|  |  |
| --- | --- |
| **Protocole d'évaluation / validation / vérification de méthode en Qualification Biologique du Don** | |
| **Site évaluateur** | |
| **Protocole National d’évaluation**  **du dépistage des anticorps antipaludéens**  **sur automate EVOLIS 2021** | |
| **Nom de l’automate/Fournisseur :** | **EVOLIS - BIORAD** |
| **Version logiciel :** | **2.3** |
| **Nom du réactif évalué :** |  |
| **Principe de la méthode évalauée  :** |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Rédacteur(s) : Valérie Barlet & Marlène Guillet | Date : Mars 2024 | Visa : |
| Vérificateur(s)  *si nécessaire:* | Date : | Visa : |
| Approbateur(s) : Copil QBD | Date : Avril 2024 | Visa : |

|  |  |
| --- | --- |
| **Type de changement justifiant la vérification** | |
| Introduction d’un nouveau réactif (pour un nouvel examen/ nouvelle méthode) | X |
| changement de réactif pour un examen déjà existant |  |
| Introduction d’un nouvel automate  *(si oui, voir aussi protocole de qualification d’un automate)* |  |
| Autres : |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Type de flexibilité :** | |
| Portée flexible standard A : méthode normalisée, vérification sur site *(utilisation selon la notice du fournisseur)* | X |
| Portée flexible étendue B : validation |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Type de méthode :** | |
| Méthode qualitative |  |
| Méthode quantitative (assimilée) | X |
| Méthode quantitative vraie |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Nature de l’échantillon / type de tube** | |
| Plasma citraté |  |
| Plasma EDTA | X |
| Plasma EDTA tube gel | X |
| Sérum tube sec avec gel | X |
| Sérum tube sec | X |
| Sang total sur EDTA |  |
| Autre : |  |

SOMMAIRE

[1. Contexte et analyse d’impact 3](#_Toc192495228)

[1.1. Contexte 3](#_Toc192495229)

[2. Description du matériel, de la méthode et des réactifs 3](#_Toc192495230)

[2.1. Matériel utilisé 3](#_Toc192495231)

[2.2. Méthodes, réactifs, consommables 4](#_Toc192495232)

[2.2.1. Méthodes 4](#_Toc192495233)

[2.2.2. Réactifs évalués 5](#_Toc192495234)

[2.2.3. Consommables 5](#_Toc192495235)

[2.3. Echantillons utilisés 6](#_Toc192495236)

[2.3.1. Panels, échantillons de référence et contrôles utilisés 6](#_Toc192495237)

[2.3.2. Echantillons autres utilisés 7](#_Toc192495238)

[3. Référentiels, documentation et bibliographie 8](#_Toc192495239)

[3.1. Référentiels 8](#_Toc192495240)

[3.2. Documentation 8](#_Toc192495241)

[3.3. Bibliographie 8](#_Toc192495242)

[4. Etapes de la validation de méthode 8](#_Toc192495243)

[4.1. Calendrier et personnes concernées 8](#_Toc192495244)

[4.2. Qualification de performance : vérification sur site de la méthode 9](#_Toc192495245)

[5. Rapport de validation de méthode 10](#_Toc192495246)

# Contexte et analyse d’impact

## Contexte

Le paludisme est une affection fébrile aiguë potentiellement mortelle due à des parasites du genre Plasmodium transmis à l’homme par des piqures d’anophèles femelles infectées. Il existe 5 types de parasites responsables du paludisme chez l’homme, dont 2 –Plasmodium Falciparum et Plasmodium Vivax - qui sont les plus dangereux.

En 2017, la transmission du paludisme continuait dans 91 pays et territoires. La zone d’endémie s’étend de l’Afrique subsaharienne (majorité des cas), une partie de l’Asie, Amérique latine et dans une moindre mesure le Moyen-Orient. Près de la moitié de la population mondiale est exposée au risque de contracter le paludisme. Nous comptons en 2023, 263 millions de cas de paludisme et 597 000 décès (Source OMS 2024). Le paludisme peut être transmis lors de la transfusion de globules rouges issus d’un donneur infecté. Dans les zones d’endémie, les personnes peuvent parfois être partiellement immunisées et peuvent présenter des infections asymptomatiques. Pour écarter ces donneurs dangereux l’interrogatoire médical est couplé à une recherche d’anticorps anti paludéens chez les personnes à risques (séjour en zone d’endémie ou donneur né en zone d’endémie). Celle-ci est réalisée dans le cadre de la qualification biologique des dons.

Cette sérologie est actuellement réalisée sur automate Evolis avec le réactif fabriqué par Diapro et distribué par Launch diagnostics : Malaria AB®. Si le test de dépistage est positif répétable, ou si le donneur est originaire d’une zone d’endémie un deuxième test Elisa de confirmation est réalisé avec un réactif différent (EuroImmun). En cas de nécessité, une expertise par le Centre National de Référence (Pr Houze – Hôpital Bichat – APHP) peut être demandé.

Dans le cadre du renouvellement du marché National, l’EFS se réserve le droit d’évaluer les réactifs proposés par les candidats.

Ce protocole est donc rédigé afin de définir les différentes étapes permettant d’évaluer les performances analytiques de ces réactifs.

Ces réactifs seront utilisés sur automate Evolis et testés par un ou plusieurs des 4 laboratoires de QBD de Métropole selon le nombre de réactif à tester.

# Description du matériel, de la méthode et des réactifs

## Matériel utilisé

Automates Beckman Coulter : les automates de tri ont été qualifiés et plus particulièrement, l’absence de contamination inter-échantillons a été vérifiée.

Automates EVOLIS BioRad: automates complets ouverts qualifiés (distributeur+ gestionnaire de microplaques) permettant de réaliser des sérologies par technique ELISA sur microplaques, qualifiés.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Équipement** | **Fournisseur** | **N° de série** | **N° inventaire** | **Date dernière qualification** | **Contexte d’utilisation lors de l’évaluation : appareil de routine** |
| Automate EVOLIS |  |  |  |  |  |

## Méthodes, réactifs, consommables

### Méthodes

Chaque méthode sera décrite précisément. Cela permettra de mettre éventuellement en évidence des points critiques (méthode pas à pas à adapter en fonction des méthodes).

| **METHODE EVALUEE : ……** | | |
| --- | --- | --- |
| **Etapes** | **Description (volume, temps, vitesse, T°C si besoin), limites d’acceptation** | **Moyens de maitrise** |
| **Etapes pré-analytiques** | | |
| Types d’échantillons utilisables : matrice (sérum, plasma, sang cadavérique, anticoagulant) |  |  |
| Conditions de conservation des échantillons avant et après centrifugation avant analyse |  |  |
| Centrifugation |  |  |
| **Etapes analytiques** | | |
| Conditions ambiantes |  |  |
| Durée du test (doit être inférieur à 2H45) |  |  |
| Type de microplaque : cupule fond plat, etc… |  |  |
| Possibilité de travailler en barrette |  |  |
| Moyen d’identification des barrettes |  |  |
| Distribution Témoins et échantillons à tester (volume compris entre 10 et 120µl) |  |  |
| Ajout du diluant |  |  |
| Incubation |  |  |
| Lavages |  |  |
| Conjugué |  |  |
| Incubation |  |  |
| Conjugué 2 |  |  |
| Incubation |  |  |
| Lavages |  |  |
| Substrat |  |  |
| Incubation |  |  |
| Arrêt de la réaction |  |  |
| Lecture |  |  |
| **Etapes post-analytiques** | | |
| Précision d’une zone grise (voir notice) |  |  |
| Gestion des déchets |  |  |
| Maintenances |  |  |
| Remarques |  |  |

Il faudra vérifier qu’un réactif n’est pas limitant dans le cadre de l’utilisation en routine, (notamment lors de petites séries d’échantillons testés).

Les conditions particulières d’utilisation des réactifs s’il y en a, seront précisées (notamment les maintenances nécessaires).

### Réactifs évalués

Les réactifs évalués sont présentés dans le tableau ci-dessous.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nom des réactifs** | **Distributeur** | **Référence** | **Version notice** | **Lot/péremption** |
| A préciser |  |  |  |  |

### Consommables

Les consommables utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nom des consommables** | **Distributeur** | **Référence** | **Lot/péremption** |
| A préciser |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

## Echantillons utilisés

### Panels, échantillons de référence et contrôles utilisés

| **Nom des échantillons** | **Distributeur** | **Référence** | **Nombre et conditionnement** | **Version notice** | **Lot/péremption** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CQI monoparamétriques** | | | | | |
| **CQI SeroQal MALARIA 101** (anciennement CRS pal) | EFS Réactifs |  |  |  |  |
| **CQI SeroQal MALARIA 102** (anciennement E-Palu) | EFS Réactifs |  |  |  |  |
| **Panel de sensibilité diagnostique** | | | | | |
| **Au moins 10 échantillons issus de l’étude DGV palu :** sérologie positive ou indéterminée, positifs en biologie moléculaire et confirmés par le CNR (PCR d’espèce) | LPNT | NA | NA | NA | NA |
| **45 échantillons de patients ayant fait un accès palustre documenté et ayant une IFI > 1/64ème (IFI CNR)**  (30 P. falciparum ; 5 P. vivax ; 5 P. ovale ; 5 P. malariae) | CNR | NA | NA | NA | NA |
| **Gamme** | | | | | |
| **Gamme de sensibilité à partir du WHO**  *P. Falciparum* : 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125  *P. vivax* : 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,03125 | EFS Réactifs |  |  |  |  |
| **Gamme de niveau 1** (gamme de dilution pour évaluer le UA/mL à r=1 | EFS Réactifs |  |  |  |  |

### Echantillons autres utilisés

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Origine** | **Type d’échantillons** | **Nombre** | **Caractéristiques** |
| Echantillons de donneurs avec facteur de risque | Tubes EDTA | 1000 | Tubes du jour : tester les échantillons sur la méthode de routine et la méthode à valider le même jour.  (voir dans le chapitre 5 : approche de la spécificité) |
| Echantillons de donneurs de sangs nés en zone d’endémie (antécédent PA05 présent) ayant une sérologie positive | Tubes EDTA | Au moins 10 | Ces échantillons peuvent être sélectionnés en amont de la validation et être congelés. |

# Référentiels, documentation et bibliographie

## Référentiels

Bonnes Pratiques Transfusionnelles (version en vigueur)

Bonnes Pratiques de Fabrication (version en vigueur)

Référentiels QBD en vigueur

Norme EN ISO / CE / 17025 (version en vigueur)

Norme EN ISO / CE / 15189 (version en vigueur)

## Documentation

Mise en œuvre d’une nouvelle méthode ou changement de méthode en QBD

(PSL/QBD/GEN/AUT/DF/FO/001 Changements en QBD – PLAN D’ACTION)

Modes opératoires du laboratoire

Manuel d’utilisation de l’automate

Notice technique fournisseur

Rapport d’évaluation nationale

Autres :

## Bibliographie

1. Kitchen A.D et al Evaluation of a malarial antibody assay for use in the screening of blood and tissue products for clinical use. Vox sanguinis (2004) 87, 150-155
2. Seed C.R. et al The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. Vox Sanguinis (2005) 88,98-106
3. Kitchen A.D et al Transfusion transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient. Vox Sanguinis (2005) 88,200-201

# Etapes de la validation de méthode

## Calendrier et personnes concernées

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Etape** | **Intervenants** | **Date prévisionnelle** |
| Validation du protocole d’évaluation | COPIL QBD | Mars 2025 |
| Qualification de performance | Techniciens en charge de l’évaluation | Sept – oct 2025 |
| Synthèse des comptes rendus des tests et rédaction du compte-rendu de qualification | Biologiste en charge de l’évaluation | Oct 2025 |

## Qualification de performance : vérification sur site de la méthode

| **ITEMS** | **Description du test** | **Critères d’acceptabilité (avec justification) Commentaires/ Données bibliographique** |
| --- | --- | --- |
| Répétabilité | 30 passages de l’échantillon dans une même plaque  Calcul du CV (%) | 100 % de résultats positifs  **CV < 15%** |
| Fidélité intermédiaire (Reproductibilité) | J1 : 6 passages sur la même microplaque ou mieux, sur des microplaques différentes  J2 : 6 passages (idem)  J3 : 6 passages (idem)  J4 : 6 passages (idem)  J5 : 6 passages (idem)  Calcul du CV (%) | 100 % de résultats positifs  **CV < 20%** |
| Contamination | Alternance d’échantillons fortement positifs P (3 fois le même échantillon) et négatifs N (3 fois un pool d’échantillons de donneurs négatifs)  *Nous considérons que même si les Ac anti-Paludéen ne représentent pas un analyte sensible, nous vérifierons quand même la non-contamination inter-échantillons, l’étape la plus critique étant le lavage.* | La disposition des échantillons sur la microplaque sera telle qu’un même peigne lavera les cupules d’échantillons positifs puis négatifs  Le schéma de la plaque sera intégré au rapport. |
| Comparaison avec la méthode déjà utilisée au laboratoire | Voir étude de spécificité  + passage des échantillons PA05 avec une sérologie paludisme positive en routine (au moins 10 échantillons) | Les résultats qualitatifs seront comparés.  Toute discordance avec les résultats attendus sera documentée. |
| Approche de la sensibilité diagnostique | **Echantillons issus de l’étude DGV palu** (sérologie positive ou indéterminée, positifs en biologie moléculaire et confirmés par le CNR (PCR d’espèce).  **Echantillons de patients ayant fait un accès palustre documenté** (échantillons CNR)  Echantillons testés en double sur 2 microplaques différentes | Toute discordance avec les résultats attendus sera documentée.  **La sensibilité devra être la plus proche de 100%** |
| Approche de la sensibilité analytique | 1 gamme *P. falciparum* : 1 – 0,5 - 0,25 - 0,125 UI/mL  1 gamme *P. vivax* : 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,03125 UI/mL  Gamme niveau 1  Les gammes devront être testées en double sur 2 microplaques différentes. | L’échantillon à 1 UI/mL doit être réactif pour *P. falciparum*.  L’échantillon à 0,25 UI/mL doit être réactif pour *P. vivax*.  Pour la gamme de niveau 1, les résultats devront être conformes aux critères d’acceptation fournis par EFS Réactifs.  Toute discordance avec les résultats attendus sera documentée. |
| Spécificité diagnostique et analytique | **Pour le lot 1 :** Au moins **1000 échantillons** de donneurs de sang déjà testés au laboratoire par la méthode de routine et négatifs (donneurs de sang avec facteur de risque)  **Pour le lot 2** : Au **moins 500 échantillons** de donneurs de sang déjà testés au laboratoire par la méthode de routine et négatifs (donneurs de sang avec facteur de risque)  *Attention : il faudra travailler sur des échantillons non urgents (hors traits rouges) à J1, afin de ne pas interférer avec l’étiquetage des plaquettes et afin de pouvoir bloquer les produits concernés avant distribution* | Tous les échantillons positifs une fois seront re-testés en réplicats.  Si le réplicat est positif (+/- ou +/+), ils seront testés sur un autre EVOLIS et seront envoyés au CNR pour exploration complémentaire.  Le prélèvement sera bloqué dans EOS ou CTS Serveur selon les cas en attendant le résultat du CNR  Si les explorations complémentaires au CNR et la méthode de routine sont négatives, le prélèvement sera débloqué. Dans les autres cas, le prélèvement sera déclaré non conforme.  **La spécificité diagnostique devra être supérieure ou égale à 96,0%** (**critère rédhibitoire)** |
| Répartition des DO ou ratios obtenus chez les donneurs négatifs | Un graphe sera élaboré à partir des ratios des donneurs.  La valeur moyenne des ratios négatifs sera calculée. | L’allure du graphe obtenu sera analysée, et la courbe devra montrée l’absence de valeurs proches du seuil.  La valeur moyenne des ratios négatifs devra être éloignée du seuil de positivité. |

En cas de discordance, les prélèvements seront bloqués en fonction de l’état d’avancement des examens dans EOS ou dans CTS serveur si besoin. Le biologiste décidera de la conduite à suivre en fonction des cas.

Les documents de preuve seront annexés au rapport rédigé.

# Rapport de validation de méthode

Un rapport sera rédigé par l’équipe projet et validé par un biologiste du laboratoire.