



## VÉRIFICATION ET VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES

	Noms
Auteur(s) :	Jean Longtin
Réviseur(s) :	Bouchra Serhir
	Philippe Dufresne
	Élyse Boivin
	France Corbeil
	Sadjia Bekal
	Sandrine Moreira
	Marc-Christian Domingo
Approbateur :	France Corbeil
Coordonnateur du document :	Élyse Boivin

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

## 1 PRÉAMBULE

Ce document remplace la version précédente de la procédure PR-GQ-011. Suite aux ACP-17-034 et ACP-17-035, une refonte complète du document a été effectuée pour appliquer les normes ISO 15189 du COFRAC SH GTA 04. Les méthodes régies par les normes ISO 17025 ont été retirées.

## 2 OBJET

Ce document décrit le processus relatif à la vérification/validation et l'actualisation d'une méthode d'analyse.

## 3 OBJECTIFS

Démontrer que la méthode utilisée au laboratoire est apte à l'emploi prévu.

## 4 CHAMPS D'APPLICATION

Ce document s'adresse au personnel technique et aux responsables d'activités des secteurs analytiques.

## 5 DÉFINITION DES TERMES

**Concordance** : Mesure l'équivalence des résultats entre le test à vérifier/valider et un test de référence comparable.

**Exactitude** : L'exactitude permet de déterminer à quel point les mesures sont proches de la valeur attendue ou de référence.

**Fidélité intermédiaire (Reproductibilité intra-laboratoire, précision)** : Mesure la capacité à générer les mêmes résultats de manière répétée dans le même laboratoire et des conditions différentes, en faisant varier au moins un des facteurs suivants : l'opérateur, les lots de réactifs, l'équipement, les étalonnages... On parle aussi de reproductibilité intra analyse, inter analyses et inter utilisateurs.

**Incertitude** : Marge d'erreur associée aux valeurs mesurées ou déterminées lors d'un processus. C'est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder. L'incertitude doit faire l'objet d'une réévaluation régulière.

**Justesse (exactitude)** : Elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre de valeurs mesurées répétées et une valeur acceptée et déterminée par une méthode de référence ou de consensus ou par un organisme reconnu. L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une seule valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande.

**Méthode qualitative** : Elle fournit des résultats exprimés sous un format non numérique (par exemple : Présence/absence, positif/négatif)

**Méthode quantitative :** Elle fournit des résultats exprimés sous un format numérique (par exemple : ratio, titre)

**Méthode non normalisée :**

- Méthode d'analyse fondée sur une méthode normalisée qui a été modifiée (même légèrement) par son utilisateur pour répondre à ses besoins opérationnels ;
- Méthode normalisée employée en dehors de son domaine d'application prévu ;
- Méthode publiée dans des ouvrages scientifiques non accompagnée des données sur la performance ;
- Nécessaire d'essais commercial dont les données sur la performance sont non disponibles ou incomplètes.
- Méthode d'analyse développée ou adaptée à l'interne.

**Méthode normalisée :** Analyse approuvée par Santé Canada et effectuée sans modification. Il peut s'agir aussi :

- D'une méthode approuvée FDA ou CE ;
- D'une méthode d'analyse nationale ou internationale, publiée et validée, accompagnée des données complètes de validation ;
- D'une méthode ayant déjà été validée et qui est remise en service ;
- D'un nécessaire d'essais commercial validé par un tiers dont les données sur la performance sont disponibles.

**Répétabilité :** Consiste à analyser un même échantillon par un même opérateur, un même lot de réactifs, un même instrument et un même étalonnage, le tout dans un délai le plus court possible.

**Reproductibilité (fidélité intermédiaire, reproductibilité externe) :** La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des conditions différentes : utilisateur différent, appareil différent, jour différent ou même jour.

**Robustesse :** La robustesse est la capacité de donner des résultats proches en présence de changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure.

**Sensibilité analytique :** Pour une méthode quantitative ou semi-quantitative, la sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable mesurée à la valeur correspondante de la concentration connue. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à détecter l'analyte marqueur de la maladie quand il existe réellement.

**Spécificité analytique :** La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à éliminer la maladie ou à ne pas détecter l'analyte marqueur de la maladie quand il n'existe effectivement pas.  
Valeur attendue : Valeur théorique certifiée.

**Valeur prédictive négative** : Probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif

**Valeur prédictive positive** : Probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif.

**Validation** : Confirmer par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites.

*Notes :*

- La validation permet de déterminer les caractéristiques propres à la méthode.
- L'étape de validation d'une méthode interne suit l'étape de développement. Il est important de ne pas confondre ces étapes, car la validation est effectuée sur une méthode développée et rédigée. Certaines données obtenues lors du développement peuvent cependant servir à la validation.

**Vérification** : Déterminer si les caractéristiques de la méthode normalisée sont satisfaites lorsque cette méthode est utilisée dans le contexte du laboratoire. La confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites.

## 6 SÉLECTION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE

Le LSPQ sélectionne rigoureusement ses méthodes analytiques et privilégie les méthodes normalisées ; publiées dans des ouvrages scientifiques ; prévues à une réglementation ou spécifiées dans les modes d'emploi dont les données sur la performance sont disponibles.

Les méthodes utilisées sont vérifiées ou validées pour leur usage prévu.

Toute nouvelle méthode d'analyse doit faire l'objet d'une demande de changement selon la directive DI-GQ-009.

## 7 ACTUALISATION

Les données liées à la performance des méthodes doivent être examinées de manière périodique afin de prouver à la clientèle l'aptitude permanente à l'emploi. Selon la situation, les données suivantes doivent être incluses dans le dossier maître de la méthode :

- Suivi de comparabilité
  - Réévaluation de l'incertitude
  - Vérification des dérives
  - Non-conformités aux contrôles externes ou internes

De plus, lorsque des modifications sont apportées à une procédure analytique, l'influence de ces modifications doit être documentée et, le cas échéant, une nouvelle validation doit être réalisée.

## 8 PROCESSUS

Le processus de vérification/validation décrira les différentes étapes de la méthode et devra intégrer les étapes ci-dessous :

### Section 1 Type de méthode

---

Le choix devra tenir compte des performances analytiques, des données bibliographiques et référentielles et de la disponibilité de méthodes normalisées.

- Méthode normalisée utilisée sans modification (joindre un résumé des preuves de la vérification)
- Méthode non-normalisée
- Méthode qualitative
- Méthode quantitative

### Section 2 Description de la méthode

---

La méthode doit être décrite et doit inclure les éléments ci-dessous :

- Analyte/mesurande détecté
- Principe analytique évalué
- Type d'échantillon/matrice
- Référence du réactif
- Référence de l'équipement
- Référence des contrôles d'étalonnage

### Section 3 Mise en œuvre de l'étude de validation-vérification

---

#### 1. PON utilisée

- insérer lien de la procédure qui est utilisée lors de l'évaluation

#### 2. Procédure de validation ou de vérification

- Un plan de validation ou de vérification doit être soumis avec la demande de changement
- Le responsable d'activités décidera du choix :
  - Des critères de performance à évaluer,
  - du protocole suivi, et
  - du nombre d'essais.

Ces choix dépendent du type d'analyse, de l'évaluation du risque, du coût, du temps technique, de la faisabilité et du jugement clinique et/ou analytique. Ils devront être documentés.

- Le responsable d'activités doit s'assurer que les analyses statistiques soient adéquates pour évaluer chaque critère de performance, en fonction de l'analyse de risque
- La performance à atteindre et les critères d'acceptabilités doivent être fixés à l'avance

### 3. Auteurs

### 4. Opérateurs

### 5. Période d'étude

- Inscire les dates

## Section 4 Maitrise des risques (incertitude)

---

L'évaluation du risque doit se faire selon la méthode des 5M (SH GTA 14, COFRAC, 2018).

En utilisant le principe du diagramme des causes et effets (AI-GQ-036), le responsable d'activités doit évaluer les facteurs de variabilités.

### 1. Facteurs de variabilité

- Matière
- Milieu
- Matériel
- Méthode
- Main d'œuvre

Cette évaluation est réalisée en prenant en compte l'intégralité du processus analytique et en complétant le registre RE-GQ-050. Ce qui consiste à :

- identifier et inventorier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat (points critiques),
- identifier ceux dont l'influence est significative,
- montrer des moyens de maîtrise des facteurs de variabilité, de manière à minimiser les risques d'erreur.

Cette évaluation doit être révisée sur une base périodique.

Des exemples de moyen de maîtrise des facteurs significatifs sont présentés dans les aide-mémoire AI-GQ-037, AI-GQ-038, AI-GQ-039 et AI-GQ-040.

## Section 5 Évaluation de la performance

### 1. Critères recommandés en fonction du type d'évaluation

	Vérification		Validation	
	Quantitatif	Qualitatif	Quantitatif	Qualitatif
Répétabilité	X		X	
Reproductibilité		X	X	X
Justesse/exactitude	X	X	X	X
Comparaison	X	X	X	X
Incertitude : mesure de variabilité	X		X	
Incertitude : maîtrise des facteurs de variabilité	X	X	X	X
Limites de quantification			X	
Linéarité			X	
Limite de détection				X
Sensibilité/spécificité analytiques			X	X
Interférences			X	X
Contamination entre échantillons			X	X
Robustesse			X	X
Stabilité des réactifs			X	X
Intervalle de référence			X	X

Veillez justifier si un critère n'est pas retenu dans la validation/vérification.

### 2. Répétabilité

- La répétabilité se calcule par le dosage répété d'un ou de plusieurs échantillons, par un même opérateur, dans des conditions identiques pour toutes les mesures (réactif, calibration, appareil, opérateur) et dans un délai le plus court possible. Elle permet de déterminer la performance initiale et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné.
- La matrice de premier choix est un échantillon patient. En deuxième intention, un contrôle peut être utilisé.
- Le nombre de répétitions nécessaires varie idéalement entre 10 et 20, mais peut être inférieure si le coût des réactifs, la durée de l'analyse ou un autre facteur le justifient.
- Les données permettent de calculer la moyenne, l'écart-type et le CV (%) de chaque série.
- Les CV calculés pour chacun des niveaux sont comparés aux CV attendus et calculés par la compagnie pour des niveaux de concentration semblables.

### 3. Reproductibilité

- La reproductibilité peut être intra-laboratoire (fidélité intermédiaire) ou inter-laboratoire (reproductibilité externe). Elle est déterminée par la mesure répétée



d'échantillons selon certaines conditions opératoires différentes (temps, lots de réactifs, étalonnages, opérateurs et équipements).

- L'effectif idéal varie entre 10 et 20, mais peut être inférieur si le coût des réactifs, la durée de l'analyse ou un autre facteur le justifient.
- Les données permettent de calculer la moyenne, l'écart-type et le CV (%) de chaque série, intrasérie, inter-séries et pour l'ensemble des données.

#### 4. Justesse/exactitude

- La justesse et l'exactitude mesurent l'accord avec le résultat d'un échantillon de référence certifié (gold standard)
- La matrice de premier choix est un contrôle de qualité.
- Les résultats obtenus lors de l'évaluation de la reproductibilité sont comparés au résultat de référence attendu.

#### 5. Incertitude : Mesure de la variabilité

La mesure de l'incertitude des méthodes quantitatives peut s'évaluer par comparaison à une méthode de référence ou à des contrôles standards avec des concentrations connues de l'analyte. Les données utilisées peuvent être issues d'essais inter-laboratoires, d'étude de robustesse, d'essais d'aptitude ou d'étude de performance de méthode.

#### 6. Comparaison

Démontre la capacité de la méthode candidate à être suffisamment en accord avec la méthode de référence (statut de l'échantillon). Un écart entre deux méthodes est acceptable s'il ne modifie pas le diagnostic ou le suivi médical.

##### a) Comparaison qualitative

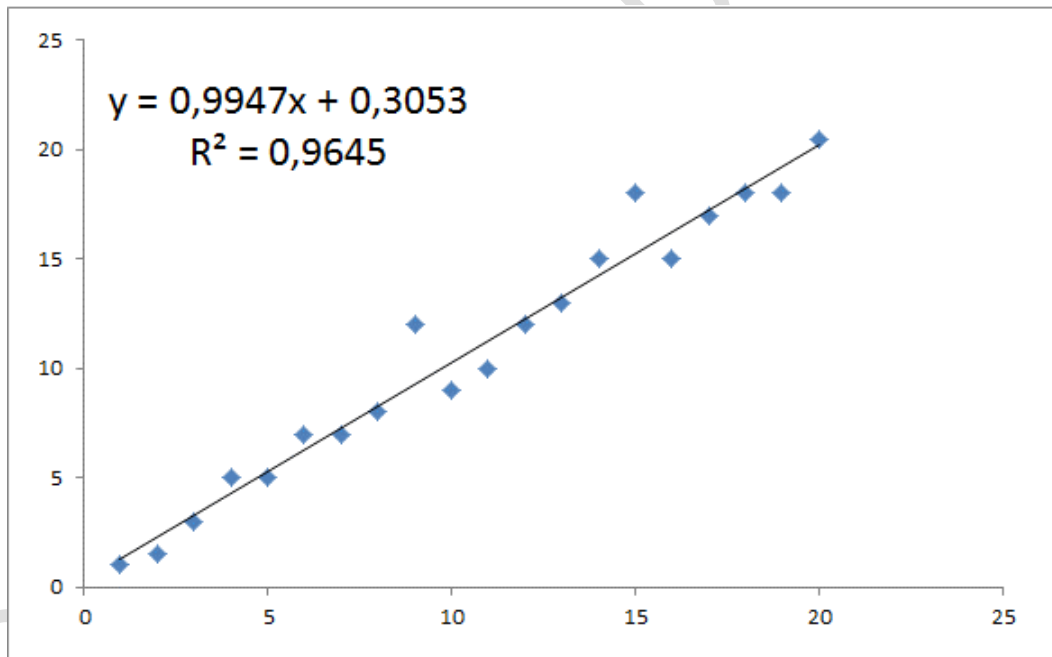
- Utiliser des échantillons patients couvrant l'ensemble des types de résultats attendus (exemple : négatifs, positifs minimaux, positifs).
- Le nombre d'échantillons nécessaire varie idéalement entre 10 et 30, mais peut être inférieure si le coût des réactifs, la durée de l'analyse ou un autre facteur le justifient.
- Dresser un tableau de contingence :

		Statut de l'échantillon	
		Positif	Négatif
Résultat donné par le test à vérifier/valider	Positif	Accords positifs	Déviations positives
	Négatif	Déviations négatives	Accords négatifs
Sommes		N. positifs	N. négatifs

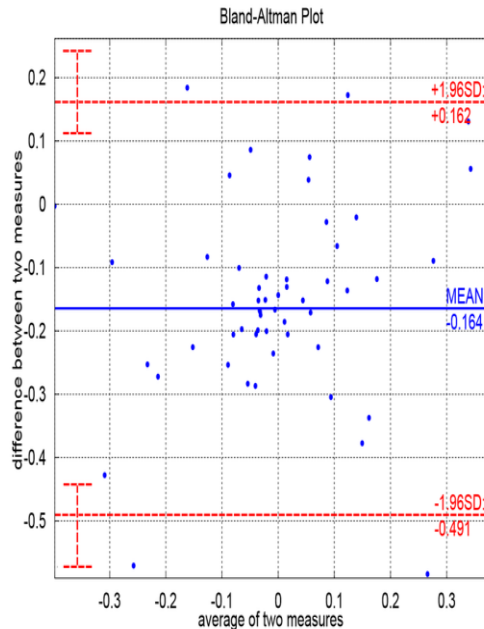
- Calculer la concordance (Nb de résultats adéquats/Nb totaux de résultats X 100)
- Avec les données du tableau de contingence, il est possible de calculer la sensibilité (accords positifs/total des statuts positifs X 100), la valeur prédictive positive (accord positifs/accords positifs + déviations positives X 100) et la valeur prédictive négative (accords négatifs/accords négatifs + déviations négatives X 100).

b) Comparaison quantitative

- Analyser des échantillons patients couvrant l'ensemble des valeurs de l'intervalle de mesure
- Le nombre d'échantillons nécessaire varie idéalement entre 10 et 30, mais peut être inférieure si le coût des réactifs, la durée de l'analyse ou un autre facteur le justifient.
- Une seule mesure peut être obtenue pour chaque échantillon. Toutefois, si le volume des échantillons et le temps le permet, la moyenne calculée à partir des réplicas des dosages permet de diminuer l'incertitude sur l'estimation du biais. Si les échantillons sont analysés en duplicata, utiliser la moyenne des résultats pour la comparaison de méthode.
- Calculer la régression linéaire (voir exemple ci-dessous)



- Une analyse de Bland et Altman (Graphique des différences) peut aussi être effectuée. La méthode d'évaluation de la concordance de Bland et Altman consiste à comparer les moyennes de mesures (abscisse) à leur différence (ordonnés).



Le désaccord entre les 2 méthodes se calcule par le biais, estimé par la moyenne et l'écart-type SD. Les limites de concordance à 95 % sont évaluées par la moyenne +/- 1.96 SD.

## 7. Limites de quantification

- La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité acceptable.
- Un Coefficient de variabilité acceptable peut être de 10 % ou tel que définie dans le protocole de validation/vérification.
- La matrice de premier choix est un échantillon de patient.

## 8. Linéarité

- La limite de linéarité est le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode.
- Par exemple :
  - Diluer et analyser un échantillon de concentration très élevée. Les résultats obtenus permettront de vérifier l'existence d'une relation linéaire entre les dilutions effectuées et les concentrations. La limite supérieure de la linéarité et la limite de quantification permettent de définir le domaine de mesure de la méthode.
  - Se procurer un panel commercial validé de linéarité.

## 9. Limite de détection

- La limite de détection est la plus basse concentration qui est détectée de manière reproductible
- La matrice de premier choix est un échantillon de patient faiblement ou minimalement positif pour l'analyte recherché.
- Par exemple, on effectue une dizaine de mesures répétées de blancs (matrice dépourvue de l'analyte à doser, calibrateur, diluant) dans un même test. La concentration la plus basse de détection est obtenue dans 9/10 replicats.

## 10. Spécificité analytique

- La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à éliminer la maladie ou à ne pas détecter l'analyte marqueur de la maladie quand elle n'existe effectivement pas.
- Effectuer une évaluation par l'analyse de micro-organismes ou de cibles apparentées ou avec des analyses in-silico.

## 11. Interférences

- Effectuer une évaluation avec des échantillons contenant des substances pouvant altérer le signal de mesure et entraîner des résultats erronés. Par exemple : présence de sang, de bilirubine, d'ictère, échantillon turbide, etc.

## 12. Contamination entre échantillons

- Une étude de contamination inter-échantillons est à effectuer lorsque pertinent, notamment au niveau des systèmes de pipetage des échantillons, par exemple avec l'utilisation de blanc ou de spécimens négatifs intercalés avec des spécimens fortement positifs.
- La matrice de choix est un échantillon patient fortement positif. En deuxième intention, un contrôle fort.
- Analyser idéalement 3 échantillons hautement positifs intercalés avec 3 échantillons blancs ou négatifs.
- Le nombre de répétitions est à déterminer par le responsable d'activités selon le type d'analyse, les coûts de réactifs, la disponibilité des échantillons, la durée de l'analyse, etc.
- Le niveau de la contamination doit être absent, ou maîtrisé

## 13. Robustesse

- La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation.
- En prenant en compte le processus analytique, identifier et évaluer les facteurs opératoires qui peuvent avoir une influence sur le résultat (exemple : la

température d'incubation, la position de l'échantillon dans différents emplacements d'une microplaque, etc.)

- Le nombre d'échantillons est à déterminer par le responsable d'activités selon le type d'analyse, le coût des réactifs, la disponibilité des échantillons, la durée de l'analyse, etc.

#### 14. Stabilité des réactifs

- Dans le cas de réactifs fabriqués par le laboratoire, celui-ci devra établir les conditions de stabilité (température, durée de conservation...).
- Une vérification des conditions suggérées par le fabricant peut être envisagée selon le risque.

#### 15. Intervalle de référence

- L'intervalle qui correspond aux résultats obtenus par l'analyse pour un patient en santé est un paramètre à établir.
- Ce paramètre est généralement sans objet en microbiologie

#### 16. Sommaire de performance

- Les données de vérification, de validation ou d'actualisation sont inscrites au registre adapté RE-GQ-026 et au cahier de laboratoire électronique
- Le sommaire de performance inclut notamment :
  - Les critères évalués
  - Les critères d'acceptation, tels que stipulés dans le plan
  - Les résultats de l'évaluation
  - Conformité

### Section 6 Analyse et interprétation

---

- Le responsable d'activités doit faire l'analyse et l'interprétation des résultats
- Si certains critères de performance recommandés ne sont pas évalués ou font l'objet d'une évaluation moins importante, ex. un faible nombre d'échantillons pour une comparaison de méthodes, le responsable devra faire une évaluation du risque associé à cette modification de la procédure et justifier son protocole dans le registre RE-GQ-026.

### Section 7 Déclaration d'aptitude

---

- Les données cumulées lors de la validation/vérification permettent de confirmer que la méthode est prête à l'emploi
- L'auteur doit signer et dater la section de Déclaration d'aptitude du registre RE-GQ-026

## 9 RÉFÉRENCES

1. Document COFRAC SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale. 2018.
2. Document COFRAC SH GTA 14, Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en Biologie Médicale. 2018
3. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ (2009) Cumitech 31A, Verification and validation of procedures in the clinical microbiology Laboratory. Coordinating ed., Sharp SE, ASM Press, Washington, DC.
4. CLSI, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—second edition, EP12-A2, Vol. 28 No.3, January 2008.
5. FDA - ORA-LAB.5.4.5. ORA Laboratory Procedure—FDA. Methods, method verification and validation. 2014-08-29  
<https://www.fda.gov/scienceresearch/fieldscience/laboratorymanual/ucm171877.htm>
6. DI-GQ-009. Maîtrise des changements.
7. RE-GQ-050 Sources d'incertitude
8. AI-GQ-037 Moyens de maîtrise
9. AI-GQ-038 Sources d'incertitude : Antibiogramme
10. AI-GQ-039 Sources d'incertitude : Identification bactérienne
11. AI-GQ-040 Évaluation des sources d'incertitude : Biologie moléculaire

## 10 DOCUMENTS ASSOCIÉS

La version courante des documents suivants est associée au présent document.

RE-GQ-026 : Sommaire : Validation — vérification d'une méthode d'analyse