

Vérification de méthode du dosage Syphilis sur la Plateforme Cobas 8000



DU assurance qualité au laboratoire de Biologie Médicale



Dr Asma JEBLAOUI
Laboratoire de Bactériologie -Hygiène
Hôpital Le Kremlin Bicêtre-HUPS

Situation actuelle « accréditation » du LBM et l'unité de Bactériologie

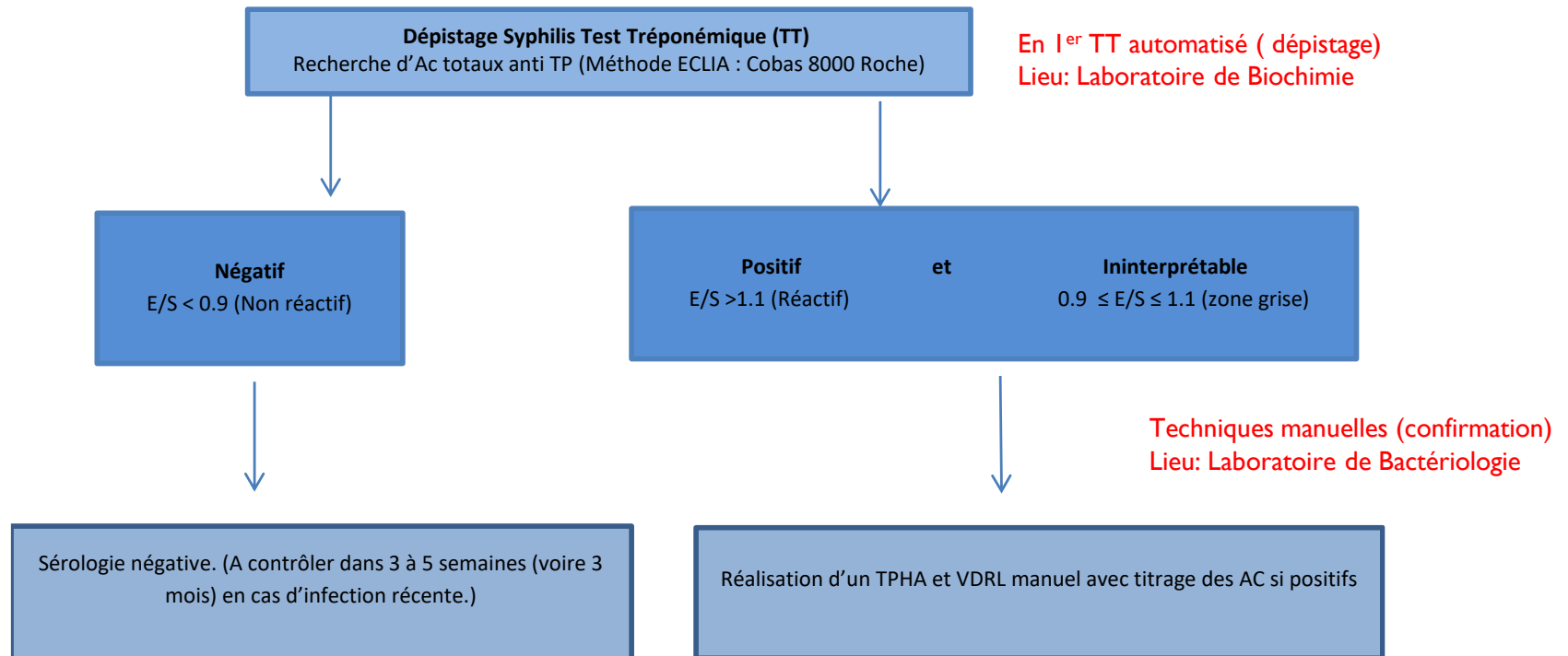
- ▶ Actuellement : 68% du volume d'activité du LBM du GH Sud est accrédité
3.3% d'examens de l'unité de Bactériologie hygiène
- ▶ Objectif 2017: l'extension de la portée d'accréditation aux lignes IB1 et BA8

Ligne de portée	Examens	Date	Responsable
IB1: Recherche, identification et /ou détermination de la concentration d'anticorps et /ou d'antigènes spécifiques contre des agents infectieux	Détection qualitative des anticorps anti-tréponémiques par électrochimiluminescence (ECLIA) (technique automatisée sur Cobas)	Septembre 2016 (pour évaluation en 2017)	A. JEBLAoui G. CUZON
	Détection quantitative des anticorps anti-tréponémiques par hémagglutination passive (technique manuelle)		
	Détection quantitative des anticorps anti-cardiolipides par agglutination (technique manuelle)		
Ligne de portée	Examens	Date	Responsable
BA8: Recherche et identification de bactéries spécifiques Méthode de type qualitatif et/ou quantitatif Biologie moléculaire	PCR <i>C. trachomatis</i> sur sécrétions vaginales	Septembre 2016 (pour évaluation en 2017)	G. CUZON
	PCR <i>C. trachomatis</i> sur urines		
	PCR <i>C. trachomatis</i> sur prélèvement urétral		
	PCR <i>C. trachomatis</i> sur prélèvement endocervical		
	PCR <i>N. gonorrhoeae</i> sur sécrétions vaginales		
	PCR <i>N. gonorrhoeae</i> sur urines		
	PCR <i>N. gonorrhoeae</i> sur prélèvement urétral		
	PCR <i>N. gonorrhoeae</i> sur prélèvement endocervical		
	PCR <i>C. difficile</i> : recherche des gènes des toxines B/binaire		

Tableau 1 : ligne de portée et analyses concernées pour la demande d'extension de l'accréditation de la structure de bactériologie (RDD LBM HUPS 2017)

Choix du sujet et objectif du travail

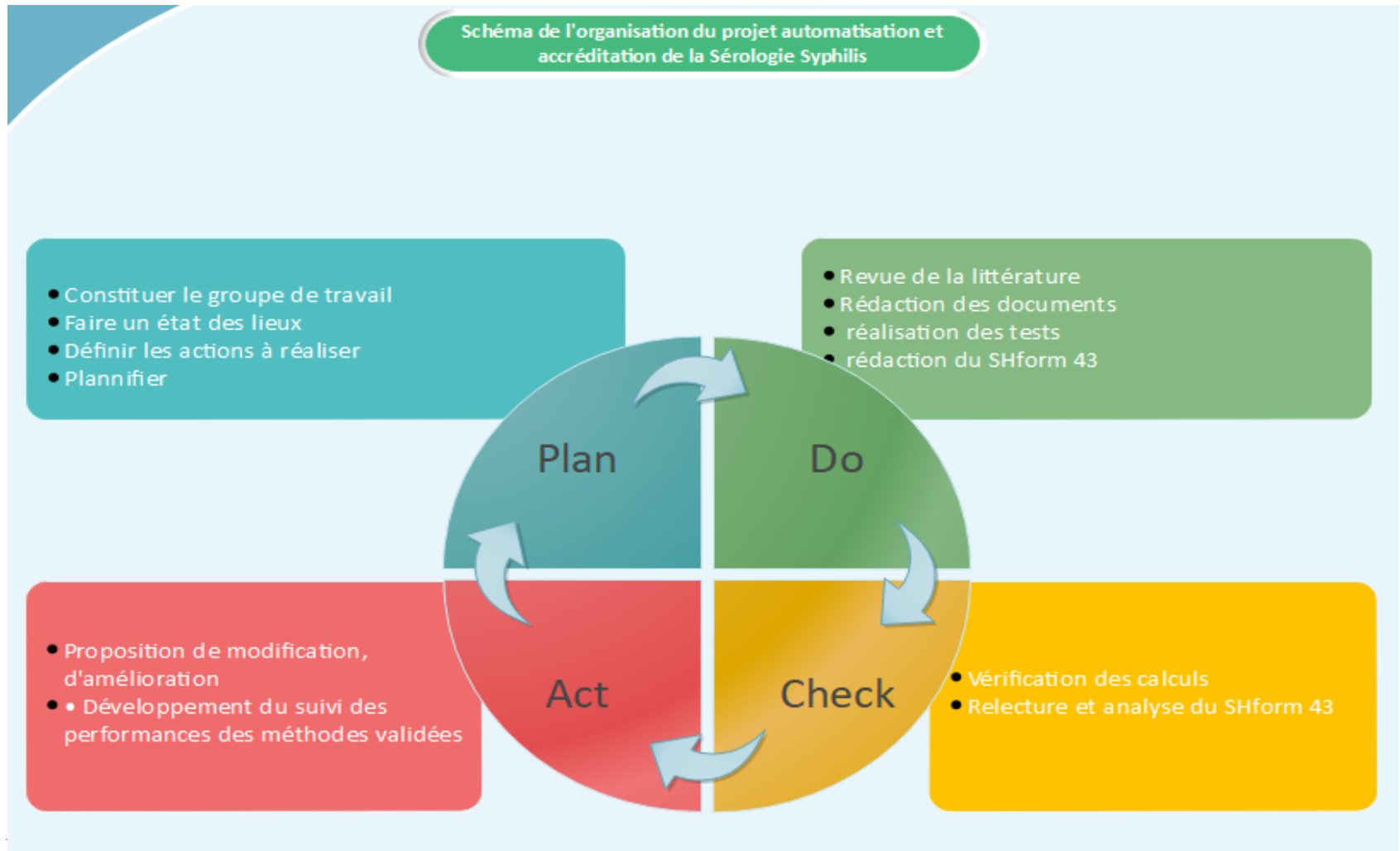
- ▶ Pour répondre à la **feuille de route de la HAS 2015**: changement de la stratégie de dépistage sérologique de la syphilis.
- ▶ **Objectifs**: Vérification du processus analytique
 réunir éléments pour le Dossier de validation de méthode/rédaction SHFORM 43



Algorithme de dépistage et d'interprétation des résultats du dosage Syphilis TT sur le Cobas 8000 CHU Bicêtre

Méthodologie

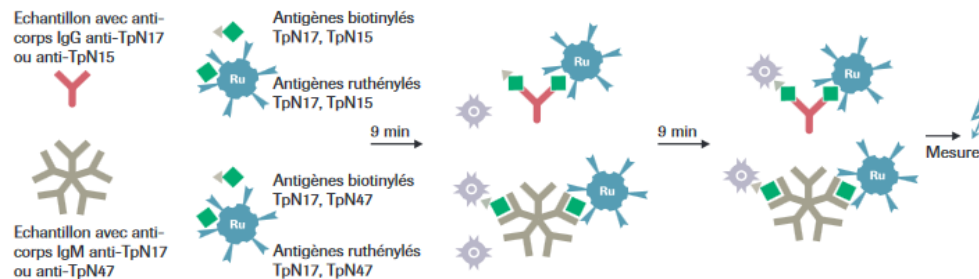
- ▶ Le projet a été organisé selon la roue de Deming (PDCA)



Description de la méthode

- ▶ **Syphilis TP (Cobas, Roche)** : Test immunologique pour la détermination qualitative in vitro des anticorps totaux dirigés contre *Treponema Pallidum* dans le sérum humain (extrapolé à partir de données quantitatives)
- ▶ **Principe**: électro chimiluminescence « ECLIA »
- ▶ **Méthode** sandwich à deux antigènes, dosage en trois étapes

Principe du test: méthode sandwich à deux antigènes (DAGS) (durée de test: 18 min.)



Etape 1 (9 minutes):

Une fraction de 10 µl de l'échantillon de patient est mise à incubation avec des antigènes recombinants biotinylés spécifiques au *T. pallidum* et des antigènes recombinants marqués au ruthénium spécifiques au *T. pallidum*. Des complexes sandwich se forment en présence des anticorps correspondants.

Etape 2 (9 minutes):

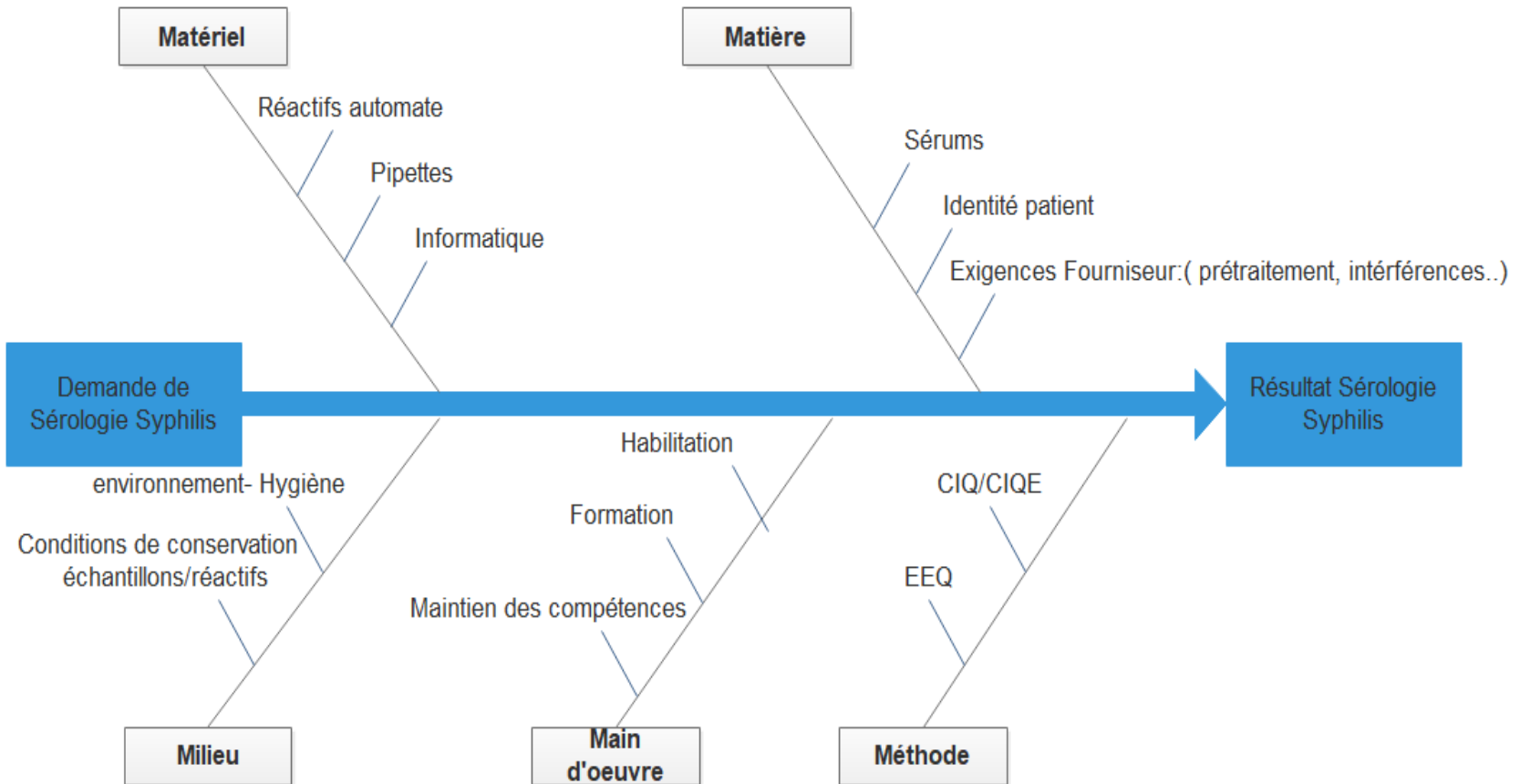
Suite à l'ajout de microparticules paramagnétiques couvertes de streptavidine, les complexes immuns se forment via l'interaction biotine-streptavidine à la phase solide.

Etape 3 (mesure):

Le mélange de réactifs est transféré dans la cellule de mesure où les microparticules sont fixées par magnétisme à la surface de l'électrode. Les particules libres sont évacuées. L'application d'une certaine tension au niveau de l'électrode permet d'induire la chimio-luminescence qui est ensuite mesurée par un photomultiplicateur. L'intensité de signal dépend des titres IgG et IgM de la syphilis dans l'échantillon.

- ▶ **Valeur seuil**: calcul automatique à partir des mesures des Calibrateurs Syphilis.
- ▶ **Résultat** échantillon : « réactif » / « non réactif » ou rapport échantillon/seuil (E/S).
 - ▶ Les échantillons dont le rapport E/S est < 1.00 : non réactifs: **négatifs**
 - ▶ Les échantillons dont le rapport E/S est ≥ 1.00 : réactifs: **positifs**

Maitrise des risques



Analyse des risques selon le diagramme d'Ishikawa

Evaluation des performances

Description du Sous -processus :

- ▶ Fait partie du processus complexe de la vérification de la méthode de la sérologie Syphilis (6 sous processus).
- ▶ Aucun changement dans la technique par rapport aux recommandations du fournisseur : **Vérification de méthode** d'après les paragraphes 5.5.1.2 et 5.5.1.3 du SH REF 02.

Identification des performances à évaluer

Paramètres à évaluer	Bibliographie / Vérification sur site
Fidélité	Bibliographie + Vérification sur site
Justesse/Exactitude	Vérification sur site
Incertitudes/Facteurs de variabilité	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison	Vérification sur site
Interférences	Bibliographie
Contamination	Bibliographie + Vérification sur site
Robustesse	Bibliographie
Stabilité des réactifs	Bibliographie
Intervalle de référence	Bibliographie
Limite de détection	Bibliographie
Spécificité/Sensibilité analytique	Bibliographie

Répétabilité

- La répétabilité a été évaluée à partir des deux niveaux du CIQ (positif et négatif)
- Ces échantillons ont été passés 30 fois de suite dans la même série sur chaque ligne

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
CIQ Positif (L 1)	30	4.433	0.032	0.73	NA	10%	Conforme
CIQ Négatif (L1)	30	0.071	0.001	1.15	NA	10%	Conforme
CIQ Positif (L2)	30	4.530	0.047	1.04	NA	10%	Conforme
CIQ Négatif (L 2)	30	0.083	0.001	1.50	NA	10%	Conforme

► Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été évaluée en passant les deux niveaux de CIQ une fois par jour pendant 30 jours au fur et à mesure de l'utilisation des tests en routine pour les 2 lignes

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
CIQ Positif (L1)	30	4.548	0.189	4.17	NA	15%	Conforme
CIQ Négatif (L 1)	30	0.077	0.004	5.08	NA	15%	Conforme
CIQ Positif (L2)	30	5.294	0.254	4.80	NA	15%	Conforme
CIQ Négatif (L2)	30	0.092	0.009	9.8	NA	15%	Conforme

Justesse

- ▶ Le laboratoire participe depuis la mise en place de la méthode à un programme CIQ/CIL.
- ▶ suivi mensuel
- ▶ performances obtenues depuis le mois de juin 2017 sont acceptables par rapport aux groupes de pairs.

(Performance acceptable lorsque l'IET est compris entre -1,25 et 1,25 (IET=rapport du biais divisé par l'ET du groupe des pairs)).

Echantillons (CIQE Biorad)	Laboratoire L1	Groupe de pairs	Conclusion/Biais
Nombre de valeurs	28	579	A
Moyenne	4.12	4.44	(CVR = 0.5 IET = - 1.02 Biais = 0.32)
Ecart Type	0.139	0.315	
CV	3.4	7.1	
Echantillons (CIQE Biorad)	Laboratoire L2	Groupe de pairs	Conclusion/Biais
Nombre de valeurs	30	579	A
Moyenne	3.92	4.44	CVR = 0.6 IET = - 0.9 Biais =0.52
Ecart Type	0.155	0.315	
CV	4.0	7.1	

- ▶ (A = Performance acceptable ; B=Performance acceptable à limite– Peut indiquer le besoin d'investiguer la fidélité ou la justesse du test ; C = Mauvaise performance, une action corrective requise. Notes L'IET est une estimation statistique du biais du laboratoire. Le CVR est le ratio de CV mensuel laboratoire sur le CV mensuel du groupe de pairs et il estime votre fidélité.)

Exactitude

- ▶ Le laboratoire est inscrit au programme d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) de CTCB. Les derniers échantillons d'EEQ reçus au laboratoire ont été réanalysés sur la ligne 2, et les résultats qualitatifs obtenus ont été comparable avec ceux déjà rendus en méthode manuelle et sont conformes aux résultats attendus.

Numéro échantillon	TPHA qualitatif	TPHA quantitatif	Test Syphilis brut	Test Syphilis interprété	Comparaison manuel/automatisé (Ligne 2)
EEQ SYPHILIS ABP SYP 16/2	POSITIF	2560	24	POSITIF	CONCORDANT
EEQ SYPHILIS ABP SYP 16/1	POSITIF	320	23,64	POSITIF	CONCORDANT
EEQ ANSM I5BAC2 S2	POSITIF	320	51,05	POSITIF	CONCORDANT



Incertitude de mesure

- ▶ L'utilisation de la méthode est récente, l'évaluation provisoire de l'incertitude de mesure a été faite à partir des données des CIQ externalisés.
- ▶ Sera réévaluée à partir des prochains EEQ.

$$\text{Incertitude composée } u(C) : u(C) = \sqrt{[u(\text{CIQ})^2 + u(\text{CIQ externalisé})^2]}$$
$$\text{Incertitude élargie } U = 2 * u(C)$$

- ▶ Incertitude composée $u(C) : u(C) = 0,37$
 - ▶ Incertitude élargie $U = 0,37 * 2 = 0,74$
 - ▶ donc $U = 74\%$: comment l'exploiter?
 - ▶ La valeur cible du CIQ externalisé Biorad est 4 fois supérieure au seuil décisionnel, ce qui rend l'utilisation de cette incertitude élargie « difficile ».
 - ▶ Décision: zone d'incertitude $[0,90-1,10]$: pour laquelle un TPHA et un VDRL manuel est réalisé avec titration en cas de positivité.
-



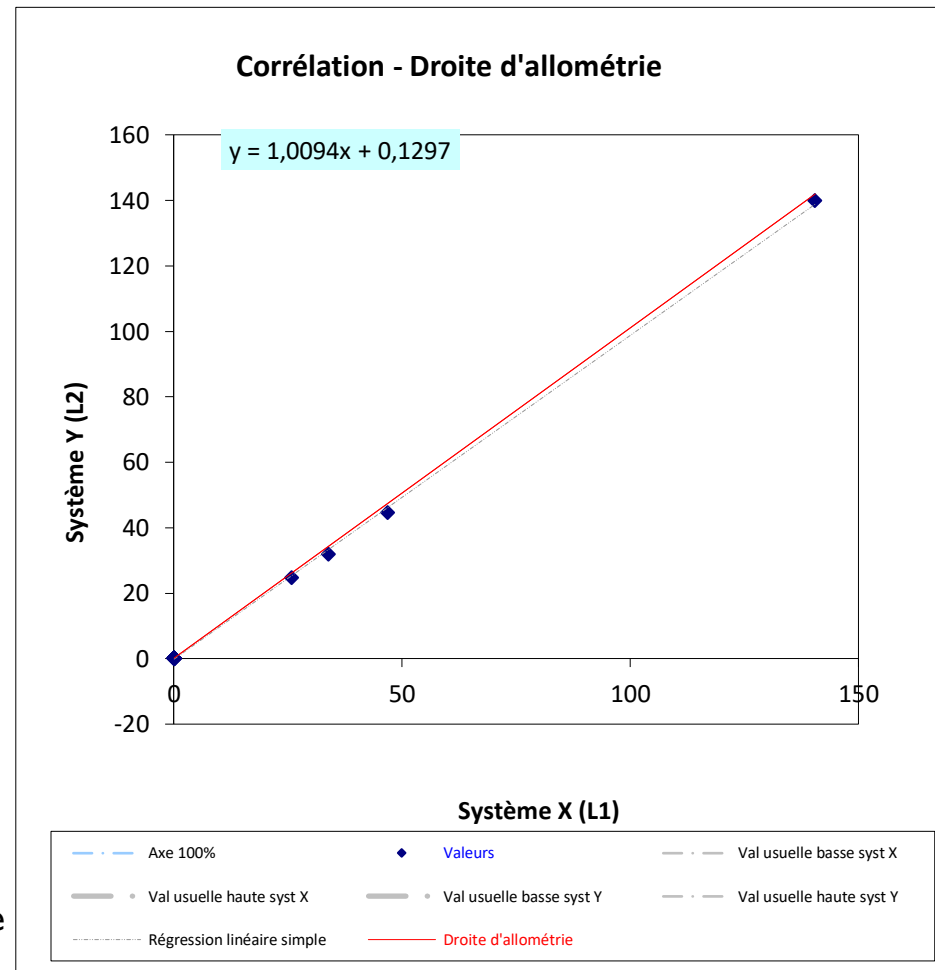
Contamination inter-échantillon

- ▶ Afin d'évaluer les éventuelles contaminations inter-échantillons, trois échantillons négatifs ont été passés entre des échantillons positifs lors de la comparaison de méthode manuelle et automatisée.
- ▶ Aucune contamination inter-échantillons n'a été mise en évidence.
- ▶ Matériel utilisé est à usage unique
- ▶ Procédures de rinçage recommandées par le fabricant sont respectées.



Comparaison de méthode

- ▶ Une comparaison avec l'ancienne méthode + comparaison entre les deux modules du Cobas C8000.
- ▶ Pour cela 65 échantillons et 3 EEQ couvrant de façon homogène le domaine physiopathologique analysés récemment par l'ancienne méthode ont été analysés avec le nouveau kit sur la ligne2 du C8000. En parallèle un TPHA et un VDRL manuels ont été réalisés pour ces échantillons.
- ▶
- ▶ Les résultats ont été analysés par une étude des discordances pour la **comparaison avec l'ancienne méthode** utilisée.
- ▶ Une droite de régression linéaire : **comparaison des deux modules du Cobas** (automates en miroir): très bonne corrélation entre les deux modules avec un coefficient de corrélation linéaire proche de 1



Conclusion

- ▶ Résultats obtenus satisfaisants par rapport aux objectifs attendus de la vérification des performances sur le Cobas C8000 du kit Syphilis TP (Roche) :
Technique validée et utilisée depuis le 01 juin 2017 au laboratoire.
- ▶ Implication dans la démarche qualité du laboratoire , Mise en pratique des enseignements dispensés.
- ▶ Expérience de collaboration multidisciplinaire et de mutualisation de la plateforme Cobas réussie (Biochimie- Bactériologie)
- ▶ Avantages pratiques de la mise en place de l'automatisation du TT de dépistage
- ▶ Difficultés : Absence de valeurs de référence des sociétés savantes et du fournisseur
- ▶ Suivi des performances et ajustement de l'incertitude de mesure à réévaluer



Merci de votre attention

