

Université Pierre et Marie Curie – Sorbonne Universités

**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
"ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE"**

**VERIFICATION DE METHODE DE LA SEROLOGIE DE LYME
PAR LA TECHNIQUE LIAISON® XL**

2017-2018

NOTE AU LECTEURS

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire "Assurance Qualité au laboratoire 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.



HÔPITAUX UNIVERSITAIRES
PITIÉ SALPÊTRIÈRE
CHARLES FOIX

Dr Fateh Ousser

Praticien Attaché

Laboratoire de Bactériologie -Hygiène

Hôpitaux Universitaires Pitié salpêtrière-Charles Foix

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail :

Le Pr M.Vaubourdolle et le Dr P.Pernet pour m'avoir permis de suivre ce DU.

Le Pr J.Robert chef de service de Bactériologie-Hygiène pour son soutien et ses encouragements.

Tout particulièrement le Dr L.Drieux-Rouzet pour son implication et ses conseils.

Le Dr L.Paris et le Dr F.Touafek pour leur soutien.

Mr G.Tanguy pour ses efforts consentis durant ce travail.

Je remercie également mon épouse pour son accompagnement et son soutien.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS	7
1. Introduction	8
1.1 Présentation du Groupe Hospitalier	8
1.2 Le laboratoire de Bactériologie-Hygiène.....	9
1.3 Démarche Qualité du Laboratoire et situation actuelle.....	10
2. Choix du sujet, objectif du travail et méthodologie	11
2.1 Rappel sur la maladie de lyme	11
2.2 Diagnostic sérologique de la maladie de lyme	12
2.3 Choix du sujet et objectif du travail.....	13
2.4 Méthodologie.....	14
2.5 Planning	15
3. Vérification sur site des performances de la méthode	16
3.1. Description du processus	16
3.2. Description de la méthode.....	17
3.3 Mise en Œuvre	18
3.4 Maitrise des risques	19
3.5 Identification des performances à évaluer.....	24
3.5.1 Vérification Bibliographique	25
3.5.1.1 Fidélité	25
3.5.1.2 Intervalle de mesure.....	25
3.5.1.3 Spécificité.....	25
3.5.1.4 Sensibilité.....	26
3.5.1.5 Stabilité des réactifs	26
3.5.1.6 Interférences	26
3.5.2. Evaluation des performances et interprétation.....	28
3.5.2.1 Répétabilité.....	28
3.5.2.2 Fidélité intermédiaire	28
3.5.2.3. Exactitude	29
3.5.2.5 Contamination inter-échantillon	29
3.5.2.6 Comparaison de méthode	30
4. Conclusion et décision sur la validation opérationnelle de la technique	33
BIBLIOGRAPHIE	34
ANNEXES	35
RESUME	36

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

Ag : Antigènes

AMDEC : Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité

CLIA: Chimiluminescence immuno assay

CV : Coefficient de Variation

CIQ : contrôle interne de la qualité

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

ELISA : Enzyme linked Immunosorbent Assay

SMQ : Système de Management de la Qualité

1. Introduction

1.1 Présentation du Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière-Charles Foix

Le groupe hospitalier universitaire Pitié-Salpêtrière - Charles Foix est un groupe hospitalier parisien rassemblant le CHU Pitié-Salpêtrière (lui-même issu de la fusion, en 1964, des hôpitaux de la Salpêtrière et de la Pitié) et le CHU gériatrique Charles-Foix et associant la faculté de médecine de l'université Pierre-et-Marie-Curie . La fusion entre ces deux CHU fut mis en œuvre le 1er janvier 2011 dans le cadre de la réorganisation de l'Assistance publique - Hôpitaux de Paris en 12 groupes hospitaliers

L'Hôpital Universitaire de la Pitié Salpêtrière est un établissement public de santé, de proximité de spécialité, d'enseignement et de recherche, il est de par sa taille, le 1er groupe hospitalier français.

Situé au cœur du 13e arrondissement de Paris, il regroupe 90 bâtiments répartis sur 33 hectares, 77 services regroupés en 10 pôles représentant l'ensemble des activités médicales existantes.

Les services de la Pitié Salpêtrière sont reconnus à l'échelon national et bien souvent international en particulier dans les spécialités de références telles que :

- les affections du système nerveux et des pathologies mentales
- les pathologies cardio-vasculaires et métaboliques
- les pathologies infectieuses et immunitaires complexes
- la cancérologie et l'oncologie (hématologie, oncologie, radiothérapie et médecine nucléaire)
- la greffe d'organe et de moelle osseuse
- la chirurgie : gynécologique, urologique, ophtalmologique, neurochirurgie, cardiaque, vasculaire, digestive, orthopédique et traumatologique
- la périnatalité
- la personne âgée malade et dépendante

Cet éventail très large de spécialités médicales est soutenu par l'existence, au sein de l'établissement de 26 centres de référence maladies rares, afin d'assurer aux patients une prise en charge remarquable et de 2 Instituts Hospitalo-Universitaires (IHU)

1.2 Le Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Fait partie du pôle de biologie-pathologie de l'hôpital de la pitié salpêtrière, Il contribue au diagnostic des agents responsables de maladies infectieuses bactériennes ainsi qu'à la prévention et à la lutte contre les infections nosocomiales et au conseil nécessaire à la prise en charge des pathologies concernées pour l'aspect hospitalier et développe des activités d'enseignement et de recherche.

Le laboratoire comporte plusieurs secteurs :

- Les Services généraux : secrétariat, accueil, logistique.
- Unité de Bactériologie clinique : 4 secteurs de bactériologie de routine
- Unité d'hygiène hospitalière et lutte contre les infections nosocomiales
- Unité de biologie moléculaire
- Le Centre national de référence de la tuberculose et des mycobactéries
- Unité de sérologie bactérienne.

1.3 Démarche Qualité du LBM et situation actuelle :

La démarche qualité a été initiée depuis de nombreuses années dans les 2 sites du GH

Le laboratoire a défini et mis en place un système de management de la qualité en adéquation avec les exigences de la norme NF EN ISO 15189, du « recueil d'exigences pour l'accréditation SHREF02 » et dans le respect de l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale modifiée par la loi n°2013-442 du 30 mai 2013, avec pour objectif, l'accréditation totale du laboratoire du groupe hospitalier en 2020. (1,2,3)

Le laboratoire a mis en place une organisation basée sur :

- Le regroupement des activités par processus (Management, Réalisation, Support). Ainsi, le LBM déploie et organise son Système de Management de la Qualité selon une approche processus (4.2.1 de la norme NFENISO15189etISO9001). (Annexe1)
- La maîtrise des compétences et des techniques mises en œuvre.

Actuellement le laboratoire de Bactériologie-hygiène est accrédité pour l'ensemble de l'examen de l'hémoculture (lignes BA1, BA4, BA5, BA6) (7) ainsi que pour le test tréponémique automatisé pour la sérologie de la Syphilis (ligne IB1) de la portée A et envisage la fin de l'année 2018 l'extension de la portée d'accréditation à d'autres lignes.

2. Choix du sujet, objectif du travail et méthodologie

2.1 Rappel sur la borréliose de Lyme

La borréliose de Lyme est une maladie infectieuse, causée par une bactérie du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* (principales espèces pathogènes en Europe : *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi sensu stricto*), et transmise à l'Homme par piqûres de tiques dures du genre *Ixodes*, infectées. La maladie s'exprime par diverses manifestations dermatologiques, neurologiques, articulaires et plus rarement cardiaques ou ophtalmiques. Cette zoonose est présente dans les régions tempérées d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Asie(8).

Principales manifestations cliniques

Un diagnostic de borréliose de Lyme peut être envisagé si le patient a été exposé à un risque de piqûre de tique. Néanmoins, un antécédent documenté de piqûre de tique n'est pas indispensable car une piqûre de tique peut passer inaperçue. La borréliose de Lyme est habituellement classée en trois stades :

- **Borréliose de Lyme précoce localisée**

Elle survient de 3 à 30 jours après la piqûre de tique et est caractérisée par une manifestation cutanée typique, l'érythème migrant. L'érythème migrant est la manifestation la plus fréquente (60 à 90 % des cas) et la plus évocatrice de la borréliose de Lyme. Il s'agit d'une tache érythémateuse, au site de la piqûre de tique, indolore et de croissance annulaire et centrifuge.

- **Borréliose de Lyme précoce disséminée**

Elle survient de plusieurs jours à plusieurs semaines après la piqûre de tique et se présente au plan symptomatique sous la forme d'érythèmes migrants multiples ou de manifestations neurologiques (méningoradiculite, paralysie faciale, méningite isolée, myélite aiguë) ou plus rarement de manifestations articulaires (arthrite avec notion d'épanchement d'une grosse articulation comme le genou), cutanée (lymphocytome borrelion), cardiaques ou ophtalmologiques.

- **Borréliose de Lyme tardive**

Elle survient plusieurs mois ou années après la pique de tique et est caractérisée par des manifestations articulaires ou cutanées (acrodermatite chronique atrophiante) ou neurologiques spécifiques rares (encéphalomyélite). Les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme précoce disséminée et tardive n'apparaissent qu'en l'absence de traitement antibiotique, notamment lorsque la borréliose de Lyme précoce localisée est passée inaperçue.

2.2 Diagnostic de la maladie de Lyme

Le diagnostic de la borréliose de Lyme est fondé avant tout sur l'observation de signes cliniques objectifs (principalement cutanés, neurologiques et articulaires) et sur des éléments d'anamnèse : antécédents de pique de tique ou d'exposition à un risque de pique. En raison de la faible spécificité de la majorité des manifestations cliniques de la borréliose de Lyme précoce disséminée et tardive, un test biologique est nécessaire pour confirmer le diagnostic de ces manifestations à ces stades de la maladie. Un test biologique n'est pas recommandé au stade précoce localisé de la maladie (forme la plus fréquente) en raison de nombreux faux négatifs au stade d'érythème migrant. Les tests biologiques reposent essentiellement sur des techniques indirectes (sérologie : recherche d'anticorps spécifiques). Les techniques de recherche directe de la bactérie sont réservées à des laboratoires spécialisés. Le test sérologique est basé sur une approche en deux étapes, un test de dépistage (ELISA, IFI, CLIA) systématiquement suivi d'un test de confirmation par immuno-empreinte (Western-Blot ou immuno-blot) lorsque le résultat du test de dépistage est positif ou douteux.

2.3 Choix du sujet.

Suite à la fermeture du laboratoire de bactériologie de Charles-Foix qui réalisait les tests de sérologies Bactériennes pour le GH et pour d'autres Hôpitaux, cette activité a été récupérée par le laboratoire de Bactériologie-Hygiène de la pitié salpêtrière en installant avec la collaboration du laboratoire de Parasitologie-mycologie une plateforme commune de sérologie infectieuse dans laquelle outre les paramètres de sérologie parasitaires sont réalisés les tests sérologiques pour le diagnostic et le suivi de la syphilis ainsi que le diagnostic sérologique la borréliose de lyme.

Dans le cadre de la mise en place du SMQ ainsi que pour poursuivre le parcours de notre laboratoire en matière d'accréditation ce travail vise à vérifier sur site les performances de la méthode de recherche des anticorps anti-Borrelia sp en utilisant la technique automatisée LIAISON®XL sérologie qui se faisait avant par la technique ETI-MAX-MIKROGEN

2.4 Méthodologie

Le projet a été organisé selon le concept de la roue de Deming (PDCA) (10) :

P: «Plan» pour la planification du travail

D: «Do» pour la réalisation des actions décidées lors du plan

C: «Check» pour l'évaluation des actions mises en place

A: «Act» pour trouver les actions permettant d'améliorer le processus

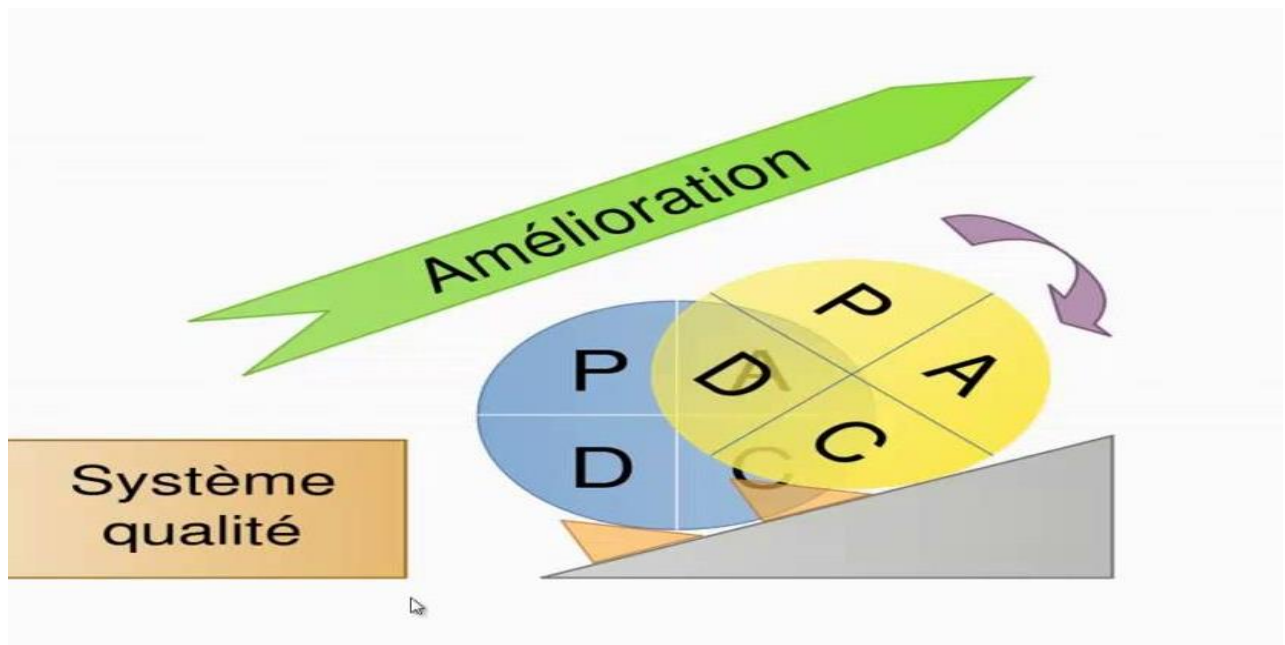


Figure 1 : Schéma de l'organisation du projet de réalisation de la sérologie de Lyme

2.5 Planning

Fin Novembre-début Décembre 2017

- Constitution du groupe de travail
- Réunion d'organisation avec l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie
- État des lieux concernant le matériel et les ressources humaines
- visite de l'équipe de DIASORIN et Début de paramétrage et formation / habilitation
- Vérification/Rédaction des procédures et des MO
- Établissement d'un plan de manipulation

Décembre-Janvier 2018

- Établissement de l'organisation finale (taches attribuées aux biologistes, techniciens et cadres)
- Paramétrage SIL (GLIMS).
- mise en œuvre d'une feuille de prescription commune.
- Vérification du transfert des données informatiques.
- début de réalisation des manipulations de vérification de performances.

Février 2018

- Finalisation des Vérification des performances.
- Interprétation des résultats par rapport aux objectifs fixés.
- Remplissage du SHFORM 43.

Mars 2018

- Démarrage de l'utilisation de la nouvelle technique le 12 Mars 2018
- Suivi des performances et proposition d'ajustements en cas de besoin

Mode opératoire/procédure/Fiches
Procédure d'utilisation de GLIMS pour les sérologies
Sérodiagnostic de de la maladie de Lyme
Utilisation de l'automate LIAISON XL (Diasorin)
Procédure d'aide à la validation biologique de la sérologie de lyme
Procédure de gestion des CQ
Limites interférences hémolyse ictère lactescence (documents DIASORIN)
Calibrant LIAISON XL liste conservation et conditions d'utilisation
Traçabilité des réactifs utilisés pour la sérologie de Lyme
Traçabilité CQI et EEQ utilisés pour la Sérologie de Lyme

Tableau 1 : Procédures/ Modes opératoires et Fiches révisés ou rédigés

3. Vérification sur site des performances de la méthode

3.1. Description du processus :

Il s'agit du processus de la vérification de la méthode de sérologie de lyme. La détection des anticorps anti-Borrelia burgdorferi sensu lato de type IgM et IgG par la technique **LIAISON®XL Borrelia IgG et IgM** dans le sérum, plasma et LCR fournit un résultat de type qualitatif extrapolé à partir de données quantitatives. Aucun changement dans la technique par rapport aux recommandations du fournisseur n'a été effectué.

3.2. Description de la méthode et principe du dosage

C'est un test basé sur le principe de l'immunoluminométrie (CLIA) des antigènes recombinants spécifiques de *Borrelia burgdorferi* sont utilisés pour revêtir des particules magnétiques (phase solide) et un anticorps monoclonal de souris est lié à un dérivé de l'isoluminol (conjugué anticorps-isoluminol). Pendant la première incubation, les anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* présents dans les étalons, les échantillons ou les contrôles se lient à la phase solide. Pendant la seconde incubation, l'anticorps conjugué réagit avec les Ac anti-*Borrelia burgdorferi* déjà liées à la phase solide. Après chaque incubation, le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage. Ensuite, la réaction de chemiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps-isoluminol, est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence (RLU, relative light units) et est indicatif de la concentration d'IgG ou IgM anti-*Borrelia burgdorferi* présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles (9).

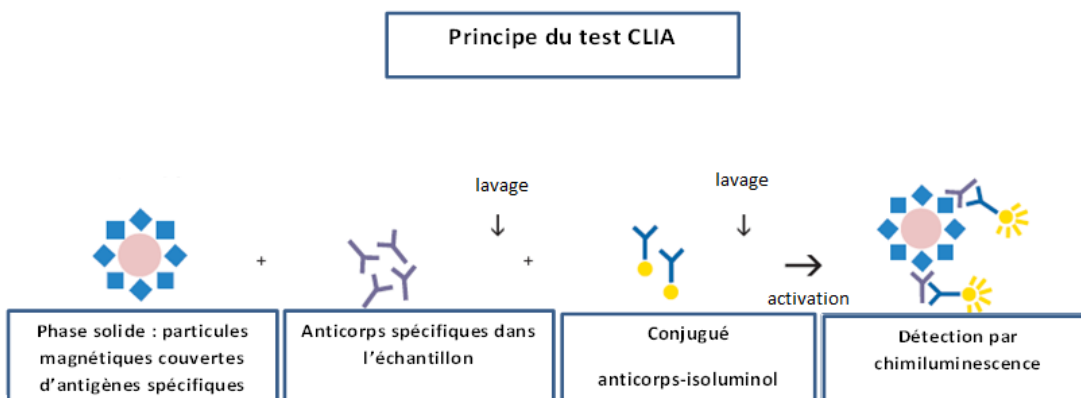


Figure2 : principe de la technique CLIA

3.3 Mise en œuvre

Mise en œuvre du processus	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode	Dr Fateh Ousser (Biologiste), Mr Guenael Tanguy(technicien)
Documents de validation / mode opératoire	Tableau d'aide à l'élaboration d'un Protocole de validation de méthode (PXA-IT-025) Maitrise des risques (PXA-IT-040) SH GTA 04 SH GTA 14
Période d'étude	29-11-2017 - 12-03-2018
Date de 1ère utilisation	12-03-2018

Tableau 2 : mise en œuvre de la vérification de méthode de la sérologie de Lyme

3.4 Maitrise des risques

La maitrise des risques a été réalisée selon la méthode des 5M et la méthode AMDEC. Cette analyse a été représentée par le diagramme d'Ishikawa(10). La maitrise des risques a été détaillé pour les étapes du pré-analytiques et analytiques dans (Figure3, Tableau3),

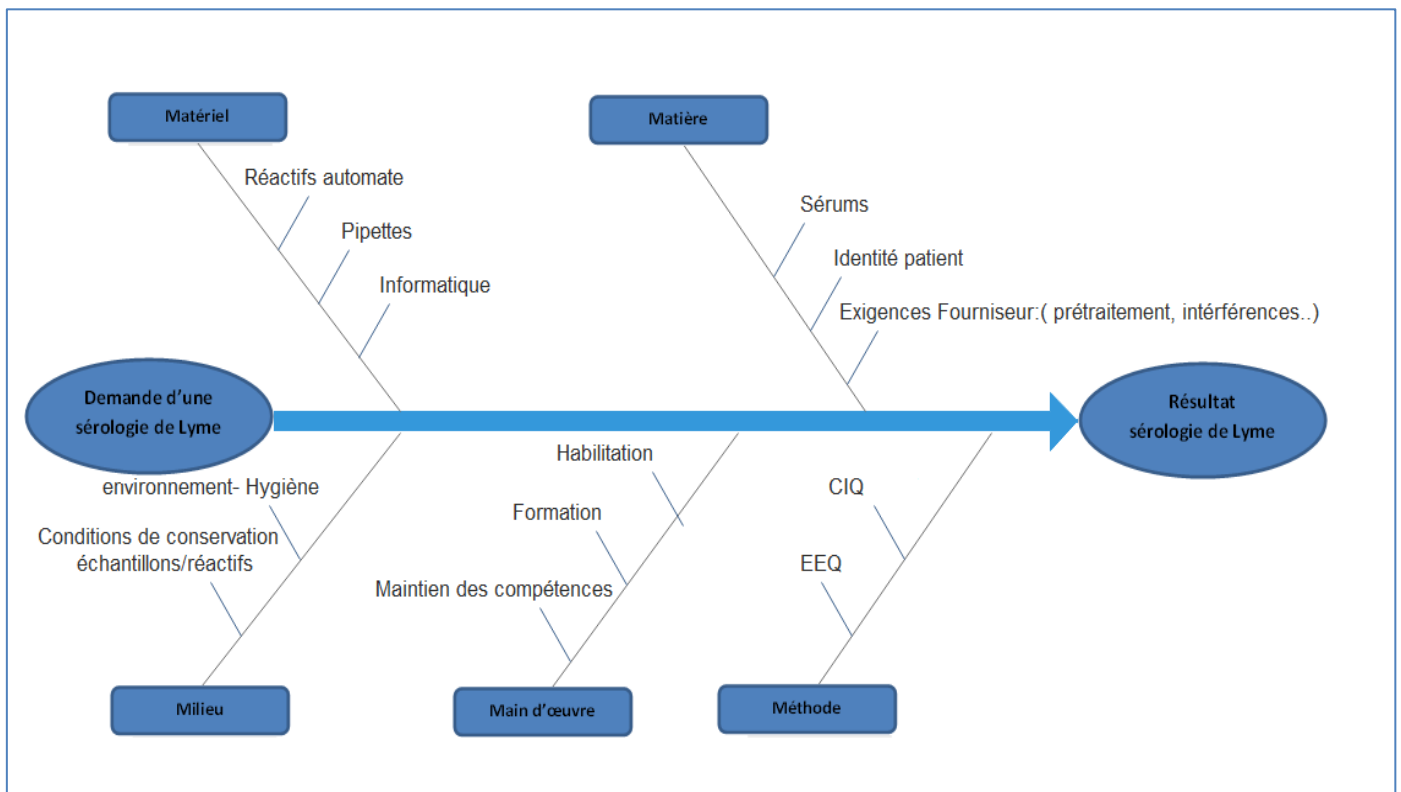


Figure 3 : Analyse des risques selon le diagramme d'Ishikawa

Tableau 3: Maitrise des risques pour l'analyse de la Sérologie de lyme

MAITRISE DES RISQUES				
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise
Matière (échantillons)	Identité	1	Formation et information du personnel	Formation du personnel Soignant
	Type de contenants	0	Tube accepté : Sang dans un tube sec Possibilité d'utiliser du plasma (EDTA/citrate/héparine)	Instructions de prélèvement dans le manuel de prélèvement Vérification à la réception PXM-MO-006 Traitement des non conformités d'échantillons à la réception PXM-MO-011
	Nature et volume de l'échantillon	0	Le volume n'est pas un élément critique	
	Délai et température avant traitement Analytique	0	Les sérums peuvent être acheminés à température ambiante en moins d'une semaine.	
	Pré-traitement : centrifugation	0	Centrifugation non critique Décantation manuelle : identification des aliquots	
	Interférences	0	Détection des interférences potentielles visuelles au cours de la décantation (hémolyse, bilirubinémie, lipémie, particules...)	Visualisation des échantillons par le technicien à la paillasse lors de la décantation. signalement au biologiste. PDF fournit par Diasorin « Aide à l'appréciation des indices sériques » (USB pack accréditation)

5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Milieu	Conditions de conservation Des échantillons	1	2-8°C pendant 7 jours au-delà conservé à -20°C	Respect des instructions du fabricant notifiées dans la notice Métrologie et suivi des enceintes thermostatées (réfrigérateurs/chambre froide/congélateurs). Enregistrements métrologiques par SIRIUS
	Conditions de conservation et d'utilisation des Réactifs	1	<p>1/ Réactif intégral (ref 310880)</p> <p>Conservation avant ouverture : 2-8°C jusqu' à la date de péremption. Stabilité après ouverture : 2-8°C pendant 4 semaines</p> <p>2/ Réactifs Starter 1 et 2 ref ☉319200)</p> <p>Conservation avant ouverture : température ambiante à l'abri de la lumière. Stabilité après ouverture : à 2-8°C ou à bord de l'automate jusqu'à la date de péremption gérée par l'automate (minimum 4 semaines)</p> <p>3/ Les contrôles</p> <p>-LIAISON contrôle Borrelia IgM ref (310011) Control (-) et Control (+)</p> <p>-LIAISON contrôle Borrelia IgG ref (310881) contrôle(-) et control(+)</p> <p>-LIAISON contrôle Borrelia IgG Liquor ref (310882)contrôle(-) et control(+)</p> <p>Conservation avant ouverture : 2-8°C jusqu' à la date de péremption. Stabilité après ouverture : 2-8°C pendant 2 semaines</p>	<p>Formation du personnel à la gestion des alarmes SIRIUS PXM-EN-043. Grille de formation correspondante PXM-MO-037</p> <p>Suivi métrologique des pipettes et formation du personnel</p> <p>Suivi de la date de péremption des réactifs « intégral » par l'automate LiaisonXL. Cependant, il est signalé par le fabricant que la date de péremption des intégrales n'est pas un élément critique et que le réactif peut être utilisé tant que les valeurs des contrôles sont dans les limites attendues.</p> <p>Date d'ouvertures des réactifs notée sur les flacons par le technicien en poste à la pailleasse [PXM-MO-050].</p> <p>Suivi des températures dans les différents compartiments de l'automate depuis l'écran de l'automate. Toute anomalie est signalée dans le journal de bord de l'automate.</p> <p>Suivi métrologique, par la société Diasorin, des sondes (prestataire la société SGS cf doc F-SUP-64b170511</p> <p>Sonde de relèvement des températures reliée à un système de Gestion des Températures Centralisée (SIRIUS)</p>
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	0	Spécifications du fabricant concernant l'intervalle de température toléré : LIAISON XL :15-32°C	

5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau	0	pH entre 5 et 8 Conductibilité : 2µSi/cm Résistivité >0.5M Ohm-cm TOC <500ppb SiO2 <1ppm Bactérie 10CFU/m	Utilisation de l'eau du commerce respectant les spécifications du fabricant
	Surveillance des dérives	1	Suivi du bon fonctionnement des équipements suivants : Réfrigérateur : entre 2 et 8°C Congélateurs : -20°C LIAISON XL : 15-32°C Périodicité des maintenances du Liaison	Alerte des maintenances quotidiennes et mensuelles a effectué. Enregistrements des maintenances du LiaisonXL dans le journal de l'automate. Traçabilité métrologique des enceintes thermostatées via SIRIUS et des pipettes Exploitation des résultats des CIQ et des EEQ
	Contamination	0	Décontamination de l'automate	Réaliser durant les maintenances hebdomadaires et mensuelles
	Informatique / Logiciels Système de Gestion Informatique: GLIMS Serveur de résultats: STARE	1	Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données	Le paramétrage est réalisé uniquement par la société DIASORIN L'étalonnage est défini par la société DIASORIN qui est la seule a pouvoir y accéder. Seule la mise à jour des protocoles est autorisée et accessible au technicien administrateur via un mot de passe. Réalisation 1 fois/an d'un dossier test permettant de vérifier l'intégrité des Données transmises par GLIMS à STARE L'archivage des données se fait sur les 2 disques durs en miroir de l'automate.

5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise
Matériel (réactifs)	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	0	Respect du mode opératoire de préparation du réactif intégral : remise en suspension des billes magnétiques grâce à un aimant situé dans l'automate pendant au moins 30s.	L'automate signale si le temps de suspension des billes est insuffisant.
	Gestion des stocks	1	La version de la notice utilisée Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Vérification des versions de notice chaque réception PXM-EN-026 Gestion des stocks au sein du service PXMIT-003 Liste des produits et consommables, stocks et besoins mensuels PXM-EN-040
Méthode	Limites de la méthode	0	Limite de quantification : -IgM : 2-290 UA/mL -IgG sérum : 2-240 UA/mL -IgG LCR : 0.2-240 UA/mL Interférences: possible si hémolyse > 1000mg/dL d'hémoglobine, lipémie > 3000mg/dL de triglycérides, bilirubinémie > 20mg/dL	
	Causes d'incertitude de mesure	0	Non applicable (NA)	
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	0	Formation et évaluation des compétences du personnel plan de formation Fréquence de passage à la pailasse	Formation du personnel avec grille de formation PXM-EN-10 et PXM-EN-54 Suivi des habilitations par un entretien annuel et les critères de maintien des compétences du personnel PXM-EN-41 Enregistrements des habilitations initiales et des maintiens des habilitations dans le logiciel qualité kalilab. Traçabilité de l'occupation des postes de travail : planning mensuel des techniciens dans le service.

3.5 Identification des performances à évaluer :

Pour réaliser les validations de méthode, Les documents supports suivants ont été utilisés :

- la procédure générale de vérification des méthodes analytiques.
- la procédure de gestion de la portée flexible,
- les documents COFRAC : le SH Form 43 et le SH GTA 04 et 14.
- Documents fournis et notices DIASORIN

Une vérification bibliographique et une évaluation des paramètres sur site a été fait pour l'automate LIAISON® XL. (Tableau 4)(9)

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

Tableau4: Performances à évaluer pour la vérification de méthode de la sérologie de lyme.

3.5.1 Vérification Bibliographique

Fidélité : Plusieurs échantillons de référence à différentes concentrations d'analyte ainsi que des contrôles négatifs et positifs pour IgM et IgG anti-Borrelia ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage. Les résultats ont montré des CV ne dépassant pas 15% seuil de référence choisi pour le fournisseur.

3.5.1.1 Intervalle de mesure et interprétation

IgM : l'intervalle de dosage est compris entre 2 et 190 UA /mL

IgG (sérum et plasma) : l'intervalle de dosage est compris entre 5 et 240 UA/mL

IgG (LCR) : l'intervalle de dosage est compris entre 0.2 et 240 UA/mL

Interprétation : les échantillons ayant des valeurs supérieure ou égale à celle de la borne supérieure doivent être considérés comme positifs.

Les échantillons ayant une concentration d'anticorps au-dessous à la borne inférieure de l'intervalle de dosage doivent être considérés comme négatifs.

Les échantillons ayant une concentration en anticorps comprise entre les deux bornes doivent être considérés comme douteux, le fournisseur préconise de retester les échantillons douteux pour confirmer le premier résultat, les échantillons qui sont positifs lors du deuxième test doivent être considérés comme positifs les échantillons qui sont négatifs lors du deuxième test doivent être considérés comme négatifs

3.5.1.2 Spécificité diagnostique

IgM : 88 échantillons de sérum obtenus chez des sujets vivant dans une zone endémique pour la Borréliose ont été analysés par des tests de référence (dosage immunoenzymatique, immunoblot) et ont été classés comme négatifs. Chez le même groupe de sujets, le test LIAISON XL® Borrelia IgM a fourni résultats négatifs pour

85 sur 88 échantillons, avec une spécificité diagnostique de 96.9% (intervalle de confiance à 95% : 90.4-99.3%)

IgG : 100 échantillons de sérum obtenus chez des sujets vivant dans une zone endémique pour la borréliose ont été analysés par des tests de référence (dosage immunoenzymatique, Western blot) et ont été classés comme négatifs. Chez le même

groupe de sujets, le test Borrelia IgG a fourni des résultats négatifs avec une spécificité diagnostique de 98,0% (intervalle de confiance à 95%: 93,0-100%)

3.5.1.3 Sensibilité diagnostique

141 échantillons de sérum obtenus chez des patients atteints de borréliose de Lyme caractérisée cliniquement ont été analysés par les tests LIAISON® Borrelia IgM et IgG en parallèle. Les données suivantes ont été obtenues :

Condition clinique	Nombre de cas	Résultat des IgM		Résultat des IgG		Résultat des IgM + IgG	
		% positifs	95% CI	% positifs	95% CI	% positifs	95% CI
Erythème chronique migrant	45	46,7	31,6-62,2	80,0	65,4-90,4	88,9	75,9-96,3
Neuroborréliose	57	43,9	30,7-57,7	93,0	83,0-98,1	96,5	87,9-99,6
Arthrite	39	25,6	13,0-42,1	97,4	86,5-99,9	97,4	86,5-99,9
Total	141	39,7	31,6-48,3	90,1	83,9-94,5	94,3	89,1-97,5

Tableau 5 : Sensibilité et spécificité diagnostique

3.5.1.4 Stabilité des réactifs

Le fournisseur indique que les réactifs fermés sont stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Lorsqu'ils sont Ouverts et dans l'automate d'immunoanalyse ils sont Stables pendant au moins quatre semaines. Au terme de ce délai, il est possible d'utiliser le réactif intégral si les contrôles restent dans les limites attendues.

3.5.1.5 . Interférences

Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par des anticoagulants (citrate de sodium, EDTA, héparine), par une hémolyse (jusqu'à 1000 mg/dL d'hémoglobine), une lipémie (jusqu'à 3000 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine) ou les cycles de congélation/décongélation des échantillons.

Réactions croisées : En règle générale, la présence d'anticorps potentiellement interférents ne donne pas d'interférences dans le dosage. Les anticorps étudiés ont été : (a) les immunoglobulines dirigées contre divers agents étiologiques – tels que EBV, Treponema pallidum , Toxoplasma gondii – (b) les anticorps antinucléaires (ANA) et le facteur rhumatoïde (immunoglobulines anti-Fc). Le tableau suivant synthétise les études effectuées(9).

Tableau6 : Réactions croisées IgM

Condition clinique	Nombre de cas	Résultat positif/douteux vis-à-vis des IgM
Infection par EBV aiguë primaire	10	1
Syphilis	5	0
Toxoplasmose aiguë primaire	14	0
Anticorps antinucléaires	16	0
Facteur rhumatoïde	10	0
Nombre total d'échantillons testés	55	1

Tableau7 : Réactions croisées IgG

Condition clinique	Nombre de cas	Résultat positif/douteux vis-à-vis des IgG
Infection par EBV aiguë primaire	17	1
Syphilis	40	3
Toxoplasmose ancienne	14	0
Anticorps antinucléaires	20	0
Nombre total d'échantillons testés	91	4

3.5.2. Évaluation des performances sur site et interprétation

3.5.2.1 Répétabilité

La répétabilité a été évaluée à partir des deux niveaux du CIQ (positif et négatif) pour chaque paramètre. Ces échantillons ont été passés 30 fois de suite dans la même série sur l'automate. Le CV limite retenu par le laboratoire est de 10%. Les CV retrouvés respectent bien les performances attendues. (Tableau8)

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Conclusion
CIQ Négatif Bor-M1(UA /mL)	30	4.063	0.097	2.38	10%	Conforme
CIQ Positif Bor-M2(UA /mL)	30	64.55	1.835	2.84	10%	Conforme
CIQ Négatif Bor-G1(RLU)	30	1168.93	38.36	3.28	10%	Conforme
CIQ Positif Bor-G2(UA /mL)	30	35.39	0.71	2	10%	Conforme
CIQ Négatif Bor-GCsf1(RLU)	30	449.233	21.99	4.90	10%	Conforme
CIQ positif Bor-G Csf2 (UA /mL)	30	61.89	1.95	3.16	10%	Conforme

Tableau 8 : Essai de répétabilité obtenu pour le LIAISON XL

3.5.2.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été évaluée en passant les deux niveaux de CIQ positif et négatif pour chaque paramètre deux fois par jour pendant 15 jours au fur et à mesure de l'utilisation des tests en routine. Le CV retenu est celui du fournisseur à 15%, ces CV sont en accord avec les performances attendue

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Conclusion
CIQ Négatif Bor-M1(UA /mL)	30	3.96	0.39	10.02	15%	Conforme
CIQ Positif Bor-M2(UA /mL)	30	66.39	5.03	7.59	15%	Conforme
CIQ Négatif Bor-G1(RLU)	30	1351.86	173.3	12.82	15%	Conforme
CIQ Positif Bor-G2(UA /mL)	30	38.89	3.75	9.66	15%	Conforme
CIQ Négatif Bor-GCsf1 (UA /mL)	30	506.63	67.8	13.38	15%	Conforme
CIQ positif Bor-G Csf2 (RLU)	30	65.81	4.30	6.55	15%	Conforme

Tableau 9 : Essai de reproductibilité obtenu pour LIAISON XL

3.5.2.3. Exactitude

Le laboratoire est inscrit au programme d'Évaluation Externe de la Qualité (EEQ) de Biologie Prospective. Depuis le démarrage de cette technique sur site deux échantillons d'EEQ reçus au laboratoire ont été analysés et les résultats qualitatifs obtenus ainsi que les interprétations et les conseils en regard des cas cliniques correspondants ont été conformes aux résultats attendus.

3.5.2.5 Contamination inter-échantillons

Afin d'évaluer les éventuelles contaminations inter-échantillons, trois échantillons négatifs ont été passés entre des échantillons positifs. Aucune contamination inter-échantillon n'a été mise en évidence. De plus, le matériel utilisé par l'automate est à usage unique et les procédures de rinçage recommandées par le fabricant sont respectées.

3.5.2.6 Comparaison de méthode

Une comparaison avec l'ancienne méthode (ETI-MAX-MIKROGEN) a été réalisée sur les trois paramètres IgM, IgG sérum et plasma ainsi que IgG LCR

Pour cela 41 échantillons de patients et 3 EEQ couvrant de façon homogène le domaine physiopathologique analysés récemment par l'ancienne méthode ont été analysés avec le nouveau kit sur LIAISON XL. Les résultats ont été analysés par une étude des discordances à l'aide du calcul de l'index Kappa pour la comparaison avec l'ancienne méthode utilisée, (Tableau 10 et 11) on prenant les résultats équivoque comme étant des positifs.

Celle-ci a montré une bonne corrélation entre les résultats des deux méthodes.

		LIAISON		
		Positif	Négatif	
ETI-MAX	Positif	18	4	22
	Négatif	2	20	22
		20	24	44

K= 0.72

Tableau 10: Comparaison IgM

		LIAISON		
		Positif	Négatif	
ETI-MAX	Positif	36	0	36
	Négatif	1	7	8
		37	7	44

K= 0.96

Tableau 11 : Comparaison IgG Sérum et plasma

Acoord	Index kappa
Excellent	≥ 0.80
Bon	$0.60 \leq k < 0.80$
Moyen	$0.40 \leq k < 0.60$
Médiocre	$0.20 \leq k < 0.40$
Mauvais	$0 \leq k < 0.20$
Exécrable	< 0

Tableau 12 : Interprétation des valeurs de l'index kappa(11).

Argumentaire de la comparaison :

1-IgM et IgG sérum et plasma :

La comparaison entre les deux méthodes doit inclure les deux paramètres IgM et IgG car pour le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme les deux tests sont réalisés systématiquement.

4 patients ont eu un résultat positif en IgM (Immuno-Blot négatif ou douteux) par la méthode ETI-MAX négatifs par la méthode LIAISON®XL dans les 4 cas on note un résultat positif pour les IgG détectés par les deux méthodes ce qui signifie une discordance analytique en IgM qui n'a pas de signification clinique et n'influençant pas la prise en charge des patients qui selon leur contexte cliniques explorés n'avaient pas de signes cliniques en faveur d'une forme précoce de la maladie de Lyme.

Deux cas ont donné un résultat négatif en ETI-MAX douteux en LIAISON®XL et qui se sont avéré de vrais négatifs en réalisant le test de confirmation par Western Blot.

Concernant les IgG une seule discordance a été noté chez un patient ayant un test positif en IgG par LIAISON®XL et négatif par la méthode ETI-MAX un cas facilement résolu grâce à la présence de la méthode de confirmation par Immuno-Blot.

2-IgG LCR : vu le nombre limité de prélèvements de LCR reçus par le laboratoire et le volume insuffisant des prélèvements conservés seulement 9 prélèvements de LCR ont pu être analysés par les deux méthodes 8 négatifs par la méthode ETI-MAX ont donné un résultat négatif par LIAISON®XL un seul prélèvement été positif concordant avec les deux techniques.

ETI-MAX						LIAISON XL			
IgG	Titre IgG	IgM	Titre IgM	Score blot IgG	Score blot IgM	IgG	valeur	IgM	valeur
Positif	>100	Négatif	10,928	19	-	positif	169,1	negatif	2,479
Positif	>100	Négatif	5,138	21	-	positif	138,1	negatif	4,21
Positif	>100	Positif	53,078	35	0	positif	>240	negatif	5,091
Négatif	6,369	Positif	48,32	-	9	negatif	<5	positif	21,39
Positif	>100	Positif	46,181	30	8	positif	>240	negatif	9,243
Positif	>100	Négatif	7,555	25	1	positif	>240	negatif	6,114
Positif	>100	Négatif	8,597	20	-	positif	133,2	negatif	<2
Positif	>100	Positif	>100	24	5	positif	113	positif	42,77
Positif	>100	Positif	>100	20	6	positif	96,76	positif	63,62
Positif	>100	Négatif	7,742	26	-	positif	180,9	negatif	<2
Négatif	6,15	Positif	>100	-	9	negatif	<5	positif	131,6
Positif	>100	Positif	42,246	16	8	positif	36,2	negatif	16,03
Positif	36,401	Négatif	7,085	20	-	positif	41,19	negatif	5,368
Positif	>100	Négatif	6,15	20	-	positif	>240	negatif	6,852
Positif	>100	Négatif	6,484	15	-	positif	42,28	negatif	6,4
Positif	>100	Négatif	6,146	20	-	positif	38,85	negatif	3,049
Positif	>100	Négatif	4,84	16	-	positif	238,1	negatif	3,016
Positif	>100	Positif	>100	21	15	positif	104,6	positif	173,2
Positif	>100	Négatif	16,384	20	-	positif	30,81	negatif	13,42
Positif	>100	Négatif	3,872	11	-	positif	80,11	negatif	<2
Positif	>100	Positif	>100	24	8	positif	142,6	positif	41,18
Negatif	6,545	Négatif	5,666	NA	NA	negatif	<5	negatif	4,424
Positif	>100	Positif	>100	11	9	positif	132	positif	65,67
Positif	>100	Douteux	22,191	16	9	positif	178,5	negatif	9,554
Negatif	5,34	Négatif	3,302	NA	NA	negatif	<5	negatif	7,097
Positif	>100	Positif	46,497	11	12	positif	194,3	positif	22,3
Positif	>100	Positif	>100	6	19	positif	126,6	positif	169
Négatif	8,243	Positif	>100	-	14	positif	34,11	positif	>190
Positif	>100	Négatif	14,21	25	-	positif	>240	douteux	19,78
Positif	>100	Positif	>100	25	18	positif	139,9	positif	182,4
Positif	>100	Douteux	20,523	35	5	positif	220,7	eqv	21,04
Negatif	6,454	Négatif	13,519	NA	NA	negatif	<5	negatif	8,406
Negatif	4,747	Négatif	9,713	NA	NA	negatif	<5	negatif	7,269
Positif	46,918	Négatif	7,514	26	-	positif	37,92	negatif	4,809
Positif	>100	Positif	>100	25	9	positif	196,2	positif	188,5
positif	21,506	Positif	>100	11	14	positif	48,34	positif	185,2
Positif	>100	Positif	37,075	20	1	positif	180	positif	40,81
Positif	>100	Négatif	10,512	11	-	positif	115,3	negatif	17,89
Negatif	7,071	Négatif	17,668	NA	NA	negatif	<5	douteux	19,41
Positif	>100	Positif	46,514	20	8	positif	>240	positif	21,45
Positif	>100	Négatif	11,51	30	-	positif	107,1	negatif	15,11
Positif	>100	Négatif	7,993	16	-	positif	37,34	negatif	7,24
Positif	100	Positif	51	15	9	positif	74,21	positif	30,09
Positif	53	Positif	38	1	9	positif	34,75	positif	45,28

Tableau 13 : Comparaison entre les deux méthodes ETI-MAX et LIAISON® XL

4. Conclusion et décision sur la validation opérationnelle de la technique

La vérification des performances de la technique LIAISON®XL n'a pas montré d'anomalie technique, les résultats obtenus sont satisfaisants par rapport aux objectifs attendus. La comparaison de méthodes n'a pas révélé de discordance significative.

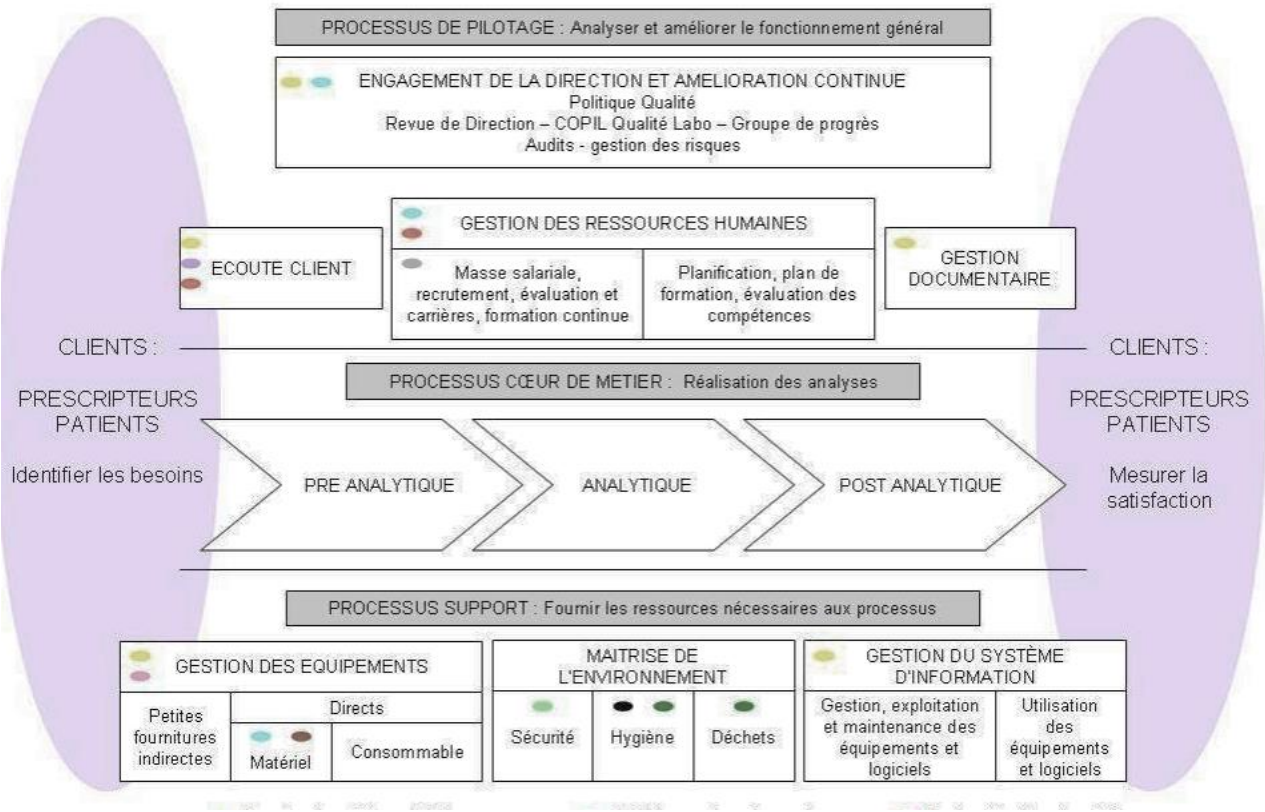
Sur la base de ces données la technique a été validée et utilisée dès le 12 Mars 2018 au laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

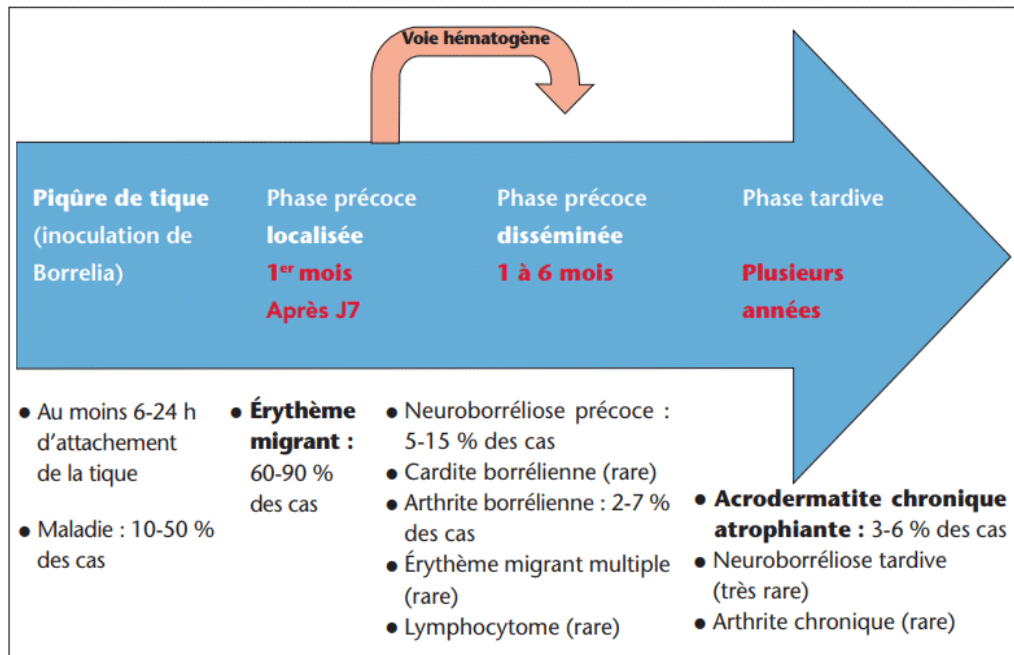
1. Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
2. LOI n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale.
2013-442 mai 30, 2013.
3. Norme NF EN ISO 15189 Déc 2012.
4. LAB GTA04. Guide de validation des méthodes en biologie médicale.
5. LAB GTA14. Guide d'évaluation des incertitudes de mesure des analyses de biologie médicale.
6. SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.
7. SH REF08. Expression et évaluation des portées d'accréditations CO-FRAC, 2010.
8. E PILLY - Maladies infectieuses et tropicales 2018 Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT) | Éditeur : CMIT ALINEA PLUS
Année : 09/2017 (26ème édition)
9. Notices DIASORIN : LIAISON Borrelia IgG-IgM FR- 200 /007-881, 05-2017-03
10. P. Pernet : Management de la qualité, Généralités, cours DU assurance qualité 2017_2018.
11. Pratiques des bio-statistiques :
<http://webapps.fundp.ac.be/biostats/biostat/modules/module35/page12.html>

ANNEXES

Annexe1 : Cartographie des processus du LBM Pitié-Salpêtrière-Charles Foix



Annexe 2 : Histoire naturelle de la maladie de Lyme



RESUME

Depuis la parution de l'Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, les laboratoires de biologie médicale ont l'obligation de s'accréditer conformément à La norme NF EN ISO 15189, qui stipule que les procédures d'examens doivent faire l'objet d'une validation indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées.

Ce mémoire présente la vérification sur site de la méthode de dosage des anticorps anti-Borrelia sp sur L'automate LIAISON® XL qui a été effectuée au sein l'unité de sérologie Bactérienne du laboratoire de Bactériologie-Hygiène de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

Afin de réaliser ce projet nous avons créé un groupe de travail et planifier les tâches des différents acteurs. Ce projet a été piloté grâce à un planning et à des réunions avec les équipes de Parasitologie-mycologie et de Bactériologie.

Les manipulations techniques sur les performances de la méthode nous a permis de conclure à la conformité de la méthode utilisée dans notre laboratoire.

L'utilisation en routine a révélé quelques problèmes de faux positifs d'anticorps de type IgM qui incite à faire d'autres tests de confirmation ainsi qu'un suivi sérologique du patient ce qui engendre un surplus d'activité et un retard de diagnostic, de ce fait on envisage de réajuster l'intervalle de référence de ce paramètre grâce au calcul de l'incertitude de mesure avec à l'aide des contrôles de qualité internes et externes.

