

Access Total β hCG Référence 33500 utilisé avec systèmes d'immunoanalyse Access

Madame, Monsieur,

Comme le rappellent de nombreux articles scientifiques 1,2, tous les systèmes d'immunoanalyse sont sensibles aux facteurs préanalytiques et, en particulier, pour le dosage de molécules dont le seuil décisionnel est proche de la limite de détection. Dans ce sens, nous avons mené des investigations sur l'impact des facteurs pré-analytiques sur le test Access Total β hCG. Il s'agit d'une démarche qui s'inscrit dans notre volonté de vous accompagner dans votre démarche d'accréditation. En effet, la maîtrise des procédures préanalytiques est une exigence de la norme NF EN ISO 15189 (paragraphe 5.4).

Ainsi, nous avons démontré lors d'essais réalisés en interne, que des résultats faussement élevés pouvaient être obtenus avec le test Access Total β hCG lorsque les étapes préanalytiques n'étaient pas suffisamment maîtrisées. Ces résultats élevés sont observés, en particulier, sur des échantillons ayant des valeurs proches de la limite basse de la gamme de mesure. Cette situation peut conduire à une erreur de diagnostic pouvant être à l'origine d'un retard de traitement du patient.

Ces essais ont porté sur les résultats d'environ 3000 échantillons analysés dans des laboratoires différents. Ils ont démontré une variabilité de la fréquence des résultats faussement élevés entre les différents sites. Cette variabilité étant liée au type d'échantillon, de tube et à la méthode de centrifugation des échantillons.

En conséquence, afin de réduire au maximum le risque de rendu de résultats faussement élevés avec le test β hCG nous vous recommandons :

- D'évaluer vos protocoles actuels afin de vous assurer que les procédures requises ont été mises en place dans votre laboratoire, en conformité avec les exigences du paragraphe 5.4 de la norme NF EN ISO 15189.
- De suivre les instructions relatives à la manipulation des échantillons que vous trouverez dans la notice du test Access Total β hCG et plus particulièrement les conditions de prélèvement, le type de tube utilisé, la maîtrise des conditions de transport et de stockage des échantillons, les temps de coagulation et les conditions de centrifugation (Nombre de g).
- De prendre connaissance du document « Etape cruciale de l'acte de biologie médicale : La phase préanalytique » que vous trouverez joint à ce courrier.

L'AFSSAPS a été informée de cette communication.

Merci de vous assurer que tous les utilisateurs du test Access β hCG sont avertis de cette situation et d'intégrer ce courrier dans la documentation Qualité de votre analyseur. D'autre part, afin de nous permettre de vérifier la bonne réception de ce courrier, nous vous remercions de nous renvoyer, sous 10 jours, le fax réponse ci-joint après l'avoir complété.

Nous vous remercions de la confiance que vous témoignez à notre marque.

Veillez recevoir, Madame, Monsieur, l'assurance de notre sincère considération.

Christian NOURRIN
Directeur Qualité
cnourrin@beckman.com
01 49 90 92 13

Nicolas ROHRBACH
Chef de produits
nrohrbach@beckman.com
01.49.90.92.12

¹ Marks V. - False-positive immunoassays results: a multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes in 10 donors from 66 laboratories in seven countries. *Clin Chem* 2002;48:2008-16.

² Ismail et al. - Wrong biochemistry results: two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid-stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results. *Clin Chem* 2002;48:2023-29.

TÉLÉCOPIE REPONSE

Pouvez-vous retourner cette télécopie à :

Beckman Coulter France**A l'attention de C.NOURRIN****Nouveau numéro de Fax N : 01 49 90 92 14****Access Total β hCG Référence 33500
utilisé avec systèmes d'immunoanalyse Access***

Merci de compléter les sections ci-après :

Nom du laboratoire :

- J'ai bien pris connaissance de l'information qualité IPCA 15144 concernant le risque de résultats faussement élevés avec le test Access Total β hCG.

NOM et signature : _____

Date : _____

Titre : _____

Etape cruciale de l'acte de biologie médicale :

La phase préanalytique

La phase préanalytique est une étape cruciale de la réalisation de l'examen de biologie. Elle conditionne la validité du résultat et plusieurs signalements de réactovigilance ont mis en évidence l'importance de respecter les conditions de manipulation des échantillons. Ce document est un bref rappel des éléments à prendre en compte pour obtenir un échantillon sanguin de qualité.

Les analyses de biologie médicale font partie intégrante de la chaîne de soins. Leur réalisation inclut plusieurs étapes :

- La prescription,
- La phase préanalytique qui débute dès la préparation du prélèvement et s'arrête quand l'analyse proprement dite de l'échantillon commence
- La phase analytique qui est la phase d'obtention et de validation technique et biologique du résultat
- Le transfert du résultat vers le prescripteur
- L'utilisation du résultat par le prescripteur
- La conservation et/ou l'élimination des échantillons

Ces dernières années, la phase analytique de la biologie médicale a bénéficié de progrès technologiques et scientifiques importants mais la sophistication des procédés utilisés rend encore plus importante la phase préanalytique. Dans le cadre de leur système d'assurance qualité, les laboratoires doivent attacher une importance toute particulière à ce point.

▶ La phrase préanalytique en pratique

La phase préanalytique comporte le prélèvement proprement dit, le transport et la conservation de l'échantillon, sa centrifugation et éventuellement son prétraitement jusqu'à l'analyse proprement dite. Cette étape préanalytique est sous la responsabilité du biologiste (conformément au GBEA) qu'elle soit traitée par des personnes placées sous sa responsabilité (techniciens, préleveurs) ou non (infirmières des services cliniques).

Le GBEA précise en particulier que le laboratoire doit disposer de procédures et modes opératoires écrits, datés et validés concernant :

- Les instructions relatives à la préparation du patient et aux modalités de prélèvement,
- Le choix du récipient destiné à recevoir l'échantillon,
- Le mode de prélèvement,
- L'identification du patient et de l'échantillon : nom patronymique, prénom, nom marital, sexe et date de naissance,
- Le transport éventuel des échantillons,
- Le traitement préalable de l'échantillon (centrifugation, répartition en fractions aliquotes...),
- La conservation avant et après analyse.



Lorsque les prélèvements sont transmis à un autre laboratoire, ils doivent être accompagnés d'une fiche de prélèvement (arrêté du 20 juin 2003, J.O.R.F. du 3 juillet 2003) qui demande de vérifier le respect du délai et de la température de transmission indiqués dans la procédure ainsi que la conformité des échantillons à la réception.

Le choix du tube : étape à ne pas négliger

Des récipients (dont les tubes à prélèvement sous vide) sont utilisés pour le prélèvement, le transport et la conservation des liquides biologiques, en particulier du sang. Les matériaux (verre, polymère) et les additifs (activateurs de coagulation, séparateur de phases) composant les tubes à prélèvement ont fait l'objet d'améliorations constantes de la part des fabricants. Ils répondent à une évolution des pathologies (plus grand nombre de patients sous anticoagulant), des flux de travail (raccourcissement du temps de rendu du résultat), des critères de qualité et de sécurité (travail en tube primaire).

Faciles à utiliser, ils ont tendance à faire oublier la nécessité de respecter les différentes étapes préanalytiques.

Ces tubes sont des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DIV) marqués CE qui répondent aux exigences essentielles de la directive européenne sur les DIV (98/79/CE) transcrite en droit français par l'ordonnance 2001-198 du 1er mars 2001 (J.O.R.F. du 3 mars 2001). Ils sont conformes à la norme EN 14820 «Récipients à usage unique pour prélèvements de sang veineux humain». L'organisation et les procédures de fabrication de ces DIV sont donc bien définies et de même niveau que celles des fabricants de réactifs et d'instruments. Les conditions et les limites d'utilisation sont mentionnées,

soit sur les emballages, soit dans les notices d'utilisation, soit sur les fiches techniques. Elles doivent être suivies scrupuleusement.

Pour certains paramètres ou groupe de paramètres, les fabricants de systèmes analytiques précisent dans leurs notices le ou les types de tubes et/ou d'additifs compatibles avec leurs instruments et leurs réactifs. Cependant, ils ne peuvent pas valider tous les tubes avec tous les couples réactifs/automates mis sur le marché. Il appartient donc au biologiste, conformément au GBEA, de valider la combinaison tubes/réactif/automate utilisée dans son laboratoire.

Le biologiste s'appuiera sur les différents documents fournis par les fabricants des différents types de tubes de prélèvement en tenant compte des procédures définies (ordre de prélèvement des tubes, durée maximum de conservation et transport avant analyse...).

La manipulation de l'échantillon : étape délicate

A titre indicatif il faut :

- Ne pas laisser le garrot trop longtemps,
- Ne pas trop serrer le garrot,
- Respecter l'ordre de prélèvement des tubes,
- Respecter le niveau de remplissage et le ratio sang/additif pour éviter les interférences soit entre l'additif et certains marqueurs (ex : Tnlc et héparine) soit entre l'additif et son milieu (ex : fluorure et hémolyse),
- Homogénéiser les tubes après le prélèvement par 6-8 retournements lents pour permettre une action complète de l'additif. Ceci concerne aussi les tubes de verre secs puisque dans ce cas, la paroi sert d'activateur,
- Pour l'obtention d'un sérum, respecter le temps nécessaire à la formation et à la rétraction du caillot (30 à 60 minutes en l'absence de prise d'anticoagulants par le patient),
- Adapter les conditions de centrifugation aux paramètres recherchés, aux méthodes de dosage et au type d'échantillon. Les conditions de centrifugation habituelles (hors hémostase) sont de 1300 - 1500 g pendant 10 minutes (avec une centrifugeuse à rotor angulaire, ne pas dépasser une force relative de centrifugation de 1300 g avec des tubes en verre et éviter d'utiliser des tubes à gel séparateur car la barrière séparatrice ne sera pas perpendiculaire à la paroi). L'Organisation Mondiale de la Santé conseille une

force relative de centrifugation de 1500 g minimum pour les échantillons de sérum et de 2500 g pour les plasmas (Cf. bibliographie). La température de centrifugation doit rester <30°C mais pour certains paramètres, il peut être nécessaire de maintenir une température de 18°C ou de 4°C. Quelle que soit la température retenue, il est souhaitable d'utiliser une centrifugeuse thermostatée ou aérée, si ce n'est réfrigérée.

- Pour les paramètres d'hémostase appliquer les recommandations du Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (Cf. bibliographie).
- Décanter le sérum ou le plasma et/ou utiliser des tubes avec séparateur de sérum ou plasma.

Le non-respect de recommandations de manipulation des échantillons peut provoquer une hémolyse, la présence de fibrine retard due à une coagulation (sérum) ou à une anticoagulation (plasma) incomplète, une formation défectueuse de la barrière de gel pouvant conduire à des pannes d'analyseurs et à un manque de fiabilité des résultats.

Exemple :

L'Afssaps a indiqué dans une note du 31 mars 2005 que, pour des tubes contenant de l'héparinate de lithium avec ou sans gel séparateur, l'absence d'une homogénéisation soignée de l'échantillon dès la fin du prélèvement et/ou une centrifugation à une température >30°C avaient été les seuls facteurs contributifs à la présence de fibrine associée à des plaquettes visibles ou non, en surface du plasma. Associés aux caractéristiques intrinsèques de certains analyseurs (faibles volumes utilisés pour l'analyse, absence de pré-dilution, pipetage en surface du plasma), ils ont été la cause de résultats aberrants et/ou d'un manque de reproductibilité du dosage de certains paramètres de chimie clinique (LDH, créatinine et électrolytes).

Les non conformités les plus fréquemment rencontrées sont :

- Hémolyse,
- Absence d'identification du patient,
- Choix incorrect du tube,
- Mauvais ordre de prélèvement,
- Non-respect des instructions avant ou post prélèvement,
- Problème d'étiquetage,
- Mauvaise condition de transport,
- Délai d'acheminement incorrect...

▶ **Les aléas analytiques**

Malgré le respect des recommandations préanalytiques, les résultats des dosages peuvent cependant être modifiés du fait des caractéristiques intrinsèques du sérum et du plasma :

• **Rôle de la concentration intracellulaire de certains analytes/médicaments**

La kaliémie est plus élevée dans le sérum que dans le plasma (de 0,2 à 0,7 mmol/L) du fait du relargage du potassium par les plaquettes au moment de la coagulation. De même pour la concentration de phosphate dont le taux est corrélé au nombre de plaquettes.

L'activité mesurée de certains enzymes (ex : LDH, PAL) peut être significativement différente entre le sérum ou le plasma.

Enfin, du fait de leur concentration intraérythrocytaire élevée, il est préférable de doser la cyclosporine, le tacrolimus et les autres médicaments anti-rejet sur sang total prélevé sur EDTA.

• **Rôle de la coagulation**

Pour le dosage des protéines totales, leur taux est plus élevé dans le plasma que dans le sérum, le fibrinogène et d'autres protéines étant consommés lors de la coagulation. Par contre l'ammoniémie est en excès dans le sérum du fait d'une production liée à la déamination des acides aminés au cours du processus de coagulation.

• **Rôle de l'anticoagulant**

L'héparine ayant une affinité pour la vitamine B12, le sérum est recommandé pour son dosage et celui des folates. De plus, le sel de lithium entraînerait la libération de vitamine B12 de sa protéine porteuse donnant des résultats par excès.

• **Rôle du délai avant analyse**

Ce point est important pour les gaz du sang, les lactates ou la glycémie, paramètres impliqués dans le métabolisme cellulaire mais aussi par exemple pour la kaliémie, la LDH et l'aldolase car leur concentration intracellulaire est supérieure aux concentrations plasmatiques ou sériques. Pour les dosages plasmatiques, les variations sont corrélées au nombre d'éléments figurés résiduels. La reproductibilité est généralement meilleure sur un échantillon de sérum.

La perte ou la diminution d'activité de l'anticoagulant et la température de conservation de l'échantillon (activation de la coagulation par le froid et la chaleur) sont des facteurs à prendre en compte.

La stabilité des analytes en fonction du prélèvement et de la température de conservation a fait l'objet d'un document de synthèse publié par l'Organisation Mondiale de la Santé que l'on peut trouver sur son site à l'adresse suivante :

http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_DIL_LAB_99.1_Rev.2.pdf

► **Les autres critères à prendre en compte**

Certains points ne doivent pas être négligés, en particulier :

• **Les interférences dues au prélèvement**

De la fibrine peut rester présente dans un prélèvement sérique mais également dans un échantillon hépariné.

Exemple : pour le dosage de la FSH, une coagulation insuffisante ou une contamination par l'héparine donnent des résultats par excès.

L'anticoagulant peut également jouer un rôle.

Exemple : l'héparine (en réduisant par liaison avec les troponines leur immunoréactivité) et l'EDTA (par rupture de complexes calcium-dépendants de la troponine Ic) interfèrent avec le dosage de ce marqueur.

Le fibrinogène, les sels d'héparine comme l'héparine elle-même peuvent interférer avec certaines méthodes.

• **Le fonctionnement de l'analyseur**

La présence de fibrine retard peut provoquer d'importantes perturbations. Elle peut obstruer la sonde de prélèvement ou être présente sous forme de micro-caillots dans la chambre de réaction donnant des résultats erronés et non reproductibles.

• **Le délai de transport de l'échantillon du lieu de prélèvement au laboratoire.**

Un temps important à prendre en compte et souvent mal maîtrisé, en particulier en milieu hospitalier. La concentration de plusieurs paramètres, liés au métabolisme cellulaire, varie plus ou moins rapidement (15 minutes pour le lactate, 2 heures pour la glycémie...)

► **En conclusion**

Du fait de l'évolution des techniques et des outils mis à la disposition des biologistes, la phase préanalytique est devenue une étape primordiale dans la réalisation d'un acte de biologie médicale. Ce point a été mis en évidence à plusieurs reprises par la survenue d'incidents signalés à l'Afssaps et qui avaient pour objet le non-respect de cette phase.

Les laboratoires d'analyse de biologie médicale soucieux de qualité doivent attacher une importance toute particulière à cette étape indispensable à la qualité des résultats.

Bibliographie :

- «Sérum ou plasma, quel liquide biologique en chimie clinique ?» édité par la société Becton Dickinson France SAS, Unité Preanalytical Systems (Vacutainer) Diagnostics
- Guide de Bonne Exécution des Analyses – arrêté du 26 novembre 1999- JO du 11 décembre 1999
- Documents internes SFRL
- WHO - Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations- 2002 WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2
- Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) Les variables préanalytiques en hémostase : recommandations du GEHT – Sang Thrombose Vaisseaux, 1998 ; 10 (25) N° spécial, John Libbey, Février 1998
- Polack B., Boneu B., Schved J-F. Preanalytical recommendations of the "Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose" for venous blood testing in hemostasis laboratories. Haemostasis 2001 ; 31 : 61-68.

Tous nos remerciements à la société Becton Dickinson pour son conseil et son expertise lors de la rédaction de ce document