethritis basic<sup>®</sup> pour la détection simultanée de Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium et Neisseria gonorrhoeae <http://prodinra.inra.fr/record/356688>



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



<b>COMPARAISON DE MÉTHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier)	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Extracteur : Qiagen® EZ1 Advanced XL Appareil de PCR en temps réel : Applied Biosystems® 7500 Real Time PCR System Trousse PCR triplexe Urethritis basic®, FTD (FTC-33.1-64)
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :</b>	Méthode précédente : Extracteur : Qiagen® EZ1 Advanced XL Thermocycleur : Applied Biosystems® 2720 Thermal cycler Kit de révélation : GenoQuick®CT Hain Lifescience
<b>Nombre de mesures :</b>	46 (40 prélèvements de 1 <sup>er</sup> jet d'urine + 6 prélèvements vaginaux)
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	NA
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	Comparaison des résultats positifs et négatifs entre les deux méthodes et analyse des discordances. Voir annexe 1.
<b>Équation de la droite de régression :</b>	NA
<b>Diagramme des différences et/ou des rapports :</b>	NA

Argumentaire de la conclusion :

Sur les 46 échantillons analysés par les 2 méthodes, 4 résultats discordants, tous positifs avec l'ancienne méthode et négatifs avec la nouvelle méthode. Parmi ces 4 échantillons, 2 échantillons ne sont plus exploitables. Les 2 autres ont été envoyés au laboratoire Cerba (technique de PCR en temps réel Abbott®) les résultats sont négatifs. Il semble donc s'agir de contaminations de l'ancienne méthode (révélation en point final en système ouvert). Les deux méthodes semblent avoir des sensibilités comparables et la nouvelle méthode paraît moins sujette aux contaminations. Résultats en Annexe 1.

<b>ÉTENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)</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 checked="" type="checkbox"/>		
<b>Limite de détection :</b>		
<b>Limite de quantification :</b>		
<b>Limite supérieure de linéarité :</b>		

Argumentaire de la conclusion : Non pertinent car méthode qualitative.

<b>INTERFÉRENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</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)	
<b>Hémolyse</b>	
<b>Turbidité</b>	
<b>Bilirubine, ictère</b>	
<b>Médicaments</b>	
...	

Argumentaire de la conclusion : Absence d'interférence mentionnée par le fabricant.



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



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

<b>Inter-échantillons pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, <math>\beta</math>HCG, ...) :</b>	4 échantillons négatifs et 4 échantillons positifs passés en alternant échantillons négatifs et positifs dans une série. Tous les échantillons attendus négatifs sont négatifs. Voir annexe 2.
<b>Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :</b>	NA

Argumentaire de la conclusion :

Il n'y a pas de contamination inter-échantillons sur les essais réalisés. Résultats en Annexe 2.

**ROBUSTESSE et STABILITÉ des RÉACTIFS  
(étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)**

<b>Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)</b>	NA
<b>Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...</b>	Bibliographie fournisseur (dossier de validation) Analyse des risques

Argumentaire de la conclusion :

Les réactifs utilisés sont décongelés extemporanément puis conservés selon les recommandations fournisseurs, au congélateur. Le mélange reconstitué est validé par le passage des contrôles positifs, négatifs et internes (QUAMIC 2017).

**INTERVALLES de RÉFÉRENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)  
Applicable  ; non applicable**

<b>Valeurs de référence</b>	NA
-----------------------------	----

Argumentaire de la conclusion :

Aucun des trois germes n'est présent dans la population saine.

**DÉCLARATION d'APTITUDE**

**Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du 29/03/2017**

**Autorisée par : Claire PLASSART  
Signature**



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



Annexe 1 : Comparaison de méthodes

Objectif : Montrer que la nouvelle méthode donne des résultats comparables à l'ancienne.

Méthode : Passage de 46 échantillons positifs et négatifs sur les deux méthodes et analyse des résultats discordants (en gris).

Date	Numéro d'échantillon	Nature du prélèvement	Ancienne méthode (Hain Lifescience)	Nouvelle méthode (FTD)
16/03/2017	1	urine	-	-
	2	endocol	+	-
	3	urine	-	-
	4	urine	+	+
	5	urine	-	-
	6	urine	+	-
	7	urine	+	-
	8	urine	+	-
	9	endocol	+	+
	10	urine	+	+
	11	urine	-	-
	12	urine	+	+
	13	urine	-	-
	14	urine	-	-
	15	urine	-	-
	16	urine	+	+
	17	urine	-	-
	18	urine	+	+
	19	urine	-	-
	20	urine	+	+
	21	urine	-	-
	22	urine	+	+
	23	urine	-	-
22/03/2017	24	endocol	-	-
	25	urine	-	-
	26	urine	+	+
	27	urine	-	-
	28	urine	-	-
	29	urine	-	-
	30	urine	-	-
	31	urine	-	-
	32	urine	-	-
	33	urine	-	-
	34	endocol	-	-
	35	endocol	+	+
	36	urine	-	-
	37	urine	-	-
	38	urine	+	+
	39	urine	+	+
	40	urine	-	-
	41	urine	-	-
	42	urine	-	-
	43	urine	-	-
	44	urine	-	-
	45	endocol	-	-
	46	urine	+	+



LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



Sur les 46 échantillons analysés sur les 2 méthodes, 4 résultats discordants :

N°2 : résultat Hain Lifescience : positif - résultat FTD : négatif

N°6 : résultat Hain Lifescience : positif - résultat FTD : négatif

N°7 : résultat Hain Lifescience : positif - résultat FTD : négatif

N°8 : résultat Hain Lifescience : positif - résultat FTD : négatif

Parmi ces 4 échantillons, 2 échantillons ne sont plus exploitables : n°2 et n°7

Les 2 autres, n°6 et n°8, ont été envoyés à Cerba qui nous retourne des résultats négatifs en accord avec notre nouvelle méthode.





LABM CH BEAUVAIS  
Avenue Léon Blum  
BP 40319  
60021 BEAUVAIS  
Cedex

**Rapport de vérification analytique  
en portée A d'une méthode de  
biologie médicale**

Ref : CHB - D1-ENR001 - V05  
Version : 05  
Applicable le : 01-02-2016



Annexe 3 : Test de conservation des échantillons avant réalisation de l'analyse

Objectif : Montrer que les conditions de conservation des échantillons en pré-analytique n'entraînent pas de résultats faux négatifs par dégradation de l'ADN bactérien.

Méthode : Passage de 4 échantillons positifs une semaine après leur premier passage. Entre les deux analyses, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à +4°C.

Pour *C. trachomatis* :

Date de prélèvement	Numéro d'échantillon	Résultat lors du 1 <sup>er</sup> passage le 22/03/2017	Résultat lors du 2 <sup>nd</sup> passage le 29/03/2017
15/03/2017	CTpos1	+	+
18/03/2017	CTpos2	+	+
20/03/2017	CTpos3	+	+
20/03/2017	CTpos4	+	+

Tous les échantillons sont encore positifs lors du 2<sup>nd</sup> passage, il semble que les conditions de conservation pendant au moins une semaine n'entraînent pas de résultats faux négatifs.

Pour *N. gonorrhoeae* :

Date de prélèvement	Numéro d'échantillon	Résultat lors du 1 <sup>er</sup> passage le 16/11/2017	Résultat lors du 2 <sup>nd</sup> passage le 21/11/2017
14/11/2017	NGpos1	+	+

Pour *M. genitalium* :

Date de prélèvement	Numéro d'échantillon	Résultat lors du 1 <sup>er</sup> passage le 31/10/2017	Résultat lors du 2 <sup>nd</sup> passage le 07/11/2017
30/10/2017	MGpos1	+	+

## Bibliographie

1. OMS - Stratégie mondiale du secteur de la santé contre les IST 2016-2021 vers l'élimination des IST [Internet]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250242/1/WHO-RHR-16.09-fre.pdf>
2. Recommandations urétrites cervicites HAS oct2015 [Internet]. Available from: [http://www.esculape.com/uronephro/uretritres\\_cervicites-HAS2015.pdf](http://www.esculape.com/uronephro/uretritres_cervicites-HAS2015.pdf)
3. Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189 : Décembre 2012 (AFNOR).
4. Guidance on Chlamydia control in Europe - ECDC 2015 [Internet]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/chlamydia-control-europe-guidance.pdf>
5. Bulletins des réseaux de surveillance des IST - INVS [Internet]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infections-sexuellement-transmissibles-IST/Bulletins-des-reseaux-de-surveillance-des-IST>
6. Bébéar C, de Barbeyrac B. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Infect. 2009 Jan;15(1):4–10.
7. Peipert JF. Genital Chlamydial Infections. N Engl J Med. 2003 Dec 18;349(25):2424–30.
8. Meyer T. Diagnostic Procedures to Detect *Chlamydia trachomatis* Infections. Microorganisms. 2016 Aug 5;4(3).
9. Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2016 Jun;14(6):385–400.
10. de Barbeyrac B, Bébéar C. Histoire naturelle des infections à *Chlamydia* physiopathologie des infections à *Chlamydia*: Conséquences diagnostiques et thérapeutiques. Arch Pédiatrie. 2005 Apr 1;12:S26–31.
11. Synthèse *Chlamydia trachomatis* - HAS 2010 [Internet]. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-02/synthese\\_chlamydia\\_trachomatis.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-02/synthese_chlamydia_trachomatis.pdf)
12. Martin DH, Nsuami M, Schachter J, Hook EW, Ferrero D, Quinn TC, et al. Use of Multiple Nucleic Acid Amplification Tests To Define the Infected-Patient “Gold Standard” in Clinical Trials of New Diagnostic Tests for *Chlamydia trachomatis* Infections. J Clin Microbiol. 2004 Jan 10;42(10):4749–58.
13. Jaschek G, Gaydos CA, Welsh LE, Quinn TC. Direct detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay. J Clin Microbiol. 1993 Jan 5;31(5):1209–12.

14. Toye B, Peeling RW, Jessamine P, Claman P, Gemmill I. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men and women by PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan 6;34(6):1396–400.
15. Recommandations diagnostiques et thérapeutiques pour les maladies sexuellement transmissibles - Infection à *Chlamydia trachomatis* - Société Française de Dermatologie février 2016 [Internet]. Available from: <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/infection-a-chlamydia-trachomatis-cd5ea803a077893e85696ae3d93bb2c7.pdf>
16. Goulet V, Sednaoui P, Laporte A, Billy C, Desenclos J-C. The number of gonococcal infections identified by the RENAGO network is increasing. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2000 Jan;5(1):2–5.
17. La Ruche G, Le Strat Y, Fromage M, Berçot B, Goubard A, de Barbeyrac B, et al. Incidence of gonococcal and chlamydial infections and coverage of two laboratory surveillance networks, France, 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2015 Aug 13;20(32):6–15.
18. Evolution des résistances du gonocoque aux antibiotiques en France 2001-2012 [Internet]. Available from: [http://opac.invs.sante.fr/doc\\_num.php?explnum\\_id=9352](http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=9352)
19. Serra-Pladevall J, Caballero E, Roig G, Juvé R, Barbera MJ, Andreu A. Comparison between conventional culture and NAATs for the microbiological diagnosis in gonococcal infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Dec;83(4):341–3.
20. Evaluation des tests d'amplification des acides nucléiques recherchant *Neisseria gonorrhoeae* - HAS nov2015 [Internet]. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-12/taan\\_gonocoques\\_argumentaire.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-12/taan_gonocoques_argumentaire.pdf)
21. Recommandations diagnostiques et thérapeutiques pour les maladies sexuellement transmissibles - Gonococcie - Société Française de Dermatologie février 2016 [Internet]. Available from: <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/gonococcie-8e5167e17549b4912a1f1a4b3011eda7.pdf>
22. Urétrites et cervicites non compliquées : stratégie diagnostique et thérapeutique de prise en charge - HAS oct2015 [Internet]. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-11/2015\\_11\\_05\\_rapport\\_elaboration.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-11/2015_11_05_rapport_elaboration.pdf)
23. Pereyre S, Laurier Nadalié C, Bébéar C, Arfeuille C, Beby-Defaux A, Berçot B, et al. *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in France: a point prevalence study in people screened for sexually transmitted diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Feb;23(2):122.e1-122.e7.
24. Manhart LE, Kay N. *Mycoplasma genitalium* : Is It a Sexually Transmitted Pathogen? *Curr Infect Dis Rep.* 2010 Jul;12(4):306–13.
25. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015 Aug 1;61(3):418–26.
26. Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic non gonococcal urethritis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2001 Apr 1;32(7):995–1003.

27. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* : from chrysalis to multicolored butterfly. Clin Microbiol Rev. 2011 Jul;24(3):498–514.
28. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. Sex Transm Infect. 2003 Aug;79(4):318–9.
29. Bébéar CM, de Barbeyrac B, Pereyre S, Renaudin H, Clerc M, Bébéar C. Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Aug;14(8):801–5.
30. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006 Apr 1;27(2):95–125.
31. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):7276–80.
32. Relative Quantitation Using Comparative CT Getting Started Guide [Internet]. Available from:  
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.83765.file.dat/relative-quant-ct.pdf>
33. Principes de la PCRq [Internet]. Available from:  
[https://www.institutcochin.fr/core\\_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative/files/principes-de-la-PCRq.pdf](https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative/files/principes-de-la-PCRq.pdf)
34. Document COFRAC : SH-REF-08 [Internet]. Available from:  
<https://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
35. Document COFRAC : SH-GTA-04 [Internet]. Available from:  
<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
36. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods - NATA oct2013 [Internet]. Available from:  
[https://www.nata.com.au/nata/phocadownload/publications/Guidance\\_information/tech-notes-information-papers/technical\\_note\\_17.pdf](https://www.nata.com.au/nata/phocadownload/publications/Guidance_information/tech-notes-information-papers/technical_note_17.pdf)
37. Document COFRAC : SH-GTA-06 [Internet]. Available from:  
<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
38. Contrôle interne de qualité - SFBC [Internet]. Available from:  
[http://www.jle.com/download/abc-288095-contrôle\\_interne\\_de\\_qualité--Wceq2n8AAQEAAEmckYkAAAAC-a.pdf](http://www.jle.com/download/abc-288095-contrôle_interne_de_qualité--Wceq2n8AAQEAAEmckYkAAAAC-a.pdf)
39. Westgard JO, Groth T. Design and evaluation of statistical control procedures: applications of a computer 'quality control simulator' program. Clin Chem. 1981 Sep 1;27(9):1536–45.
40. Document COFRAC : SH-GTA-01 [Internet]. Available from:  
<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-01>
41. Audit interne dans un laboratoire de biologie médicale quels moyens de maîtrise pour un processus d'audit efficace - ABC [Internet]. Available from:  
<http://www.jle.com/download/abc-298190->

audit\_interne\_dans\_un\_laboratoire\_de\_biologie\_medicale\_quels\_moyens\_de\_maitrise\_pour\_un\_processus\_daudit\_efficace\_--WVduT38AAQEAAALyo6IAAAAK-a.pdf

42. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse - SFBC [Internet]. Available from: [http://www.jle.com/download/abc-288099-verification\\_validation\\_des\\_performances\\_dune\\_methode\\_danalyse--WVd44n8AAQEAAACIZZdUAAAAA-a.pdf](http://www.jle.com/download/abc-288099-verification_validation_des_performances_dune_methode_danalyse--WVd44n8AAQEAAACIZZdUAAAAA-a.pdf)
43. Le Brun, C., Yzon, L., Mereghetti, L., Lanotte, P. (2013). Performances de la PCR multiplex Fast-Track Diagnostics Urethritis basic® pour la détection simultanée de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* et *Neisseria gonorrhoeae*. Presented at 33. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI 2013), Paris, FRA (2013-11-21 - 2013-11-22). <http://prodinra.inra.fr/record/356688>.
44. Moncada J, Donegan E, Schachter J. Evaluation of CDC - Recommended approaches for confirmatory testing of positive *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid amplification test results. J Clin Microbiol. 2008 May;46(5):1614-9.
45. Védý S, Valois A, Budzilawski D, Perez P, Puyhardy J-M. Bilan d'utilisation d'une PCR «maison» qualitative : une validation acceptable en regard de la norme NF EN ISO 15189 ? Ann Biol Clin (Paris). 2013 May 1;71(3):363-72.

UNIVERSITE PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. de Pharmacie

Année universitaire 2017/2018

MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE

(Tenant lieu de Thèse en vue du diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)

Nom : BOCHEREAU

Prénom : Flora

Titre du mémoire : Vérification en portée A d'une méthode de PCR en temps réel multiplexe : *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*

Mots clés : vérification de méthode, norme ISO 15189, PCR temps réel, vérification continue

---

**Résumé :** En mars 2017, au laboratoire du centre hospitalier de Beauvais, un appareil de PCR en temps réel est installé. Ce travail décrit la vérification de méthode, en portée A de la trousse de PCR triplexe en temps réel, Urethritis basic®, FTD, pour la détection qualitative de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*. Pour répondre à la norme NF 15189, une analyse des risques ainsi que la vérification de certains critères de performance ont été réalisées sur site. La fidélité intermédiaire pour *N. gonorrhoeae* a été évaluée sur 2 échantillons donnant des résultats douteux au premier passage. Lors des passages suivants les résultats sont négatifs. La comparaison avec l'ancienne méthode en point final (GenoQuick®CT, Hain Lifescience) pour la recherche de *C. trachomatis* a été réalisée sur 46 échantillons. Quatre résultats sont discordants (tous positifs avec l'ancienne méthode et négatifs avec la nouvelle). L'exactitude est vérifiée grâce à deux EEQ pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* : les résultats sont conformes. Nos essais de contamination inter-échantillons en alternant échantillons positifs et négatifs ont permis de montrer l'absence de contamination. Enfin, nous avons mis en place une vérification continue à l'aide de représentations de Levey-Jennings construites à partir des « Cycles threshold » des contrôles. Ce travail nous a permis de conclure à l'aptitude de la méthode tout en confirmant l'intérêt de contrôler les échantillons trouvés douteux pour le gonocoque. Il propose également un outil de surveillance continue des performances.

---

Membres du jury

Président : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU d'Amiens

Assesseurs : Madame le Professeur CASTELAIN Sandrine, CHU d'Amiens

Madame le Docteur PLASSART Claire, CH de Beauvais

Madame le Docteur SERAPHIN Hélène, CH de Beauvais

Madame le Docteur DECROIX Véronique, CHU d'Amiens