

PROTOCOLE DE L'EVALUATION DE L'EXACTITUDE DES REACTIFS DE CHOLESTEROL-HDL EN PHASE HOMOGENE

Version du 10 février 2005

OBJECTIFS : évaluer l'exactitude des réactifs de dosage direct du cholestérol-HDL, en raison de la diversité des procédés de standardisation des méthodes récentes en phase homogène.

I- DONNEES A COMMUNIQUER PAR LES INDUSTRIELS CONCERNANT:

- Les adaptations réalisées sur automates avec les études ou les références des études qui ont permis leur validation.
- L'étude de stabilité du réactif (avant et après ouverture).
- La nature des échantillons autorisés (sérum, plasma...) et leurs conditions de conservation: durée et température (4°C , - 20°C...).
- Le mode de standardisation du réactif : nature de l'étalon primaire utilisé pour standardiser le calibrant.
- L'origine (animale, humaine), la nature (sérum, plasma..) le conditionnement et la composition du ou des calibrateurs et des contrôles.

II- ETUDE DE L'EXACTITUDE

1) La réalisation du panel

Les sérums proviennent de sujets à jeun depuis 12 heures. Ces sujets sont consultants ou hospitalisés dans le service d'Endocrinologie-Métabolisme de Monsieur Turpin de l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière. Ils sont prélevés entre 8 h et 10 heures du matin sur tube vacutainer BD SST en verre référence 367783 (avec séparateur sérum, sans additif). Les tubes bouchés sont centrifugés à 4000 g à 10°C pendant 10 min. Les sérums sont immédiatement congelés à -80°C après centrifugation et décantation.

La répartition des sérums en 7 pools est ainsi réalisée :

1^{er} pool : entre 1,29 et 1,10 g/L de C-HDL ; 2^{ème} pool : entre 1,09 et 0,91g/L ; 3^{ème} : entre 0,90 et 0,81g/L ; le 4^{ème} entre 0,80 et 0,53 g/L ; 5^{ème} entre 0,52 et 0,42 g/L ; 6^{ème} entre 0,41 et 0,36g/L et enfin le 7^{ème} entre 0,35 et 0,07 g/l.

Lorsque le volume nécessaire pour constituer un pool est réuni, les échantillons sont décongelés (une nuit à 4°C). Le lendemain, ils sont regroupés par pools, mélangés puis aliquotés sous un volume de 0,5 ml et à nouveau immédiatement congelés à -80°C .

L'envoi aux laboratoires experts n'est effectué qu'après validation technique du protocole de familiarisation et réception correcte des kits pour le dosage des échantillons. Le transport des échantillons est effectué à -80°C. Les échantillons peuvent être gardés à -80°C de préférence, ou à -20°C (une semaine au maximum), puis une nuit à 4°C la veille du dosage par le laboratoire expert.

Les dosages au laboratoire CDC sont effectués dans les mêmes conditions, et sur des échantillons issus des mêmes 7 pools.

Un aliquot de chaque échantillon est envoyé par Mr R. Couderc au CDC pour être dosé dans un des laboratoires référents.

2) La réalisation technique de l'étude d'exactitude

Méthode de référence : méthode DCM (Designated Comparison Method) du Centers for Disease Control and Prevention (CDC), actuellement reconnue comme méthode de comparaison. (elle se réalise en deux étapes : précipitation à l'héparine manganèse, et quantification par la méthode d'Abell-Kendall). Les échantillons seront dosés dans un laboratoire référent du CDC.

Modalités de dosage :

- Le choix des adaptations retenues pour l'étude a été réalisé parmi celles proposées par les industriels (3 au maximum pour un réactif) en privilégiant des automates les plus utilisés et des versions les plus récentes mises sur le marché.
- Chaque adaptation est évaluée sur 1 seul site.
- Les échantillons (7) de sérums congelés (-80°C) ayant des concentrations de C-HDL réparties de façon homogène entre 0,20 à 1,20 g/L, sont dosés en quadruplet.
- Ces échantillons proviennent d'un pool de sérums obtenus auprès de donneurs sélectionnés au laboratoire des lipides du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière. (voir paragraphe 1, réalisation du panel)

Protocole de « familiarisation » : (fiche n°1 en annexe)

Ce protocole a été établi pour un réactif qui n'est pas utilisé habituellement par le laboratoire expert désigné ou pour un réactif utilisé quotidiennement mais selon un protocole qui ne suit pas strictement l'adaptation proposée par l'industriel.

- Au préalable, le laboratoire expert doit s'assurer de la compréhension et de la faisabilité de l'adaptation sur l'automate d'après la fiche technique fournie. Dans le cas contraire, il doit contacter le responsable technique du dosage chez l'industriel fournissant l'adaptation.
- Au minimum 15 jours avant l'étude technique, le laboratoire expert vérifie que les kits reçus sont complets avec leurs étalons et contrôles en quantité suffisante pour ne pas être limité (attention certaines adaptations consomment beaucoup du premier réactif).
- les numéros de lots et les dates de péremption des réactifs, étalons et contrôles sont soigneusement notés.
- Si le conditionnement des réactifs R1 et R2, des calibrateurs et des contrôles ne permettent pas d'effectuer le protocole de dosage avec des réactifs non entamés, il faut prévoir un kit neuf pour le dosage des échantillons, de préférence du même lot.
- Noter les dates de reconstitution, de reconditionnement, de péremption et les conditions de conservation (température) des réactifs R1 et R2.
- **La programmation de l'adaptation doit être strictement conforme au document fourni par l'industriel.**
- Pour vérifier l'adaptation : doser 3 jours de suite **les contrôles fournis avec le kit**. Si des résultats sont hors des fourchettes, contacter le responsable technique.
- Sélectionner 3 sérums à haut niveaux, moyen et bas (sérums datant de moins de 48h, décantés et conservés à 4-8°C en tubes bouchés) et faire un essai de répétabilité (10 passages le même jour) et un essai de reproductibilité pendant 4 jours de suite. En cas de résultats discordants avec ceux indiqués sur la notice, contacter le responsable technique.

Ces deux étapes (passage des contrôles et des essais de répétabilité-reproductibilité) peuvent être regroupées.

Conditions de transport et de conservation des échantillons : (fiche n°2 en annexe)

- Le laboratoire expert indique le nom et les coordonnées de la personne responsable de la réception et du dosage des échantillons,
- La personne responsable note le jour de la réception des échantillons,
- Elle vérifie le nombre d'échantillons et leur bon état de conservation (état de congélation).
- Ceux-ci seront gardés à -80°C, éventuellement à -20°C moins d'une semaine, jusqu'au moment de la décongélation pour le dosage.

Conditions de dosage des 7 échantillons : (fiche n°3 en annexe)

- Les échantillons sont tous décongelés de la même façon : la veille en les plaçant entre 4°C et 8°C.
- Les dosages doivent être réalisés le plus rapidement possible dans le délai imparti pour les meilleures conditions de conservation.
- **La programmation de l'adaptation doit être strictement conforme au document fourni par l'industriel.**
- Au moment de l'analyse : les échantillons sont homogénéisés (5 fois par retournement), puis centrifugés 10 minutes à 4000 g à une température de 10°C.—ne pas utiliser de « Vortex ». Dans le cas d'une présence de fibrine les échantillons doivent être décantés.
Ils sont tous analysés selon le protocole suivant :
 1. arrêt complet de l'automate,
 2. redémarrage,
 3. étalonnage et passage des contrôles,
 4. les 7 échantillons sont dosés en quadruplet en déplaçant trois fois les 7 godets : soit le 1 sera à nouveau dosé en 8,15 et 22 ; le 2 en 9, 16 et 23 ; le 3 en 10,17 et 24 ; le 4 en 11, 18 et 25 ; enfin le 7 en 14, 21 et 28. Cette série est encadrée par un contrôle dosé 3 fois au début et à la fin de la série.
- Les résultats des échantillons et des contrôles doivent être communiqués sur la fiche fournie à cet effet, dûment renseignée.

3) Etude statistique

Pour chaque échantillon , la moyenne des concentrations obtenues par la technique testée sera comparée à la moyenne des concentrations obtenues par la technique de référence par le test t de Student. L'étude statistique permettra de détecter des écarts anormaux à la technique testée, un défaut de linéarité, un biais proportionnel ainsi qu'un biais constant.

4) Critères d'évaluation

Les critères d'évaluation sont ceux déterminés par les valeurs du CDC et le plus souvent adoptées ou revendiquées par les fabricants . Selon les normes NCEP-ATPIII : le CV de précision recommandé est $\leq 4\%$ pour des concentrations de C-HDL $\geq 0,42$ g/L (1,09 mmol/L) et une déviation standard $\leq 0,017$ g/l (0,044 mmol/L) pour des concentrations de C-HDL $< 0,42$ g/L. L'erreur totale retenue par le NCEP est $\leq 13\%$ et le biais doit être $< 5\%$.

L'utilisation de sérums congelés peut avoir un effet matrice plus ou moins important selon les techniques (cf publications).Les écarts entre échantillons frais et congelés retrouvés dans la littérature sont très inférieurs à l'erreur totale acceptable selon le NCEP (13%).Cependant il pourra être tenu compte de cette variabilité (environ 1%) dans la discussion des résultats limites

En cas de valeurs situées en dehors des critères d'évaluation pour un réactif, il s'agira dans un premier temps de définir l'origine de la problématique : standardisation, adaptation sur un automate , principe de la méthode analytique. Des compléments d'information ou d'évaluation pourront alors être demandés aux industriels.

4) Evaluation des notices

Une évaluation réglementaire ainsi qu'une évaluation scientifique des notices seront effectuées. En fonction des résultats de l'évaluation des notices et du contrôle analytique , il est possible que des ajouts de mention spécifiques soient demandés dans les notices des réactifs. Cela permettra de confirmer ou non la nécessité d'élaborer un cahier des charges des notices des réactifs de dosage du C-HDL, en respectant les exigences de la Directive 98/79/CE.

IV ADAPTATIONS RETENUES.

Chaque industriel est informé des adaptations retenues pour son réactif.

III- LISTE DES EXPERTS

- **Docteur Rémy COUDERC Coordonnateur** , Hôpital d'enfants Armand Trousseau, Laboratoire de Biochimie, Paris.
- **Professeur Marcel ASSICOT**, Institut Gustave Roussy, Laboratoire de Biochimie des tumeurs neuro-endocrines, Villejuif.
- **Docteur Pascale BAYER**, CHU-Hôpital de l'Archet, Laboratoire de Biochimie, Nice
- **Docteur Isabel BEUCLER**, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Biochimie médicale, Paris.
- **Professeur Phillipe GILLERY**, CHU-Hôpital Robert Debré, Laboratoire central de Biochimie, Reims.
- **Professeur Jean-François MORIN** , C.H.U.-Hôpital Augustin Morvan Service de médecine nucléaire et de biophysique, Brest.
- **Docteur Agnès SASSOLAS**, Hôpital Neurologique et Neurochirurgical Pierre-Wertheimer, Service de Biochimie, Lyon.
- **Docteur Nathalie SCHNEIDER**, CHU-Hôpital Robert Debré, Laboratoire central de Biochimie, Reims.
- Afssaps-DEDIM - UECM DIV

FICHE n°1 : MANIPULATION POUR L'EVALUATION COMPARATIVE DES REACTIFS DE DOSAGE DIRECT DU C-HDL

Protocole de familiarisation

(dans le cas d'adaptation d'un réactif non utilisé par le laboratoire expert ou d'un réactif utilisé avec un protocole différent de celui du fabricant)

Nom du laboratoire :..... Nom de l'expert :.....

Nom du réactif :..... Nom de l'automate :.....

- S'assurer de la compréhension et de la faisabilité de l'adaptation sur l'automate ; sinon contacter le responsable technique, noter le problème et la rectification effectuée :
- Au minimum 15 jours avant l'étude technique, vérifier la bonne réception des kits complets avec leurs étalons et contrôles en quantité suffisante pour ne pas être limité .
- Noter les numéros de lots et les dates de péremption des réactifs, étalons et contrôles sur la fiche de résultats.
- Si le kit ne présente qu'un conditionnement pour R1 et R2, réclamer un deuxième kit pour le dosage des 7 échantillons.
- Noter les dates de reconstitution, de péremption et les conditions de conservation (température) des réactifs R1 et R2. Effectuer la même opération pour les calibrateurs et contrôles (cf. tableau).
- La programmation de l'adaptation doit être strictement conforme au document fourni par l'industriel.
- Pour vérifier la validation de l'adaptation : doser 3 jours de suite le ou les contrôles fournis avec le kit (cf. tableau). En cas de résultats hors fourchettes, contacter le responsable technique, noter les problèmes et les rectifications :
- Sélectionner 3 sérums frais à niveaux haut, moyen et bas (décantés- <48 h de conservation à 4-8°C-tubes bouchés) ; faire des essais de répétabilité (10 passages) et de reproductibilité 4 jours de suite (cf. tableau). En cas de résultats discordants avec ceux de la notice contacter le responsable technique, noter les problèmes et corrections effectuées :.....

Ces 2 étapes peuvent être regroupées (contrôles et répétabilité-reproductibilité)

TABLEAUX DES RESULTATS (unités :.....) DU PROTOCOLE DE FAMILIARISATION

Nom du laboratoire :..... Nom de l'expert :.....
 Nom du réactif :..... Nom de l'automate :.....
 Numéro du lot :..... Date de péremption :.....

Dates de :	R1 n° lot :	R2 n° lot :	Calibrateurs n° lot :	Contrôles n° lot :
Reconstitution				
Reconditionnement				
Péremption				
Température de conservation				

VALIDATION DE L'ADAPTATION SUR LES CONTRÔLES DU KIT

Dates de dosage :.....

Unités (.....)	J1	J2	J3
Contrôle 1			
Valeur cible. :.....			
Contrôle 2			
Valeur cible:.....			
Contrôle 3			
Valeur cible:.....			
Contrôle 4			
Valeur cible:.....			

REPETABILITE-REPRODUCTIBILITE SUR LES SERUMS DU LABORATOIRE

Dates de dosage :

REPETABILITE J1

Unités :	Taux bas	Taux moyen	Taux élevé
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
moyenne écart type CV%			

Commentaires :

REPRODUCTIBILITE J1-J4

Unités :	bas	moyen	haut
J1			
J2			
J3			
J4			
moyenne écart type CV%			

Commentaires :

Date et signature :

A faxer le jour du dosage au : 01 55 87 42 62

Ou à envoyer par email le jour du dosage à : francoise.CHEVENNE@afssaps.sante.fr

FICHE n°2 : CONDITIONS DE TRANSPORT ET DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS C-HDL

- Le laboratoire expert communique à l'Afssaps, le nom et les coordonnées de la personne responsable de la réception et du dosage des échantillons

La personne responsable :

- note le jour de la réception des échantillons,
- vérifie le nombre d'échantillons (7) et leur bon état de conservation,
- stocke les échantillons à -80°C ou éventuellement à -20°C moins d'une semaine, jusqu'au moment de la décongélation pour le dosage.

Nom et adresse du laboratoire:	
Nom de la personne responsable	
Téléphone Fax Email	
Date de réception des échantillons :	
Nombre d'échantillons reçus :	
Etat de conservation des échantillons à la réception : (état de congélation)	
Etat de conservation des échantillons à la décongélation: limpidité, présence de fibrine...	

Commentaires :

Date et signature :

à l'Afssaps , veuillez contacter :Françoise Chevenne
tel :01 55 87 42 67
fax :01 55 87 42 62
email :francoise.chevenne@afssaps.sante.fr

FICHE n°3 : MANIPULATION POUR L'EVALUATION COMPARATIVE DES REACTIFS DE DOSAGE DIRECT DU C-HDL

Conditions de dosage des 7 échantillons

Nom du laboratoire : Nom de l'expert :
Nom du réactif : Nom de l'automate :

ATTENTION :

- 1) Les dosages devront être réalisés le plus rapidement possible dans le délai imparti pour les meilleures conditions de conservation.
 - 2) La programmation de l'adaptation doit être strictement conforme au document fourni par l'industriel.
- La veille du dosage mettre tous les échantillons à décongeler entre 4°C et 8°C.
 - Au moment de l'analyse, homogénéiser (5 fois par retournement) puis centrifuger 10 min à 4000 g à 10°C -ne pas utiliser de Vortex-; si présence de fibrine , décanter au préalable.
 - Protocole pour l'analyse des échantillons * :
 1. arrêt complet de l'automate (courant coupé),
 2. redémarrage,
 3. étalonnage, et passage des contrôles
 4. dosage des 7 échantillons en quadruplet et en déplaçant trois fois les 7 godets : soit le 1 sera à nouveau dosé en 8, 15 et 22 ; le 2 sera à nouveau dosé en 9 , 16 et 23 ; le 3 en 10, 17et 24 ; le 4 en 11 ,18 et 25 ; le 5 en 12, 19 et 26 ; le 6 en 13, 20 et 27 et enfin le 7 en 14 , 21 et 28.
 5. passage d'un contrôle en triple au début et à la fin de la série des échantillons.
 - Les résultats des échantillons et des contrôles d'une série devront être communiqués en même temps (cf. tableau).
- * Même conditions de dosage qu'il s'agisse de la technique de routine du laboratoire ou d'une adaptation réalisée pour l'évaluation.

TABLEAU DES RESULTATS DES 7 ECHANTILLONS C-HDL.

Dates de dosage.....

Nom du laboratoire :..... Nom de l'expert :.....
 Nom du réactif :..... Nom de l'automate :.....
 Numéro du lot :..... Date de péremption :.....
 Principe du dosage :.....

Dates de :	R1 n° lot :	R2 n° lot :
Reconstitution		
Reconditionnement		
Péremption		
Température de conservation		

Dates de :	Calibrateur n° lot : Valeur : Unités :	Calibrateur n° lot : Valeur : Unités :	Calibrateur n° lot : Valeur : Unités :
Reconstitution			
Reconditionnement			
Péremption			
Température de conservation			

Dates de :	Contrôle n° lot : Valeurs : Unités :	Contrôle n° lot : Valeurs : Unités :	Contrôle n° lot : Valeurs : Unités :
Reconstitution			
Reconditionnement			
Péremption			
Température de conservation			

	1er dosage	2ème dosage	3ème dosage	4ème dosage
Unité.....	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur
Contrôle du kit Valeur cible..... (1 ^{er} passage)				
Contrôle (2 ^{ème} passage)				
Contrôle (3 ^{ème} passage)				
HDL n°1				
HDL n°2				
HDL n°3				
HDL n°4				
HDL n°5				
HDL n°6				
HDL n°7				
Contrôle (1 ^{er} passage)				
Contrôle (2 ^{ème} passage)				
Contrôle (3 ^{ème} passage)				

Commentaires concernant le déroulement du dosage (obligatoire en cas de valeur manquante) :

Date et signature :

A faxer le jour du dosage au : 01 55 8742 62

A envoyer par email le jour du dosage à : francoise.CHEVENNE@afssaps.sante.fr