



Vérification en portée A d'une méthode de PCR triplexe pour la détection de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*

Flora Bochereau, Hélène Séraphin, Claire Plassart*

Laboratoire de biologie médicale, Centre Hospitalier de Beauvais, France.

*Auteur correspondant : c.plassart@ch-beauvais.fr (C. Plassart).

Résumé

En 2017, au laboratoire de l'hôpital 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* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) et *Mycoplasma genitalium* (MG). Pour répondre à la norme NF 15189, une analyse des risques ainsi que la vérification de certains critères de performance sont réalisées sur site. La fidélité intermédiaire pour NG est 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 CT est réalisée sur 46 échantillons, 4 résultats sont discordants (tous positifs avec l'ancienne méthode et négatifs avec la nouvelle). L'exactitude est vérifiée par deux EEQ pour CT et NG : les résultats sont conformes. Les essais de contamination inter-échantillons montrent l'absence de contamination. Enfin, une vérification continue à l'aide de graphiques de Levey-Jennings construites à partir des « Cycles threshold » (Ct) des contrôles est mise en place. Ce travail 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.

MOTS CLÉS

- norme ISO 15189
- PCR temps réel
- vérification continue
- vérification de méthode

KEY WORDS

- continuous verification
- ISO 15189 standard
- method verification
- real time PCR

Abstract

Method verification, in range A, of a triplex real time PCR for the detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium*

In 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* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) and *Mycoplasma genitalium* (MG). According to the ISO 15189 standard, a risk analysis and a verification of some performance criteria are performed on site. Intermediate precision for NG is evaluated on two samples giving equivocal results. Following runs gives negative results. Comparison between the new and the previous end-point PCR method (GenoQuick[®]CT, Hain Lifescience) for the detection of CT is performed on 46 samples. Four samples show discordant results (all positive with the previous method and negative with the new one). Accuracy is assessed by two EQA (External Quality Assessment) for CT and NG 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 NG results. In addition, it provides a tool to continuously monitor the performance.

Introduction

Les IST bactériennes sont un enjeu majeur de santé publique en raison de leur prévalence élevée, leur contagiosité, leur caractère souvent asymptomatique et leurs complications potentiellement graves. Les méthodes de dépistage et de diagnostic de ces infections ont progressé avec notamment les techniques de diagnostic direct comme les NAAT. Ces méthodes font désormais partie intégrante des recommandations de la HAS [1]. Depuis l'ordonnance du 13 janvier 2010 les laboratoires de biologie médicale doivent entrer dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189 [2]. La validation ou la vérification des méthodes est indispensable et permet de prouver la fiabilité des résultats rendus. Ce travail a pour objectif la mise en place et la vérification de méthode initiale, en portée A, de la trousse de PCR : Urethritis basic® (Fast-Track Diagnostics) pour la détection qualitative de CT, NG et MG. Un suivi continu des performances à partir des contrôles est également mis en place.

Matériels et méthodes

Analyse de risques

L'analyse de risques est réalisée selon une approche par processus : pré-analytique, analytique et post-analytique [3]. Pour chaque étape de l'analyse, les risques sont répertoriés dans un tableau résumant les dangers ainsi que leurs effets. Pour chaque risque, un ou plusieurs points de maîtrise sont apportés.

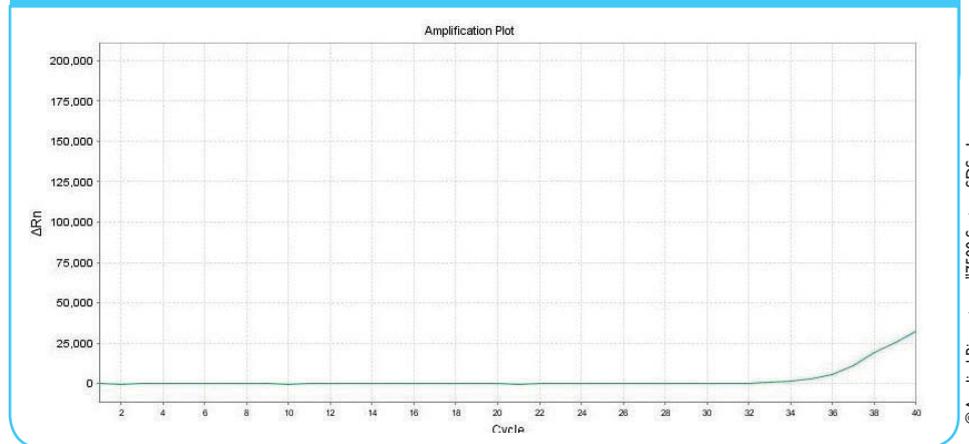
Étude de la stabilité des échantillons

Des échantillons positifs pour chacun des trois pathogènes lors d'une série sont repassés dans la série de PCR suivante, pour nous assurer de la stabilité des échantillons pendant une semaine (délai maximum entre deux séries de PCR). Les échantillons sont conservés à +4 °C.

Critères de performance à évaluer sur site

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 recom-

Figure 1. Courbe équivoque pour le gonocoque.



mandations des sociétés savantes telles que la SFBC [4] et le guide du COFRAC [SH-GTA-04] [5].

Fidélité intermédiaire pour le gonocoque

Deux échantillons donnant des résultats douteux pour NG, c'est-à-dire ceux présentant, un signal tardif ($C_t > 35$) et/ou dont l'aspect exponentiel de la courbe de fluorescence est équivoque (figure 1) sont à nouveau testés dans 2 autres séries de PCR, par un technicien différent à chaque fois. Les échantillons sont congelés entre deux séries.

Exactitude

Notre programme d'EEQ du CTCB évalue la recherche de CT et NG. Pendant l'élaboration de ce travail, deux EEQ sont passés.

Comparaison de méthodes pour CT

46 échantillons positifs et négatifs pour CT sont testés sur les deux méthodes. Les discordances sont analysées par une 3^e méthode lorsque que cela est possible (PCR temps réel CT/NG Abbott®).

Essais de contamination

L'extraction et la réaction de PCR sont réalisées sur 6 échantillons : 3 négatifs et 3 positifs pour CT. Les échantillons sont disposés en alternant positifs et négatifs.

Vérification continue

La vérification continue est réalisée à partir de l'exploitation des résultats de 4 paramètres : les C_t des trois paramètres du contrôle positif et le C_t du contrôle interne (dans le contrôle négatif). Les contrôles sont inclus dans chaque série de PCR. La moyenne et l'écart-type sont calculés pour chacun d'eux et un graphique de Levey-Jennings est réalisé. Les coefficients de variation sont calculés sur l'ensemble de la période.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/7644897>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/7644897>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)