

**Université Pierre et Marie Curie – Paris VI**

**MEMOIRE  
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE  
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE D'ANALYSES  
DE BIOLOGIE MEDICALE (GBEA ET NORME ISO 15189) »**

**Gestion des contrôles de qualité internes  
en immuno-analyse :**

**Mise en place, suivi et traçabilité**

Cécile ROCOURT  
Année 2009

Directeur du mémoire :  
Docteur Anne VASSAULT

## **NOTE AUX LECTEURS**

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité et Guide de Bonne Pratique des Analyses de Biologie Médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné. »

**AUTEUR DU MEMOIRE**

Cécile ROCOURT

Technicienne de laboratoire

LAM CHAVIGNY-ROY-FARIA

129 bis rue Pierre Loti

17 300 ROCHEFORT SUR MER

**DIRECTEUR DE MEMOIRE**

Dr Anne VASSAULT

Biologiste des hôpitaux

Laboratoire de Biochimie Métabolique

Pôle de BIOLOGIE et PRODUITS DE SANTE

Hôpital Necker Enfants Malades

149 rue de Sèvres

75 015 PARIS

## **REMERCIEMENTS**

Ce mémoire me permet de formuler des remerciements.

- A Madame Christiane FARIA, Monsieur Olivier ROY et Monsieur William CHAVIGNY, directeurs biologistes du laboratoire, de m'avoir permis de suivre cette formation.
- A Madame Anne VASSAULT pour le suivi de mon projet et ses précieux conseils.
- A l'ensemble des technicien(ne)s du laboratoire, et en particulier à Madame Mireille SCHOEFFLER pour sa disponibilité et ses conseils.
- A l'ensemble des intervenants du DU Assurance Qualité pour la qualité de leur enseignement et l'envie qu'ils m'ont donnée de continuer à m'investir dans la qualité au sein de mon laboratoire.

## SOMMAIRE

<b>GLOSSAIRE</b>	<b>3</b>
<b>1- Contexte</b>	<b>4</b>
1-1 Le laboratoire : ses activités, son personnel	4
1-2 Engagement du laboratoire dans la démarche qualité	5
1-3 Exigences réglementaires et normatives	6
<b>2- Présentation du projet : mise en place de contrôles de qualité internes sur un automate d'immuno-analyse</b>	<b>7</b>
2-1 Etat des lieux	7
2-2 Intérêts et objectifs	8
<b>3- Plan d'action</b>	<b>8</b>
<b>4- Organisation</b>	<b>9</b>
4-1 Choix des échantillons de contrôles et du fournisseur	9
4-2 Rédaction des documents	10
4-3 Information du personnel	11
<b>5- Mise en place</b>	<b>11</b>
5-1 Détermination de la valeur cible	11
5-2 Etude de la reproductibilité intra-série	12
5-3 Etude de la stabilité	13
5-4 Automatisation du procédé	13

<b>6- Evaluation – Amélioration</b>	<b>17</b>
6-1 Règles de validation technique – Analyses des résultats	17
6-2 Auto évaluation du CQI	19
6-3 Comparaisons inter-laboratoires	20
6-4 Mesures à prendre en cas d’anomalie	20
<b>7- Difficultés rencontrées</b>	<b>20</b>
<b>8- Conclusion</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>22</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>23</b>

## GLOSSAIRE

**Action corrective :** action entreprise pour éliminer les causes d'une non-conformité, d'un défaut ou de tout autre événement indésirable existant, pour empêcher son renouvellement.

**Action préventive :** action entreprise pour éliminer les causes d'une non-conformité, d'un défaut ou de tout autre événement indésirable potentiel, pour empêcher qu'il ne se produise.

**Biais :** différence entre la valeur réelle et la valeur obtenue.

**Coefficient de variation (CV) :** rapport entre l'écart type et la moyenne, exprimé en pourcentage.

**Contrôle de qualité (CQ) :** processus statistique qui contrôle et évalue le processus analytique utilisant des données recueillies lors des tests des produits de CQ.

**Courbes de Levey Jennings :** graphiques retraçant les résultats successifs des CQI.

**Dérive :** augmentation ou diminution graduelles des valeurs de contrôle, type d'erreur systématique.

**Ecart type (ET) :** valeur qui quantifie la dispersion autour de la moyenne des données dans un panel déterminé.

**Echantillons de contrôle :** substances liquides ou lyophilisées d'origine humaine, animale ou chimique utilisées pour contrôler la qualité et la stabilité du processus analytique.

**Erreur aléatoire :** toute déviation aléatoire de la moyenne du laboratoire.

**Erreur systématique :** dérive ou décalage par rapport à la moyenne du laboratoire.

**Justesse :** mesure de l'accord entre la valeur théorique attendue et la valeur obtenue.

**Moyenne :** pour les contrôles de qualité, la meilleure estimation de la valeur réelle d'un analyte (somme des valeurs divisée par le nombre de valeurs).

**Précision intersérie ou reproductibilité :** précision calculée à partir des données recueillies lors de séries séparées.

**Précision intrasérie ou répétabilité :** précision calculée à partir des données recueillies lors d'une seule série.

**Règles de Westgard :** algorithmes de décisions qui aident à vérifier la fiabilité du système analytique.

**Roue de Deming :** description de l'amélioration de la qualité selon quatre étapes : prévoir, mettre en œuvre, évaluer et améliorer.

## 1- Contexte

### *1-1 Le laboratoire : ses activités, son personnel*

La SELARL CHAVIGNY-ROY-FARIA (CRF) exploite deux laboratoires d'analyses de biologie médicale privés à ROCHEFORT-SUR-MER (17). La répartition des activités est la suivante :

<b>LABM ROY-FARIA</b>	- Prélèvements
129 bis rue Pierre Loti	- Hématologie / Hémostase / Immuno-hématologie
	- Biochimie / Immuno-analyse
	- Services administratifs
<b>LABM CHAVIGNY</b>	- Prélèvements
121 rue Jean Jaurès	- Microbiologie
	- Analyse chimique des eaux

L'ensemble des deux sites traite entre 350 et 400 dossiers par jour.

Le logiciel utilisé comme support informatique est ANALYS (Inlog ; Limonest, France).

La SEL collabore avec cinq laboratoires privés du département ainsi qu'avec le laboratoire du Centre Hospitalier de ROCHEFORT. Il assure également un service 24H/24 pour la clinique de ROCHEFORT Groupe KAPA par le biais d'un système d'astreintes et de gardes assurées par les biologistes et les techniciens.

Toutes les analyses non effectuées au sein du laboratoire CRF ou des autres laboratoires du groupement sont transmises à des laboratoires spécialisés (CERBA, CYLAB,...).

L'effectif du laboratoire est de 28 personnes (cf. annexe 1). Toutes sont impliquées dans la démarche qualité du laboratoire.

### *1-2 Engagement du laboratoire dans la démarche qualité*

Les laboratoires d'analyses de biologie médicale sont actuellement soumis aux exigences du Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA : arrêté du 26 novembre 1999).

Un projet de réforme a été proposé, qui rendrait obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (rapport Michel Ballereau du 23 septembre 2008) dans les six ans qui suivront la parution des textes réglementaires.

Le laboratoire CRF adhère depuis trois ans à l'association Bioqualité qui accompagne les laboratoires adhérents dans leur démarche qualité. Cette démarche se déroule en deux phases :

- phase I : mise en place d'un système qualité
- phase II : qualification du laboratoire en vue de son accréditation.

Le laboratoire CRF a débuté la phase II en février 2008.

Depuis peu, une cellule qualité a été mise en place, elle a établi l'organisation du système qualité comme décrit en annexe 2.

Cette cellule se compose de sept personnes :

- deux Responsables Assurance Qualité (RAQ) : biologistes
- deux RAQ adjoints : responsable des ressources humaines et qualitiennne
- deux responsables du processus métier : techniciennne et qualitiennne
- une responsable du processus support : secrétaire.

La cellule qualité se réunit environ tous les deux mois : à chaque réunion, elle fait un bilan des actions en cours, propose un nouveau plan d'action avec des dates de réalisation et des responsabilités clairement définies.

### *1-3 Exigences réglementaires et normatives*

La pratique d'un contrôle de qualité interne pour chaque série d'analyses est une exigence de bonne pratique rappelée dans le GBEA au chapitre V-3 « Contrôle de qualité interne ». Il précise : *« le contrôle de qualité interne est indispensable pour permettre de déceler les anomalies et les erreurs des mesures pour y remédier immédiatement. Il est organisé par le biologiste. Il comporte toutes les mesures destinées à vérifier les différentes phases de l'activité permettant l'obtention des résultats, et notamment l'analyse d'échantillons de contrôle effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques. Les procédures opératoires doivent préciser la fréquence de passage des échantillons de contrôle et les valeurs acceptables pour chaque constituant. Elles doivent également comporter les instructions concernant les mesures à prendre en cas d'anomalies constatées ».*

Dans la norme ISO 15189, les exigences relatives au contrôle de qualité interne sont décrites dans le paragraphe 5-6 « Assurer la qualité des procédures analytiques » et mentionne que *« le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue. Il est important que ce système de maîtrise permette aux membres du personnel d'obtenir des informations claires et faciles à comprendre sur lesquelles baser leurs décisions techniques et médicales. Il convient de veiller particulièrement à éliminer les erreurs susceptibles de se produire dans le processus de traitement des échantillons, des prescriptions, des analyses, des comptes-rendus, etc. ».*

La norme ISO 15189 précise également que *« le laboratoire doit participer à des comparaisons inter laboratoires »* (programme de CQI inter-laboratoires ou participation à des évaluations externes de contrôle de qualité).

## **2- Présentation du projet : mise en place de contrôles de qualité internes sur un automate d'immuno-analyse**

### *2-1 Etat des lieux*

Le laboratoire exploite plusieurs automates d'immuno-analyse :

- Dxi 800 (Beckman Coulter ;Villemontais, France) : hormonologie, marqueurs tumoraux, hépatites A et B, sérologies de la toxoplasmose et de la rubéole, bilans thyroïdiens, ferritine, acide folique, vitamine B12
- LIAISON (DiaSorin ;Antony, France) : vitamine D, sérologies du virus d'Epstein Barr, du Cytomégalovirus, de l'herpès
- ETIMAX (DiaSorin ;Antony, France) : sérologies VIH, hépatite C, syphilis et Chlamydia Trachomatis

Pour ce secteur , dont je suis la responsable, plusieurs éléments ont été mis en place en vue d'une future accréditation :

- la base documentaire est disponible (procédures, modes opératoires, fiches d'instructions et d'enregistrements), la liste des documents associés à ce secteur est consultable en annexe 3 avec leur stade d'avancement.
- la validation des méthodes a été réalisée pour le Dxi 800 (par une stagiaire) et le LIAISON a été qualifié sur site par le fournisseur à l' installation. Sur ces deux automates, les contrôles de qualité internes (CQI) sont pratiqués de façon rigoureuse : le technicien vérifie quotidiennement que les valeurs observées pour chacun des échantillons de contrôle se situent dans les limites préétablies. Il édite chaque mois les courbes de Levey-Jennings qui sont étudiées par le responsable de la paillasse afin de détecter des dérives éventuelles et le cas échéant mettre en place des actions curatives ou des actions correctives.

Pour l'analyseur ETIMAX aucune démarche n'avait été entreprise dans cet objectif d'accréditation, c'est pourquoi j'ai choisi de cibler ce travail sur la mise en conformité des pratiques de CQI sur cet automate.

## 2-2 Intérêts et objectifs

Les recherches d'anticorps anti VIH, hépatite C et syphilis sont des analyses dites « sensibles » (directive européenne 98/79/CE). Nous effectuons ces analyses en utilisant des réactifs prêts à l'emploi dont les coffrets contiennent des échantillons de contrôle.

Etant donné le risque important qu'une erreur ferait courir aux patients, nous avons choisi de mettre en place un CQI indépendant des coffrets, comme cela est préconisé par le GBEA.

Les objectifs de cette pratique sont :

- Immédiatement : de réaliser pour chaque série d'analyse une validation analytique fiable du processus,
- A moyen et long termes : de repérer les dérives éventuelles qui pourraient survenir dans le processus analytique dans le temps.

Les objectifs de mon travail sont donc :

- d'organiser le déroulement du projet,
- d'informer et de faire participer la direction et le personnel,
- d'obtenir un résultat pérenne dans le temps.

## 3- Plan d'action

J'ai choisi d'utiliser le principe de la roue de Deming (PDCA) pour mettre en place mon projet.



L'organisation suivante en a résulté :

- Prévoir :
  - ▶ choix des échantillons de contrôle et du fournisseur,
  - ▶ rédaction des différents documents et diffusion,
  - ▶ information du personnel.

- Mettre en oeuvre :
  - ▶ détermination de la valeur cible,
  - ▶ étude de la reproductibilité intra-série,
  - ▶ étude de la stabilité des échantillons de contrôle,
  - ▶ automatisation du procédé.
  
- Evaluer –Contrôler :
  - ▶ règles de validation technique-analyses des résultats,
  - ▶ auto évaluation du CQI,
  - ▶ comparaisons inter laboratoires.
  
- Réagir –Améliorer :
  - ▶ mesures à prendre en cas d’anomalie.

#### 4- Organisation

La démarche étant identique pour les échantillons de contrôle des trois analyses, je décrirai uniquement le processus pour le contrôle de qualité des immunodosages des anticorps de la *sypilis*.

##### 4-1 Choix des échantillons de contrôle et du fournisseur

Mon objectif, dans un premier temps, a été de faire une étude comparative des produits proposés par différents fournisseurs pour la détection des anticorps anti *Treponema pallidum*. Ceci n’a pas été possible car je n’ai trouvé qu’un seul fournisseur : la société Bio-Rad (Marnes La Coquette) (idem pour les contrôles HIV et HCV).

J’ai étudié les caractéristiques de l’échantillon de contrôle Liquichek ToRCH Plus Control® d’après leur catalogue :

- La période de validité : suite aux renseignements fournis par le service commande de la société Bio-Rad (lot en cours, date de péremption) et la possibilité de réserver le même lot jusqu’à sa date d’expiration, j’ai calculé le volume nécessaire pour établir un abonnement.
- La forme : les échantillons de contrôle se présentent sous forme liquide, ce qui élimine d’éventuelles erreurs dues à une mauvaise de reconstitution des produits lyophilisés.

- La stabilité : les analytes à doser sont stables dans les préparations de contrôle jusqu'à la date de péremption en flacon fermé, et un mois après ouverture. Le volume du produit par flacon est de 3ml, la quantité mensuelle nécessaire de 1ml . Afin d'optimiser l'utilisation de la totalité de la préparation, je me suis renseignée auprès des services techniques de la société Bio-Rad pour obtenir des données concernant la stabilité à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La congélation des produits sous forme liquide est déconseillée. Le fournisseur préconise que chaque laboratoire effectue un test de stabilité au delà du mois préconisé, afin de vérifier la stabilité dans le temps. J'ai donc programmé cette évaluation dans le cadre de ce projet.
- Choix des niveaux de concentration des échantillons de contrôle : le laboratoire Bio-Rad propose deux niveaux différents de contrôle, un positif et un négatif. Etant donné le coût de ces échantillons, j'ai choisi le niveau positif.

Les caractéristiques de ce contrôle me semblant très satisfaisantes, j'ai établi un abonnement chez ce fournisseur.

#### *4-2 Rédaction des documents*

Je me suis servi du cours de Madame VASSAULT « Procédure de gestion du contrôle de qualité interne » qui proposait un document regroupant toutes les informations nécessaires. En annexe à ce document était proposé une fiche technique par échantillon qui n'existait pas au laboratoire. Ce document est rédigé sous forme de fiches d'enregistrements, inclus dans la base documentaire, qui sera directement applicable à tous les automates du laboratoire. Il est présenté en annexe 4 .

### 4-3 Information du personnel

J'ai rédigé une note de service à l'attention de tous les technicien(ne)s travaillant sur l'automate ETIMAX : je leur ai expliqué le but de mon travail et indiqué le lieu de stockage du CQI. Dans un premier temps, l'échantillon de contrôle n'étant pas titré, nous avons quotidiennement analysé l'échantillon de contrôle retenu dans des conditions similaires à celles pratiquées pour les échantillons provenant des patients pour calculer la valeur cible. J'ai mis à disposition un tableau permettant de relever les valeurs du contrôle chaque jour. Ainsi, j'ai pu faire participer un grand nombre de technicien(ne)s en les sensibilisant à l'importance d'une telle pratique.

## 5- Mise en place

### 5-1 Détermination de la valeur cible

Du fait même de la nature non titrée du CQI, la valeur cible doit être déterminée pour avoir une référence dans le laboratoire . Pour cela, le CQI a été testé dans vingt séries différentes et sa valeur a été relevée à chaque fois . A partir de ces données, on peut calculer la moyenne, le CV et l'écart type qui seront nos indicateurs de performance.

Contrôle	Valeur (Index)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Syphilis	15,91	14,86	14,52	14,41	14,22	14,74	15,20	16,23	15,37	16,11

Contrôle	Valeur (Index)									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Syphilis	15,19	13,61	14,66	15,59	15,40	14,94	15,32	16,07	15,60	15,12

Moyenne (Index)	15,15
Ecart type	0,68
CV (%)	3,39

Si l'on admet que les résultats alarmants doivent être détectés au fur et à mesure qu'ils s'écartent de plus de trois écarts types, les limites seront comprises entre 13,11 et 17,19 unités (Index). A noter qu'une attention doit être apportée chaque fois que les résultats s'écartent de plus de deux écarts types, ce que nous verrons dans l'analyse des résultats.

Dans la fiche technique de ce contrôle, quelques valeurs cibles ont été déterminées pour certains automates mais ce n'est pas le cas de l'ETIMAX (DiaSorin). Je n'ai donc pas pu confronter nos résultats pour en évaluer la justesse. Cependant celle-ci peut être évaluée par un programme de contrôle de qualité externe, ce point sera abordé plus tard.

En revanche, en regardant la notice technique du coffret que nous utilisons (cf. annexe 5), j'ai pu constater que des tests de reproductibilité avaient été effectués par le fournisseur : les CV admissibles trouvés sont, sur différents lots de réactifs étudiés, de 4 à 6.2 %. Le CV trouvé étant inférieur, on peut en déduire que notre technique présente une reproductibilité du même ordre.

#### *5-2 Etude de la reproductibilité intra-série*

Elle se définit comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesures successives du même mesurande, les mesures étant effectuées dans les mêmes conditions. On l'appelle aussi répétabilité. Elle est estimée par les paramètres d'évaluation de la dispersion autour de la moyenne : coefficient de variation et écart type .

Pour déterminer ces paramètres, le CQI a été programmé vingt fois dans la même série.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

Contrôle	Valeur (Index)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Syphilis	12,52	12,70	12,13	12,24	12,15	11,94	12,23	12,49	12,62	12,48

Contrôle	Valeur (Index)									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Syphilis	12,40	12,33	11,96	12,20	12,13	12,54	12,57	12,50	12,34	12,18

Moyenne (Index)	12,49
Ecart type	0,23
CV (%)	1,15

Les résultats de CV obtenus sont très largement inférieurs à ceux décrits dans la notice technique du coffret (5.57 %), la technique présente une répétabilité conforme à celle du fournisseur du coffret réactif (DiaSorin). En revanche, j'ai effectué cette étude plusieurs mois après la détermination de la valeur cible, et j'ai pu constater que la valeur en index de l'échantillon de contrôle s'est beaucoup écartée de sa valeur cible, il faudra en analyser les causes.

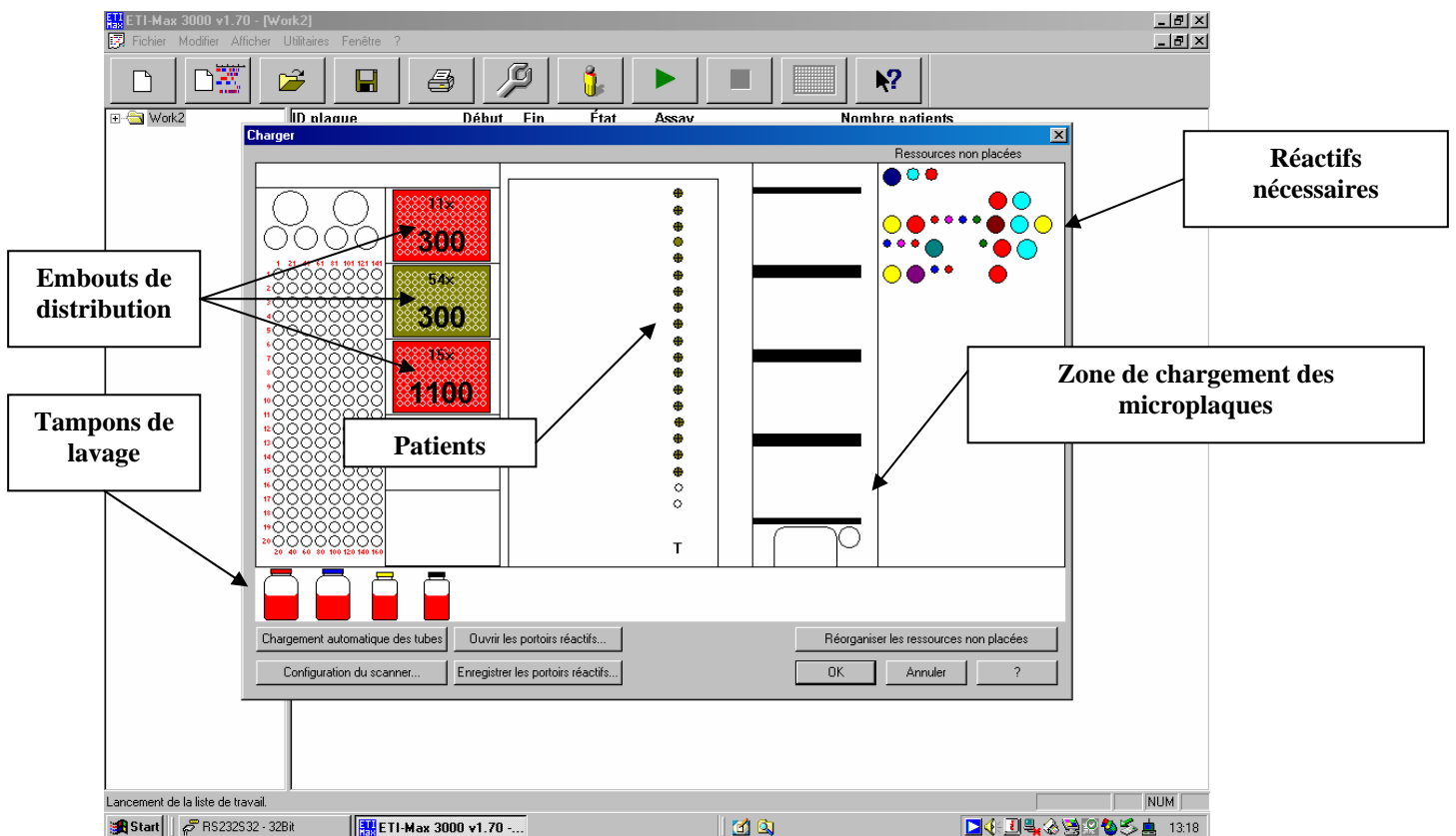
### *5-3 Etude de la stabilité*

La fiche technique du fournisseur indique que la stabilité de l'échantillon de contrôle est assurée pendant 30 jours après ouverture du flacon. Or le contenu du flacon (3 ml) pourrait nous servir pendant trois mois d'où une étude de la stabilité pour optimiser le coût de cette pratique. Pour cela, j'utiliserai l'échantillon de contrôle pendant trois mois, et j'observerai les valeurs au cours du temps par rapport à un autre flacon utilisé dans les mêmes conditions en cours de validité (un mois). A l'heure actuelle, cette étude de stabilité n'est pas encore achevée.

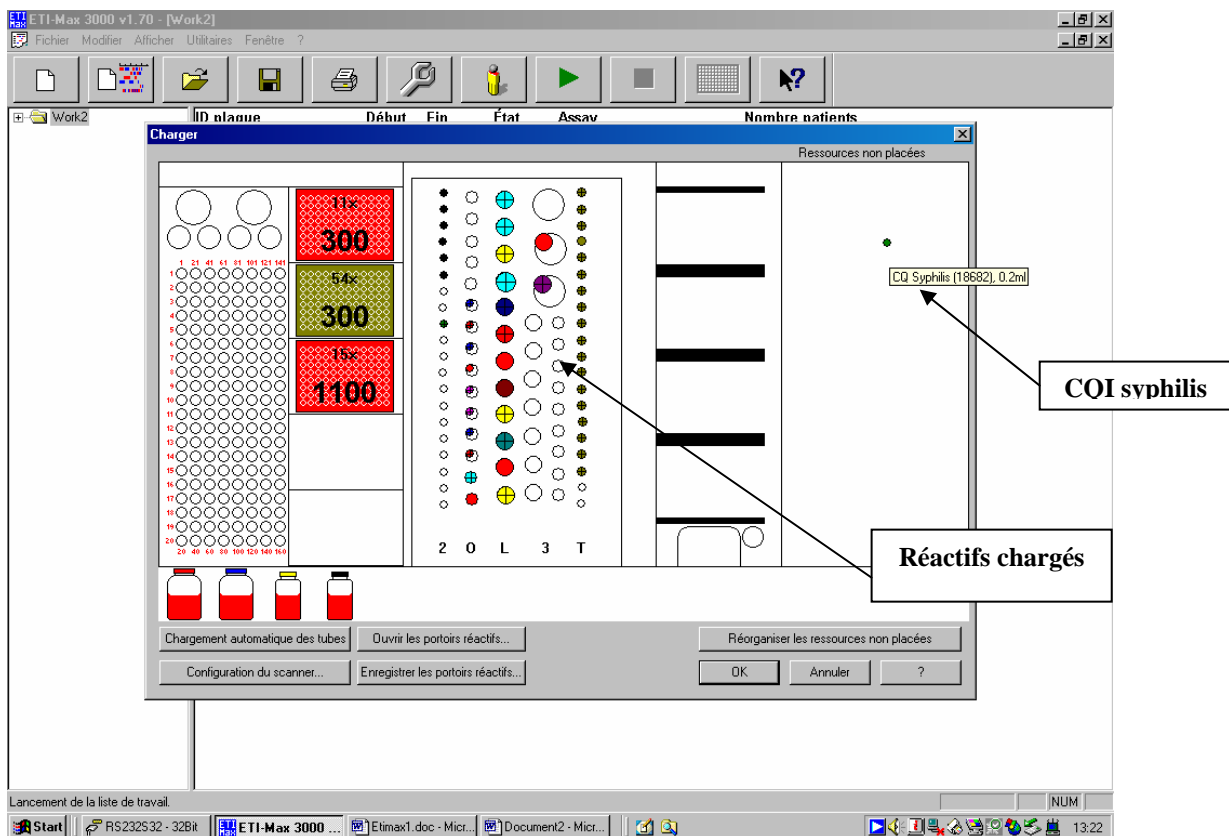
### *5-4 Automatisation du procédé*

Pour effectuer tous les tests précédents, l'échantillon de contrôle a été programmé de la même façon que les échantillons de patients. Ce procédé était source d'oubli (programmation manuelle, plusieurs techniciens sur le poste, etc.). Il fallait donc trouver un moyen d'intégrer ce CQI dans la technique pour en avoir une utilisation suivie et pérenne. J'ai donc contacté l'ingénieur d'application de la société DiaSorin. Il m'a donné les instructions suivantes : étant donné que l'automate ne démarre que s'il a à bord tous les réactifs nécessaires, le protocole d'essai a été modifié en y intégrant l'échantillon de contrôle. Pour cela, un code-barre lui a été attribué : lorsque l'automate lit le code-barre, celui-ci lui renvoie l'information que l'échantillon concerné est un contrôle interne de qualité. Les données de ce CQI seront donc intégrées dans l'analyseur, permettant ainsi d'établir les courbes de Levey Jennings.

Le principe est décrit sur le schéma suivant :



Une fois les réactifs chargés, il reste :



On peut constater que si le CQI n'est pas à bord de l'automate, le test ne pourra pas démarrer. Notre objectif pour ne pas l'oublier à chaque série est donc atteint.

Les schémas suivants illustrent la reconnaissance de l'échantillon de contrôle par l'analyseur comme un CQI :

Avant l'automatisation :

ETI-Max 3000 v1.70 - [31.03.09 BW.res]

Fichier Modifier Afficher Utilitaires Fenêtre ?

31.03.09 BW

If 'Sample<LP'0.9' Then Result:=NEG'  
If 'Sample>LP' Then Result:=POS'  
Résultat par défaut :=DTX

Seuil = LP = 0.398

POS Indicates a positive result  
DTX Indicates an equivocal result  
NEG Indicates a negative result

**Résultats quantitatifs**

X = Sample/LP

**Rapport combiné**

Puits	ID Patient	O.D. D.O	Resultat	Index	Remarques
A1	NC1	0.056	NC1	0.141	
B1	LP1	0.397	LP1	1.000	
C1		0.399	LP1	1.000	
D1	PC1	1.784	PC1	4.482	
E1	1090330288	0.040	NEG	0.101	
F1	1090331027	0.044	NEG	0.111	
G1	1090331041	0.049	NEG	0.123	
H1	1090331065	0.046	NEG	0.116	
A2	1090331107	0.039	NEG	0.098	
B2	1090331142	0.048	NEG	0.121	
C2	1090331230	0.041	NEG	0.103	
D2	TORCH PLL	6.128	POS	15.397	Manual ID

Contrôles de trousse

Patients

CQI

Pour l'Aide, appuyer sur F1

NUM

Start RS232S32 - 32Bit ETI-Max 3000 v1.70 Etimax3.doc - Microsoft W...

09:15

On voit les résultats des contrôles du coffret (NC, LP et PC), ainsi que les résultats des patients et leur interprétation. On peut constater que le CQI syphilis Liquechek ToRCH Plus Control® apparaît dans la colonne patient car c'est le technicien qui l'a programmé manuellement.

Après l'automatisation :

ETI-Max 3000 v1.70 - [24.07.09 bw.res]

Fichier Modifier Afficher Utilitaires Fenêtre ?

24.07.09 bw

DTX Indicates an equivocal result  
NEG Indicates a negative result

Résultats quantitatifs

X = Sample/LP

Rapport combiné

Puits	ID Patient	O.D. D.O	Resultat	Index	Remarques
A1	NC1	0.059	NC1	0.118	
B1	LP1	0.501	LP1	1.000	
C1		0.498	LP1	1.000	
D1	PC1	2.212	PC1	4.428	
E1	1090723044	0.047	NEG	0.094	
F1	1090723101	0.052	NEG	0.104	
G1	1090723252	0.072	NEG	0.144	
H1	1090723260	0.061	NEG	0.122	
A2	1090723262	0.039	NEG	0.078	
B2	1090723263	0.449	NEG	0.899	
C2	1090723270	0.052	NEG	0.104	
D2	1090724002	0.055	NEG	0.110	
E2	1090724193	0.045	NEG	0.090	
F2	1090724205	0.053	NEG	0.106	
G2	1090724237	0.071	NEG	0.142	
H2	CQ1	6.275	CQ1	12.563	

Pour l'aide, appuyer sur F1

NUM

Start RS232S32 - 32Bit ETI-Max 3000 v1.70 ... 09:11

CQI distinct des patients

Une nouvelle ligne apparaît avec les résultats du CQI, résultats qui seront intégrés par l'automate pour tracer les courbes de Levey Jennings comme nous le verrons plus loin.

## 6- Evaluation – Amélioration

### 6-1 Règles de validation technique – Analyse des résultats

La première condition à remplir pour valider la série est que le résultat du dosage des échantillons de contrôle contenus dans le coffret soit dans les limites acceptables : à la fin de l'analyse, une mention « Réussi » ou « Echec » apparaît sur le compte-rendu des résultats. Si cette condition n'est pas remplie, la série est automatiquement rejetée. L'analyse des causes devra être effectuée pour que la série suivante ne soit pas dans le même cas.

On devra désormais, outre les échantillons de contrôle du coffret, prendre en considération les résultats du CQI en appliquant les règles de Westgard.

Interprétation immédiate :

⇒ si les résultats sont compris entre moyenne +/- 3 ET

- la série peut être validée,
- les résultats patients sont validés.

⇒ si les résultats s'écartent de moyenne +/- 3 ET

- la série n'est pas validée,
- les résultats des patients ne sont pas validés,
- il faut analyser le type d'erreur.

### Les différents types d'erreurs :

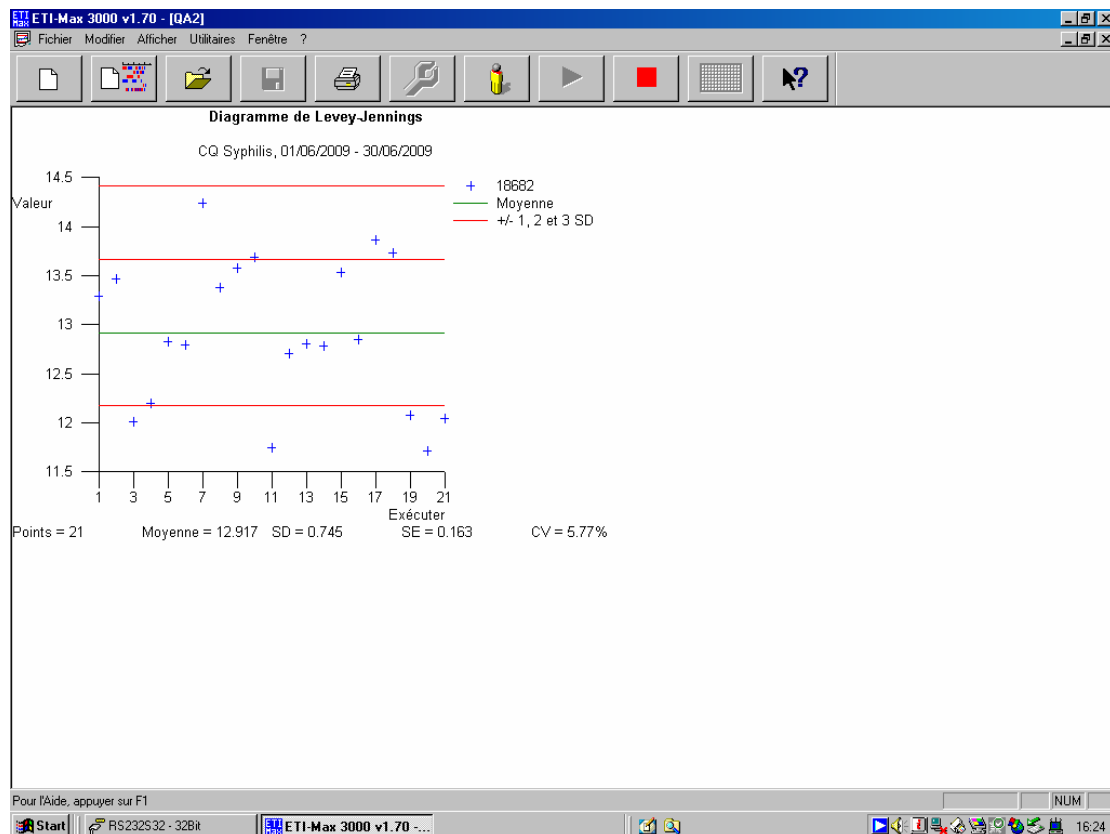
- erreurs systématiques : elles sont détectées par l'évaluation de la justesse, qui sera mise en évidence grâce à la valeur cible déterminée par le laboratoire,
- erreurs aléatoires = erreurs de reproductibilité : elles correspondent à de l'imprécision, déterminée par la variation de l'écart type,
- erreurs grossières : ce sont des erreurs de spécificité (problèmes de réactifs, souillures etc.).

Il faudra donc porter une attention toute particulière au couple échantillons de contrôle du coffret – CQI pour savoir quelles mesures prendre en cas d'anomalie.

Interprétation à moyen et long terme :

Le suivi des résultats cumulés, par le biais de l'analyse des courbes de Levey Jennings, permet de contrôler les variations (mensuelles, annuelles) et de corriger d'éventuelles dérives avant que celles-ci n'entraînent des erreurs.

Le diagramme du mois de juin 2009 pour le CQI syphilis est présentée ci-dessous :



On peut constater que les différentes valeurs du CQI se situent dans l'intervalle moyenne +/- 2 ET pendant tout le mois : il n'y a donc pas d'erreur détectée.

Le CV obtenu est inférieur au CV admissible de reproductibilité, éliminant ainsi toute erreur d'imprécision. L'écart type est sensiblement identique.

En revanche, la moyenne obtenue est plus faible que celle déterminée lors du début des essais : un paramètre a changé, le lot de réactif utilisé. Il semblerait qu'un changement de lot de réactif puisse entraîner un décalage des valeurs. Etant donné que nous ne pouvons évaluer la justesse, on surveillera uniquement l'écart type et le coefficient de variation pour détecter les éventuelles dérives.

### 6-2 Auto évaluation du CQI

Pour évaluer cette nouvelle pratique au sein du laboratoire, je me suis servi du questionnaire d'audit « Questionnaire d'audit interne dans un LABM. Guez P, Vassault A et col. Ann Biol Clin (Paris).2002, 111-22. » pour faire une auto évaluation des nouveaux CQI mis en place **sur l'analyseur ETIMAX.**

- Le laboratoire participe-t'il au Contrôle de Qualité National ? OUI
- Le contrôle qualité interne est-il pratiqué sur l'ensemble des analyses ? OUI
- Existe-t-il un programme de Contrôle de Qualité Externe sur l'ensemble des analyses effectuées ? OUI
- Les modes opératoires précisent-ils la fréquence de dosage des échantillons de contrôle ? OUI
- Les modes opératoires précisent-ils les limites d'acceptabilité des échantillons de contrôle ? OUI (dans la fiche technique)
- Les modes opératoires précisent-ils les mesures à prendre en cas d'anomalie constatée ? NON
- Echantillons de contrôle et étalons sont-ils utilisés distinctement ? OUI : les échantillons de contrôle du coffret peuvent être assimilés à des étalons (calibration à chaque série à partir de ces échantillons), le CQI est bien utilisé distinctement.

En analysant les résultats de cette auto évaluation, on constate qu'il faut modifier le mode opératoire de l'automate pour y inclure les mesures à prendre en cas d'anomalie.

### *6-3 Comparaisons inter-laboratoires*

Le laboratoire est abonné auprès de l'association Biologie Prospective (Villers Les Nancy) pour un programme de contrôle externe de qualité de syphilis. Ce programme comprend trois échantillons par an. L'échantillon de contrôle CQE est enregistré informatiquement, analysé de façon identique aux échantillons de patients, ainsi les résultats sont conservés par le biais du système informatique. Les résultats du CQE sont saisis par la biologiste responsable des CQE (ou à défaut par le responsable de paillasse) sur le site Internet du fournisseur. Un rapport est ensuite transmis au laboratoire pour analyse des résultats. Nous n'avons pas encore reçu le premier rapport pour exploiter les résultats.

### *6-4 Mesures à prendre en cas d'anomalie : actions correctives*

Les mesures à prendre en cas d'anomalie varient selon le type d'erreur constatée .

Il faut en premier lieu identifier cette erreur par le calcul du biais et du rapport entre la valeur observée et la valeur cible.

En cas d'erreur :

- systématique : vérifier l'aspect des réactifs, les dates de péremption, les conditions opératoires de la réaction, la stabilité des réactifs et des contrôles, et prêter une attention particulière lors d'un changement de lot.
- aléatoire : vérifier la qualité du système de prélèvement et du système optique (vérification du spectrophotomètre).
- grossière : identifier et éliminer l'erreur (souillure, etc.).

## **7- Difficultés rencontrées**

La plus importante difficulté a été l'interprétation des résultats. En effet, le logiciel de l'automate traite de façon très succincte les résultats des contrôles de qualité. Il est impossible d'indiquer la valeur cible du CQI, c'est le logiciel qui ajuste sa valeur en l'incrémentant à chaque série. Les courbes de Levey Jennings et l'interprétation qui en résulte sont donc faussées.

Ce manque de performance de l'automate ne permet pas une analyse réaliste et optimale des résultats du CQI qui vient d'être mis en place.

Le laboratoire a pour projet d'utiliser une nouvelle fonctionnalité du logiciel ANALYS qui permet de centraliser les résultats de tous les CQI du laboratoire, afin d'en assurer une meilleure exploitation.

L'autre difficulté rencontrée a été l'étude de la stabilité. Le temps m'a manqué pour finaliser cette étude. Celle-ci est actuellement en cours de réalisation, et si la stabilité se révèle bonne après les trois mois d'utilisation, je modifierai la fiche technique du CQI en précisant qu'une étude a été réalisée au sein du laboratoire.

## **8- Conclusion**

Les objectifs de ce travail ont été partiellement réalisés.

La mise en place des CQI sur l'analyseur ETIMAX est effective, leur utilisation quotidienne et automatisée. Les documents qualité associés sont rédigés ou en cours de rédaction. Les tests de reproductibilité intra et inter séries ont été effectués et se révèlent concluants.

Les règles de validation technique sont établies mais l'analyse des résultats reste à être optimisée. Le projet d'un nouveau logiciel de traitement des résultats des différents CQI permettra de finaliser le projet. Le type d'erreur pourra clairement être identifié et ainsi corrigé. L'effet des changements de lots de réactifs pourra également être étudié.

## BIBLIOGRAPHIE

- ▶ GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses  
Arrêté du 26 novembre 1999, modifié par l'arrêté du 26 avril 2002
  
- ▶ Norme NF EN ISO 15189  
Laboratoires d'analyses de biologie médicale  
Exigences particulières concernant la qualité et la compétence
  
- ▶ Document COFRAC LAB GTA06  
Révision 00 – Juillet 2005  
Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale
  
- ▶ W. Gregory COOPER  
Leçons de base de contrôle de qualité  
Bio-Rad Laboratories, Inc.  
2007, Etats Unis
  
- ▶ A.VASSAULT, G.DUMONT, D.LABBE  
Contrôle de qualité intra-laboratoire – Procédure générale  
Cahier de formation biochimie, 1994
  
- ▶ P.GUEZ, A.VASSAULT et col.  
Questionnaire d'audit interne dans un LABM  
Ann. Biol. Clin. (Paris) 2002, 111-22.
  
- ▶ Cours du Diplôme Universitaire :
  - maîtrise des techniques d'analyse
  - contrôle de qualité : généralités
  - procédure de gestion du contrôle de qualité interne

## ANNEXES

**Annexe 1** : Organigramme du laboratoire

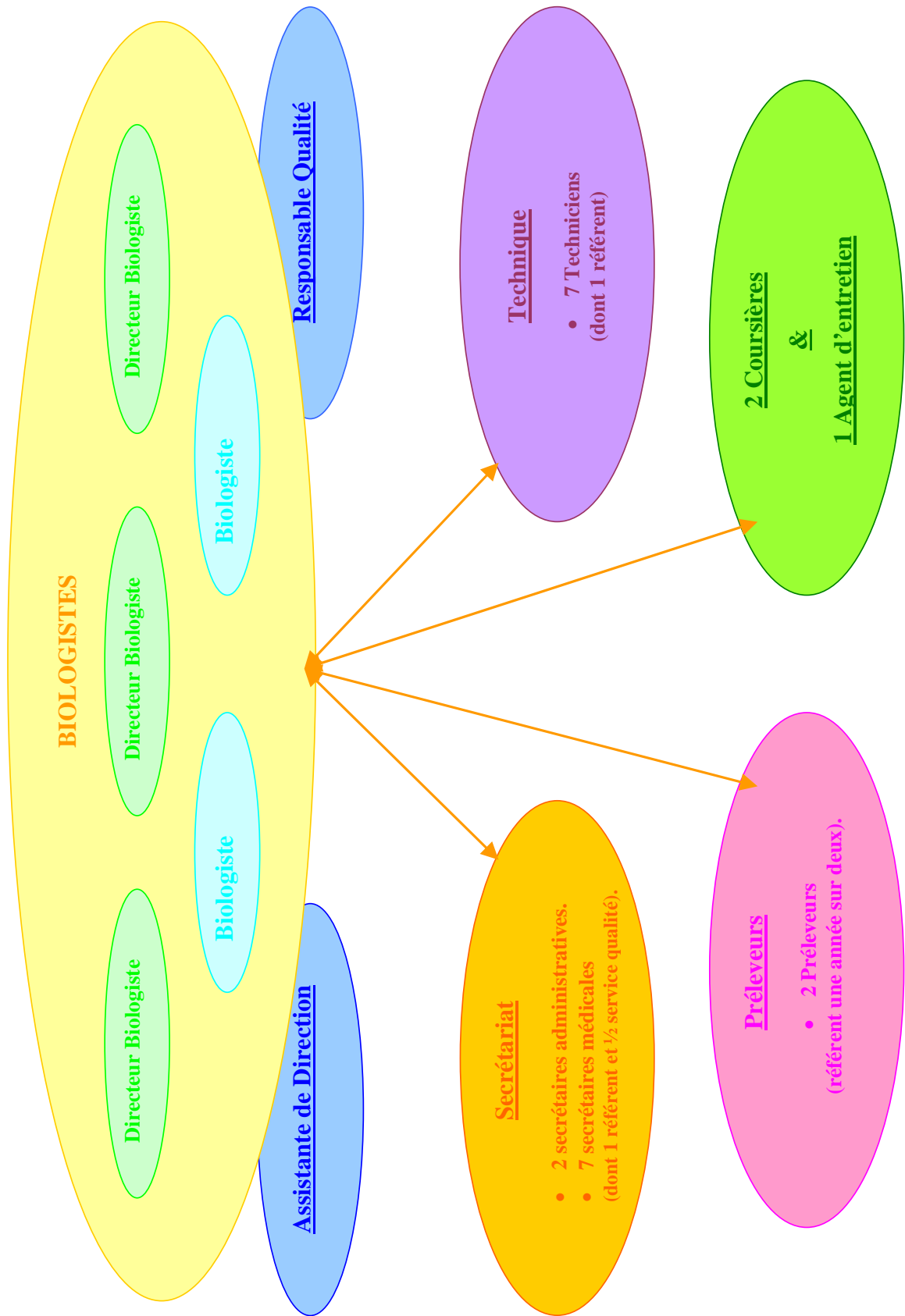
**Annexe 2** : Organisation de la cellule qualité

**Annexe 3** : Liste des documents associés au poste d'immuno-analyse

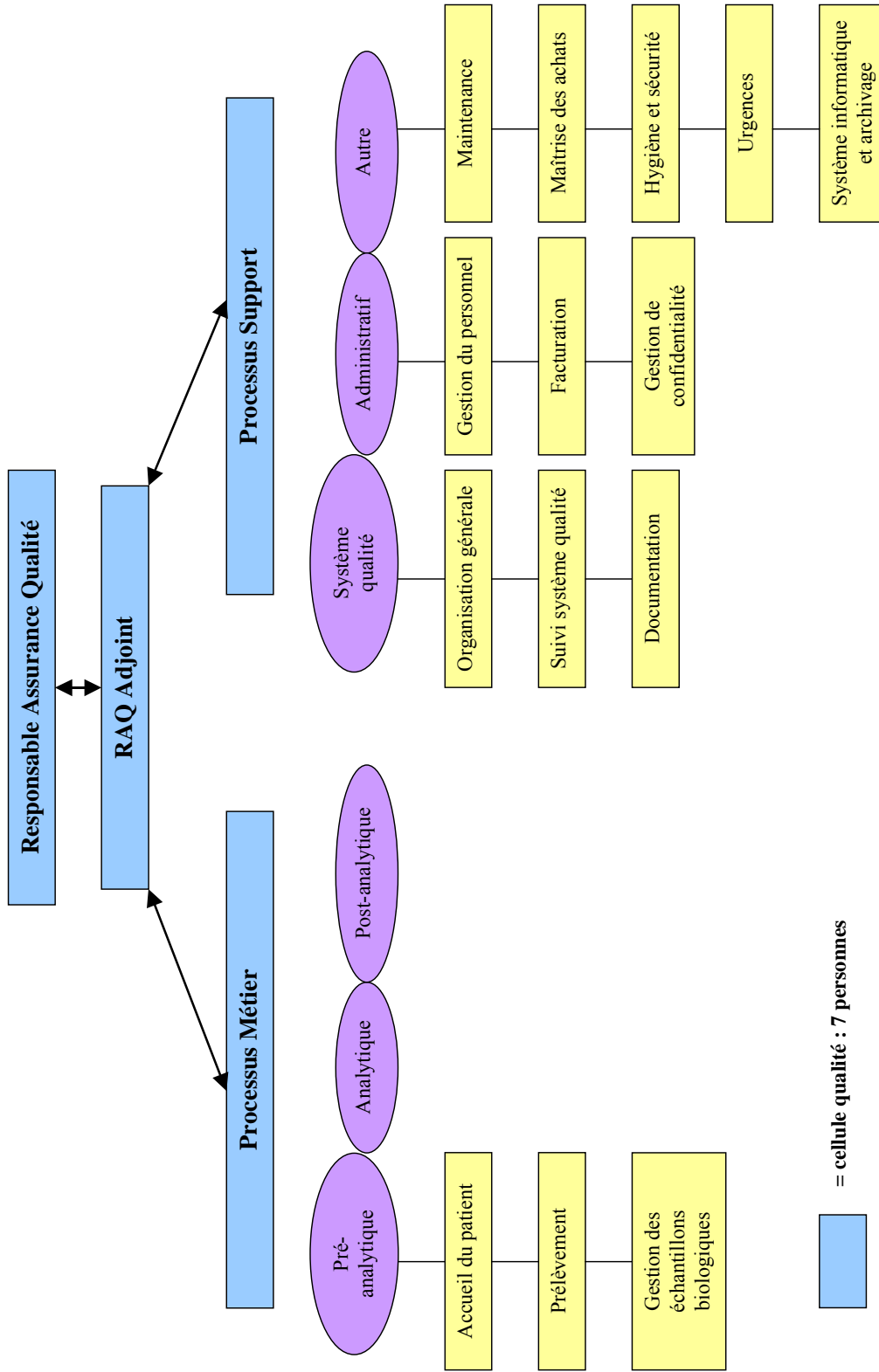
**Annexe 4** : Fiche technique pour contrôle de qualité interne

**Annexe 5** : Notice technique du coffret syphilis DIASORIN

Annexe 1



Annexe 2



## Annexe 3



## Etat des lieux au 20 juillet 2009

### Liste des documents qualité associés au poste d'immuno analyse

	Intitulé	Version	Etat d'avancement
<b>B4 - Maîtriser les non-conformités</b>			
B4 - ENR 05	Fiche de non-conformité pour la technique	A	Valider
<b>C3 – Gérer les échantillons biologiques</b>			
C3 - PR 01	Réception des échantillons	B	Valider
C3 - PR 02	Transport, manipulation et conservation des échantillons	B	Valider
C3 - PR 03	Sous-traitance des analyses	B	Valider
C3 - INS 01	Aliquotage des échantillons biologiques	B	Valider
C3 - INS 02	Centrifugation des échantillons biologiques	B	Valider
C3 - INS 03	Conservation des échantillons biologiques	B	Valider
C3 - INS 04	Gestion de la sérothèque	B	En cours
Chapitre D – ANALYTIQUE			
<b>D1 - Gestion des contrôles et des calibrations</b>			
D1 - PR 01	Validation technique - Gestion des calibrations et des contrôles qualité	B	En cours
D1 - INS 01	Changement des contrôles pour LH 750	B	Valider
D1 - INS 02	Préparation des contrôles de qualité interne (CQI) de l'automate Dxl	B	Valider
D1 - INS 03	Enregistrement informatique des contrôles qualité externe (CQE)	A	En cours
D1 - ENR 01	Enregistrement du Contrôle de Qualité National	B	En cours
D1 - ENR 02	Fiche technique pour contrôle de qualité interne (CQI)	A	Valider
<b>D2 - Validation technique</b>			
D2 - PR 01	Validation analytique	B	En cours
D2 - INS 01	Critères de repasse d'un échantillon	B	En cours
<b>D3 - Utilisation des matériels</b>			
D3 - MO 13	Utilisation de l'Etimax 3000	A	En cours
D3 - MO 14	Utilisation de l'Unicel Dxl 800	A	En cours
D3 - MO 16	Utilisation du LIAISON	A	En cours
D3 - INS 04	Archivage informatique des données du Dxl	B	Valider

	Intitulé	Version	Etat d'avancement
<b>D4 - Réalisation des analyses</b>			
D4 - INS 35	Toxoplasmose – Test d'agglutination au latex	A	Valider
D4 - INS 36	Dosage des folates érythrocytaires	A	Valider
D4 - INS 37	Test au latex pour la détermination du facteur rhumatoïde sérique	A	Valider
D4 - INS 38	Réaction de Waaler-Rose	A	Valider
D4 - INS 39	VDRL Technique manuelle	A	Valider
D4 - INS 40	TPHA Technique manuelle	A	Valider
D4 - INS 50	Détermination quantitative du facteur rhumatoïde par Hémagglutination indirecte	A	Valider

<b>Chapitre E - POST - ANALYTIQUE</b>			
<b>E1 - Validation biologique</b>			
E1 - ENR 01	Grille des critères d'alerte	C O U D	En cours
<b>Chapitre J - MAINTENANCE DES EQUIPEMENTS</b>			
<b>J1 - Assurer la maintenance des automates</b>			
J1 - PR 01	Maintenance	B	Valider
J1 - PR 02	Remplacement en cas de panne	B	Valider
J1 - ENR 01	Fiche de suivi des pannes	B	Valider
<b>K2 - Achat et stockage des réactifs et produits consommables</b>			
K2 - INS 04	Utilisation du menu « Achats » du logiciel Sapanet	A	Valider
K2 - INS 05	Utilisation du menu « Stocks » du logiciel Sapanet	A	Valider
K2 - INS 06	Comment déstocker pour le Dxl	A	Valider
K2 - INS 07	Comment déstocker pour le LIAISON	A	Valider
K2 - INS 14	Comment déstocker pour l'Etimax	A	Valider
<b>Chapitre L - HYGIENE, SECURITE, ENVIRONNEMENT</b>			
<b>L1 - Hygiène et sécurité des personnes</b>			
L1 - INS 01	Conduite à tenir en cas d'accident	C	En cours
L1 - ENR 01	Document unique	A	En cours
<b>L2 - Gérer les déchets</b>			
L2 - PR 01	Elimination des déchets	C	En cours
L2 - MO 01	Elimination des déchets des automates	B	En cours

## Annexe 4



## D1 - ENR 02 Version A

### Fiche technique pour contrôle de qualité interne

Date de mise en application : 22 janvier 2009

#### Identité

Nom du CQI : Liquicheck Torch Plus

Fournisseur : BIORAD

Référence : 227

Analyseur : ETIMAX

Date de début du programme : 24.02.09

N° de lot : 18682

Date de péremption : 31.03.11

Conditionnement : 3 x 3 ml

Nombre de niveaux : 1

Analyses contrôlées : Syphilis

#### Préparation-stockage-stabilité

Forme : liquide

Température de stockage : 4-8 C

Lieu de stockage : frigo R2

Pré traitement : aucun

Stabilité avant ouverture : date de péremption

Stabilité après ouverture : 30 jours

Valeur cible : 13.11 – 17.19 (ET=0.68 ; CV=3.39%)

Mis à jour par Cécile Rocourt

Validé par Mireille Schoeffler

## Annexe 5



DiaSorin S.p.A.  
Strada per Crescentino - 13040 Saluggia (Vercelli) - Italy  
Tel. 39.0161.487.093 - Fax 39.0161.487.628



## ETI-TREPONEMA PLUS (N0148, N0149)

**Test ELISA de troisième génération pour la détection d'anticorps IgG et IgM  
contre le *Treponema pallidum* dans du sérum ou du plasma humain**

**1. SOMMAIRE**

La syphilis est une maladie causée par une bactérie de forme spiralée appelée *Treponema pallidum*, normalement transmise par voie sexuelle. Elle peut également être transmise verticalement par la barrière placentaire, de la mère au fœtus, ou par transfusion sanguine. Le diagnostic sérologique de la syphilis se réalise en démontrant la présence de niveaux significatifs d'anticorps spécifiques contre le *Treponema pallidum* dans le sérum du patient. La méthode de référence est le FTA-Abs, une technique qui permet la détection simultanée d'IgG et d'IgM. Cette approche reste toutefois très laborieuse et son interprétation compliquée. Il existe d'autres méthodes qui simplifient le diagnostic sérologique: réaction avec des antigènes lipidiques (tests réaginaires) ou d'agglutination d'érythrocytes recouverts d'antigènes spécifiques de *Treponema pallidum* (tests d'hémagglutination ou TPHA). Le TPHA est le test le plus utilisé pour le dépistage, car il détecte simultanément les IgG et les IgM. Cependant, le résultat nécessite une interprétation subjective tant le test ne peut être automatisé dans sa totalité. Le ETI-TREPONEMA PLUS est un test qui détecte également les IgG et les IgM, et permet le dépistage de la maladie par la technique ELISA, une méthode économique qui s'accorde parfaitement avec le TPHA et peut être entièrement automatisée. Le test ETI-TREPONEMA PLUS utilise des antigènes recombinants immunodominants p15, p17 et p47, et une protéine recombinante supplémentaire (brevet en attente) qui en améliore la sensibilité.

**2. PRINCIPE**

Le ETI-TREPONEMA PLUS est un test immuno-enzymatique de troisième génération pour la détermination d'anticorps IgG et IgM anti-*T. pallidum* en sérum ou plasma. Les échantillons à analyser sont incubés dans des puits d'une microplaque recouverts d'antigènes recombinants p15, p17 et p47 de *T. pallidum*. Les anticorps IgG et IgM spécifiques présents dans l'échantillon se combineront avec les antigènes de la phase solide. Ensuite, les puits sont lavés pour extraire l'échantillon résiduel et des antigènes recombinants p15, p17 et p47 de *T. pallidum* conjugués avec l'enzyme peroxydase sont ajoutés. Le conjugué réagira avec les anticorps spécifiques anti-*T. pallidum* capturés dans la première incubation. Après un autre lavage pour éliminer le matériel non lié, l'on procède à une incubation avec une solution de substrat enzymatique et chromogène. Cette solution deviendra bleue si l'échantillon contient des anticorps anti-*T. pallidum*. Le bleu passe au jaune après avoir arrêté la réaction avec de l'acide sulfurique. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-*T. pallidum*.

**3. COMPOSANTS**

1. **MCPL** MICROPLAQUE: 12 x 8 puits recouverts d'antigènes recombinants p15, p17 et p47 de *T. pallidum*. Puits séparables individuellement.
2. **CONJ 51x** CONJUGUÉ CONCENTRÉ: Antigènes recombinants p15, p17 et p47 de *T. pallidum* conjugués avec de la peroxydase. Contient du colorant rouge, des protéines stabilisatrices, du mertiolate de sodium à 0,02% et du sulfate de gentamicine à 0,001%. À diluer à 1/51 dans le diluant du conjugué avant utilisation.
3. **DIL CONJ** DILUANT DU CONJUGUÉ: Tampon TRIS contenant du colorant jaune, des additifs, du mertiolate de sodium à 0,02% et de sulfate de gentamicine à 0,001%.
4. **DIL SAMP** DILUANT DES ÉCHANTILLONS: Tampon TRIS contenant des additifs, du mertiolate de sodium à 0,01%, et un colorant pourpre. Prêt à l'emploi.
5. **WASH SOLN 10x** SOLUTION DE LAVAGE: Tampon de phosphate concentré (10x) contenant du Tween 20 à 1% et du mertiolate de sodium à 0,01%. À diluer à 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.
6. **SUBS TMB** CHROMOGÈNE/SUBSTRAT: Système composé de tétraméthylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène. Prêt à l'emploi.
7. **CONTROL + H** CONTRÔLE POSITIF HAUT: Sérum humain dilué contenant des anticorps anti-*T. pallidum*. Contient < 0,1% de l'azide de sodium et un colorant vert. Prêt à l'emploi.
8. **CONTROL + L** CONTRÔLE POSITIF BAS: Sérum humain dilué contenant une faible concentration d'anticorps anti-*T. pallidum*. Contient < 0,1% de l'azide de sodium et un colorant vert. Prêt à l'emploi.
9. **CONTROL -** CONTRÔLE NÉGATIF: Sérum humain dilué, négatif pour anticorps anti-*T. pallidum*. Contient < 0,1% de l'azide de sodium et un colorant bleu. Prêt à l'emploi.
10. **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N** SOLUTION D'ARRÊT (seulement dans le coffret de 1 plaque): Acide sulfurique 1 N. Prêt à l'emploi.

11. **SEALS** LAMELLES ADHÉSIVES: Pour couvrir la microplaque pendant les incubations.

12. **BAG** SAC EN FEUILLE ALUMINIUM: Pour conserver les barrettes non utilisées.

#### 4. PRÉCAUTIONS

ETI-TREPONEMA PLUS est destiné à un usage diagnostique IN VITRO.

Utilisation réservée aux professionnels.

ATTENTION: MATÉRIEL À RISQUE BIOLOGIQUE.

Tout le matériel d'origine humaine utilisé dans le cadre de la préparation de ce produit a donné des résultats négatifs quant à la présence d'anticorps anti-HIV-1/HIV-2 et HCV, de même qu'à celle de l'antigène de surface de l'hépatite B, en utilisant une méthode commerciale autorisée. Compte tenu du fait qu'aucune méthode n'est capable d'offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, ce produit doit être manipulé avec précaution.

- Veiller à ce que les réactifs n'entrent jamais en contact avec la peau ou les yeux; si cela était le cas, laver abondamment avec de l'eau.
- Porter des gants.
- Ne pipeter aucun réactif avec la bouche.
- Ne pas fumer.
- Déposer tout le matériel utilisé dans des récipients conçus pour le matériel biocontaminant. Les restes d'échantillons, de contrôles, de tampons et de réactifs aspirés doivent être recueillis dans un récipient destiné à cet effet et autoclavés pendant une heure à 121°C ou traités dans de l'hypochlorite de sodium à une concentration finale de 10% pendant 30 minutes. Les restes contenant de l'acide doivent être neutralisés avant d'ajouter l'hypochlorite de sodium.
- Certains réactifs de ce coffret contiennent de l'azide sodique comme conservateur. L'azide sodique peut réagir au contact de tuyauteries et de bouches d'écoulement des eaux en plomb ou en cuivre. Cette réaction donne lieu à des azides métalliques hautement explosives. Lorsque vous jetez les restes de réactifs, veuillez laisser couler l'eau abondamment.

Précautions de manipulation:

- Adapter le laveur au type de plaque utilisé (fond plat) pour effectuer un bon lavage.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs après expiration de leur date limite d'utilisation.
- De plus grandes précautions doivent être prises pour éviter des contaminations microbiennes et une contamination croisée entre les réactifs.
- Utiliser une pointe jetable neuve pour pipeter chaque échantillon ou réactif.

#### 5. CONSERVATION ET STABILITÉ

Les composants resteront stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, à condition d'être conservés à 2-8°C. Le sachet contenant la microplaque doit être laissé à température ambiante avant d'être ouvert pour éviter toute condensation dans les puits. Après ouverture du sachet, la microplaque reste stable pendant 3 mois lorsqu'elle est conservée dans le sac en feuille aluminium bien fermé avec le petit sachet cartouche et à une température comprise entre 2 et 8°C. Une fois diluée, la solution de lavage reste stable pendant 15 jours si celle-ci est conservée à une température comprise entre 2 et 8°C. Le conjugué dilué reste stable pendant 15 jours à 2-8°C. Chromogène/substrat: le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé entre 2 et 8°C à l'abri de la lumière.

#### 6. PRÉSENTATIONS DISPONIBLES

- Coffret de 1 plaque (96 tests) **REF** N0148.

Contient: 1 plaque; 1 x 0,4 mL conjugué concentré; 1 x 15 mL diluant du conjugué; 1 x 30 mL diluant d'échantillons; 2 x 50 mL solution de lavage concentrée; 1 x 16 mL chromogène/substrat; 1 x 2 mL contrôle positif haut; 1 x 2 mL contrôle positif bas; 1 x 2 mL contrôle négatif; 1 x 12 mL solution d'arrêt; 1 sachet en feuille aluminium et lamelles adhésives.

- Coffret de 5 plaques (5 x 96 tests) **REF** N0149.

Contient: 5 plaques; 1 x 1,5 mL conjugué concentré; 1 x 70 mL diluant du conjugué; 1 x 120 mL diluant d'échantillons; 3 x 100 mL solution de lavage concentrée; 5 x 16 mL chromogène/substrat; 1 x 4 mL contrôle positif haut; 1 x 4 mL contrôle positif bas; 1 x 4 mL contrôle négatif; 1 sachet en feuille aluminium et lamelles adhésives.

#### 7. MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée ou désionisée.
- Pipettes multicanal et micropipettes (50 µL, 100 µL, 1000 µL) et cônes jetables.
- Incubateur à 37°C ± 1°C.
- Tubes pour préparer les dilutions.
- Chronomètre.
- Lecteur de microplaques avec filtre de 450 nm. Filtre de référence de 620 ou 630 nm conseillé.
- Système de lavage manuel ou automatique.
- Solution d'arrêt (coffret de 5 plaques): acide sulfurique 1 N. On peut également employer de l'acide sulfurique 0,4 N (30 mL: M2600998332, 60 mL: M2600998343).

#### 8. PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Utiliser du sérum frais ou du plasma (EDTA). D'autres anticoagulants doivent être évalués avant leur utilisation. Les échantillons peuvent être conservés pendant 3 jours à une température comprise entre 2 et 8°C. Pour une plus longue conservation, ceux-ci doivent être congelés (-20°C). Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation des échantillons. Des particules en suspension doivent être éliminées par centrifugation. Les sérums ou plasmas ne doivent pas être inactivés à chaud; en effet, cela pourrait donner lieu à de mauvais résultats.

### 9. TRAITEMENT AUTOMATIQUE

Ce test peut être utilisé de manière automatique ou semi-automatique avec divers instruments. Il est très important de valider un système automatique pour démontrer que les résultats obtenus sur les échantillons sont équivalents aux résultats d'un test manuel. Il est recommandé à l'utilisateur de valider l'instrument régulièrement.

### 10. PROCÉDURE - OPÉRATIONS PRÉALABLES

Tous les réactifs doivent revenir à température ambiante (20-25°C) avant le début du test.

Les réactifs liquides doivent être homogénéisés doucement avant l'emploi.

Diluer la solution de lavage concentrée 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée. Pour une plaque, mélanger 50 mL de solution de lavage concentrée à 450 mL d'eau. En cas de non-utilisation d'une plaque complète, préparer le volume proportionnel de solution.

Diluer le conjugué concentré 1/51 avec du diluant du conjugué suivant les indications du tableau 1. Si la plaque entière est utilisée, ajouter 300 µL du conjugué concentré directement dans le flacon contenant 15 mL de diluant du conjugué. **Mélanger doucement.**

Tableau 1

Barrettes requises	1	2	4	6	8	10	12
Diluant du conjugué, mL	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Conjugué concentré, µL	20	40	80	120	160	200	240

### 11. MONITORAGE DE L'ADDITION DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS

Étant donné que le tampon diluant des échantillons contient un indicateur de couleur et que tous les contrôles et réactifs sont colorés, il est possible de contrôler leur addition dans les puits de la microplaque visuellement ou par lecture spectrophotométrique.

Le diluant d'échantillons est violet, après l'addition de l'échantillon, il passe au bleu. Le changement de couleur apparaît après quelques secondes et son intensité est variable selon les échantillons utilisés, mais un changement est toujours visible. Les échantillons dilués ou d'autres préparations de laboratoire ne peuvent pas produire un changement de couleur.

Pour contrôler l'addition des échantillons, l'absorbance des puits peut se lire à 620 nm sans filtre de référence. La valeur d'absorbance doit être  $\geq 0,180$ .

Le conjugué de travail est orange. Pour contrôler son addition, la lecture de l'absorbance se réalisera à 450 nm sans filtre de référence. La valeur d'absorbance doit être  $\geq 0,400$ .

L'utilisation d'autres longueurs d'onde pour le monitoring n'est pas validée.

**NOTE:** Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles de référence.

Si un puits ne respecte pas les spécifications établies, cela peut indiquer qu'il s'est produit des erreurs dans la dispensation qui devraient être vérifiées.

Chromogène/substrat: la solution doit être incolore ou légèrement bleutée.

### 12. RÉALISATION DU TEST

- N'utiliser que le nombre de barrettes nécessaire pour le test. Réserver 8 puits pour le blanc et les contrôles. Doser 50 µL de diluant des échantillons dans le reste des puits. Ensuite, doser 50 µL de chaque échantillon dans les puits désignés préalablement. Doser 100 µL de contrôle négatif dans 2 puits, 100 µL de contrôle positif bas dans 3 puits et 100 µL de contrôle positif haut dans 2 puits. **NE PAS DILUER LES CONTRÔLES, ILS SONT DÉJÀ PRÊTS À L'EMPLOI.** Laisser un puits vide pour le blanc du substrat (A1).
- Couvrir la plaque avec une lamelle adhésive, **agiter doucement** et laisser incubé pendant 1 heure à 37°C.
- A la fin de l'incubation, enlever la lamelle adhésive et laver les barrettes: aspirer le milieu de réaction et effectuer 4 lavages avec un volume de tampon de lavage variable de 0,30 à 0,37 mL. Veiller à ce que le liquide ne déborde pas des puits. Effectuer les 4 cycles de lavage avec un intervalle de 15 secondes entre chaque phase de distribution/aspiration. Une fois le lavage terminé, retourner les barrettes sur un papier buvard et les secouer délicatement afin d'enlever le résidu de liquide des puits. Laisser les barrettes retournées sur le buvard jusqu'à la fin des opérations de lavage afin d'éviter l'évaporation.
- Transférer 100 µL de conjugué dilué dans tous les puits de la plaque, à l'exception du puits destiné au blanc de substrat. Éviter les bulles.
- Couvrir la plaque d'une lamelle adhésive et laisser incubé pendant 30 minutes à 37°C.
- Jeter la lamelle adhésive. Aspirer et laver la plaque selon les indications du point 3.
- Ajouter 100 µL de chromogène/substrat à tous les puits y compris le blanc.
- Laisser incubé pendant 30 minutes à température ambiante (20-25°C) et à l'abri de toute lumière directe ou intense.
- Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chaque puits en suivant la même séquence et aux mêmes intervalles que pour l'ajout du chromogène/substrat.
- Mettre le lecteur à zéro avec le puits du blanc à 450 nm et lire l'absorbance de chacun des puits dans le délai maximum de 30 minutes. Il est recommandé de procéder à la lecture bi-chromatique en utilisant un filtre de référence 620-630 nm.

### 13. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les résultats d'un essai ne sont valables que dans le respect des critères suivants:

- Blanc de substrat: la valeur d'absorbance doit être  $\leq 0,100$ .
- Contrôle négatif: absorbance  $< 0,100$  après avoir ôté le blanc.
- Contrôle positif bas: chacune des valeurs individuelles d'absorbance ne doit pas varier de plus de 30% de la moyenne des trois. La moyenne des absorbances doit être  $\geq 0,120$  après avoir ôté le blanc.
- Contrôle positif haut: absorbance  $\geq 0,600$  après avoir ôté le blanc.
- Rapport contrôle positif haut/contrôle positif bas  $> 2,5$ .
- Rapport contrôle négatif/contrôle positif bas  $< 0,5$ .

#### 14. RÉSULTATS

1. Calculer l'absorbance moyenne du contrôle positif bas. La valeur obtenue est la valeur seuil. **Valeur seuil =  $CPB\bar{x}$**

2. Diviser l'absorbance de l'échantillon par la valeur seuil.

Positif: rapport absorbance/valeur seuil  $\geq 1,0$

Négatif: rapport absorbance/valeur seuil  $< 0,9$

Douteux: rapport absorbance/valeur seuil  $\geq 0,9 < 1,0$

#### Interprétation des résultats

Un résultat positif indique une infection par *T. pallidum*, actuelle ou passée. Il faudra tenir compte du dossier médical du patient.

#### 15. LIMITES DE LA PROCÉDURE

Comme dans d'autres tests sérologiques, les résultats obtenus grâce à ETI-TREPONEMA PLUS servent d'aide au diagnostic et doivent être interprétés en tenant compte du dossier médical du patient.

En cas de résultats douteux, il est recommandé de répéter le test avec un nouvel échantillon du patient et de faire l'essai avec une autre méthode.

Pour le bon fonctionnement du coffret, les instructions données doivent scrupuleusement être suivies. Tout écart peut donner lieu à l'obtention de résultats aberrants.

Comme dans tous les immunotests très sensibles, certains résultats positifs peuvent ne pas se répéter.

Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une exposition ou d'une infection par le *Treponema pallidum*.

#### 16. RÉSULTATS ATTENDUS

L'incidence des résultats positifs dépend de la population testée. La population de donneurs de sang volontaires et altruistes produit des titres de positivité très bas. Les populations à haut risque telles que les toxicomanes, les prostituées et les prisonniers produisent des titres de positivité élevés, étant donné que ce test permet de détecter aussi bien des infections récentes que passées. Comparé avec le RPR, le ETI-TREPONEMA PLUS peut produire des résultats positifs inattendus sur des échantillons RPR négatifs. Ceci est dû au fait que le ETI-TREPONEMA PLUS détecte les anticorps anti-*Treponema* qui persistent durant toute la vie du patient. Le RPR produit généralement des résultats négatifs en ce qui concerne les infections passées, car il détecte des anticorps hétérophiles qui n'apparaissent que dans la phase initiale de l'infection par syphilis.

#### 17. CARACTÉRISTIQUES FONCTIONNELLES

##### Sensibilité analytique

Le coffret a été capable de détecter des concentrations inférieures à 0,030 UI/mL du 1er standard international pour sérum syphilitique de l'OMS (HS, 1958, NIBSC, Royaume-Uni) dans deux lots étudiés.

##### Évaluations

Le fonctionnement du ETI-TREPONEMA PLUS a été évalué en testant des échantillons positifs caractérisés de panels internes et commerciaux et des échantillons de donneurs de sang et de patients hospitalisés.

##### Sensibilité

- On a testé 159 échantillons positifs caractérisés de diverses sources, inclut représentatifs des différents stades de la syphilis. La trousse a détecté correctement comme positifs 158 échantillons. Donc, la sensibilité obtenue a été de 99,37% (158/159).
- On a testé un panel commercial de BBI Syphilis Mixed Titer Performance panel PSS201 composé de 25 échantillons caractérisés. Le coffret a détecté tous les 25 échantillons correctement.

##### Spécificité

- Une évaluation de spécificité a été réalisée en essayant 2883 échantillons de donneur de sang de Barcelone (Espagne). De ces échantillons, 17 étaient positifs. Parmi les 17 positifs, 10 ont été confirmés comme vrais positifs par d'autres méthodes et 7 ont été considérés comme faux positifs. La spécificité obtenue a été de 99,76% (2876/2883).
- Sur les 200 échantillons des malades hospitalisés, 7 étaient positifs. Tous ont été confirmés avec d'autres méthodes. Dans cette étude la spécificité obtenue était 100% (193/193).

##### Précision

Répétabilité intra-test: Les coefficients de variation obtenus pour les valeurs d'absorbance de 24 répliques d'un échantillon positif ont été de 4,8%, de 4,0% et de 6,2% dans trois lots étudiés.

Reproductibilité inter-test: Trois échantillons positifs de différents niveaux ont été testés dans 5 tests différents. Les coefficients de variation obtenus pour les rapports absorbance/valeur seuil des 3 échantillons ont été de 5,57%, de 5,88% et de 5,27%.

##### Interférences

Lors d'une évaluation sur de possibles interférences, 60 échantillons ayant un risque potentiel de produire des résultats faux positifs ont été testés. Sur ces échantillons, 6 étaient positifs aux anticorps antinucléaires (ANA), 4 étaient positifs aux anticorps anti-*E. coli* et 50 provenaient de femmes enceintes. Tous les résultats ont été négatifs. Des études contrôlées ont démontré aussi que le fonctionnement d'essai n'a pas été affecté par l'usage d'anticoagulant (EDTA).

C - 12/2008