

## **Sysmex Educational Enhancement & Development**

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex

Bulletin d'information SEED-Afrique | No 9 | 2011

### **Contrôle qualité dans le cadre des tests de coagulation**

#### **Coagulation de base**

L'objectif de ce bulletin d'information est de fournir une vue d'ensemble du contrôle qualité interne et de la résolution des problèmes dans le cadre des tests de coagulation de base.

#### **Mots-clés:**

Contrôle qualité, TQ, APTT

#### **Temps de Quick (TQ) et temps de thromboplastine partielle activée (APTT)**

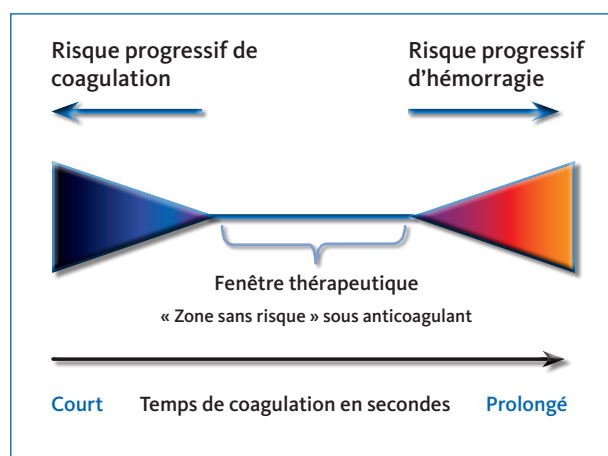
Comme nous l'avons vu dans les précédentes éditions de ce bulletin d'information, la principale indication des tests du TQ (exprimé par le rapport international normalisé [international normalized ratio] ou INR) et de l'APTT est de suivre respectivement les effets anticoagulants de la warfarine et de l'héparine. Ces deux produits présentent une fenêtre thérapeutique très étroite. Cela signifie que le patient est touché de manière indésirable si les résultats de test se situent hors de cette plage : s'ils sont trop élevés, il peut saigner, s'ils sont trop bas, il risque de développer un caillot sanguin (cf. figure 1). Des millions de patients dans le monde

sont sous traitement anticoagulant chronique, les conséquences de résultats de test erronés peuvent donc être très graves.

À cet égard, il est crucial que les résultats du TQ et du TTPA établis par le laboratoire soient exacts et précis. Le seul moyen d'y parvenir est d'appliquer de strictes procédures internes de contrôle qualité.

#### **Réactif de mesure du temps de Prothrombine**

Nombre des réactifs et témoins de coagulation nécessaires aux tests de coagulation se présentent sous forme lyophilisée. La lyophilisation renvoie au processus consistant à dessiquer par congélation le réactif liquide qui élimine le composant liquide en laissant à la place une poudre sèche. Dans le cadre des tests de coagulation à partir d'un caillot, comme il faut que les composants clés (p. ex. le facteur tissulaire du réactif à la thromboplastine Innovin©) soient biologiquement actifs, la lyophilisation est nécessaire pour préserver cette fonction. Sous forme lyophilisée, le facteur tissulaire est préservé, ce qui permet de conserver très longtemps le réactif. Avant utilisation, le réactif servant à déterminer le TQ doit être reconstitué avec la quantité exacte de diluant (liquide) tel qu'indiqué dans la notice. Cette reconstitution « ranime » en quelque sorte le réactif qui est alors prêt à être utilisé dans le cadre des tests. Toutefois, il convient de noter qu'une fois reconverti en liquide, le réactif n'est utilisable que sur une période limitée. C'est ce qu'on appelle la « stabilité des flacons ouverts ». Alors que les délais d'expiration sont très longs (mesurés en mois ou années), la stabilité des flacons ouverts des réactifs et témoins se mesure en heures ou jours. Par conséquent, il est essentiel de s'assurer que l'étiquette des réactifs mentionne bien la date et l'heure de la reconstitution et de vérifier que les flacons sont stockés



**Figure 1** Diagramme de représentation de la « fenêtre thérapeutique » des temps de coagulation pour les patients sous traitement anticoagulant.

### Stockage et stabilité

Stocker entre +2°C et +8°C. À cette température, on peut utiliser le réactif fermé jusqu'à sa date de péremption (cf. étiquette du flacon).

Stabilité après reconstitution :

de +2 à +8°C	10 jours (flacon fermé)
de +15 à +25°C	5 jours (flacon fermé)
+37°C	24 heures (flacon fermé)

Les informations sur la stabilité de base sont précisées dans les guides de référence (fiches d'application) des différents analyseurs de coagulation.

### Ne pas congeler !

**Signes de péremption :** absence de vide à l'ouverture du flacon ; le réactif est difficile à reconstituer ; les résultats ne sont pas reproductibles.

**Figure 2** Extrait de la notice d'Innovin® insistant sur les conditions de stockage et de stabilité après reconstitution du réactif.

de manière appropriée. Les diverses notices fournissent plus de détails sur la stabilité des flacons ouverts selon les différentes conditions de stockage (cf. figure 2).

Le non-respect des conditions et délais de stockage est une source importante d'erreur dans le laboratoire de coagulation.

### Réactif du test de détermination du APTT

Contrairement aux réactifs utilisés pour les tests de détermination du TQ, le réactif de l'APTT (Actin FS®) se présente sous forme liquide. Cela s'explique par le fait que l'activateur qui déclenche la réaction de coagulation est une substance inerte qui n'a pas de fonction biologique inhérente. C'est la nature chargée de cette substance (acide ellagique) qui réagit au facteur XII de coagulation (point de départ de l'APTT) plutôt que l'activité enzymatique. Par conséquent, le réactif est stable comme un liquide bien que la durée de conservation soit un peu plus courte que celle des réactifs lyophilisés. Une fois le produit ouvert, les mêmes problèmes de stabilité des flacons ouverts se posent étant donné que l'exposition à l'air déclenche une lente baisse de stabilité du produit. La performance du produit n'est garantie par le fabricant quasi les délais et conditions de stockage sont respectés à la lettre.

Au contraire, le chlorure de calcium est un produit chimique complètement inerte, il offre donc une très longue durée de conservation et une longue stabilité même après ouverture.

### Plasmas témoins

Comme pour toute analyse de laboratoire, il faut contrôler régulièrement l'exactitude des résultats des tests de détermination du TQ et de l'APTT au moyen de témoins.

Comme le TQ et l'APTT mesurent essentiellement la réactivité des facteurs de coagulation en culminant lors de la conversion du fibrinogène en fibrine, la substance témoin doit contenir des facteurs de coagulation fonctionnels. Toutefois, nous savons qu'il faut dans l'idéal tester le sang prélevé pour les tests de coagulation dans les quatre heures, car les facteurs de coagulation commencent à se détériorer assez vite. Par conséquent, il s'ensuit que les témoins utilisés pour les tests de coagulation basés sur les caillots doivent comprendre du plasma. À l'instar du réactif de détermination du TQ, la fonction des facteurs de coagulation est préservée tout au long de la lyophilisation. De même, une fois reconstitués, les plasmas témoins offrent la même viabilité courte que les échantillons des patients.

Si la méthode de test fonctionne bien, le résultat obtenu pour l'échantillon témoin doit se situer dans la plage spécifiée de résultats acceptables, les « valeurs cibles ». Il est important de toujours utiliser un témoin avec valeur cible correspondant à des normes pertinentes sur le plan clinique. Dans le cadre de l'utilisation de l'APTT pour le contrôle de l'héparine, il est important d'utiliser un témoin à valeur cible situé dans la plage thérapeutique. Conformément à ce principe général, Sysmex et Siemens, son fournisseur de réactifs partenaire, proposent trois niveaux de témoins pour les tests de détermination du TQ (INR) et de l'APTT (cf. tableau 1).

**Tableau 1** Plasmas témoins utilisés pour les tests de détermination du TQ (INR) et de l'APTT

Citrol® niveau 1	Plage normale
Citrol® niveau 2	Plage thérapeutique étroite
Citrol® niveau 3	Plage thérapeutique large

<b>LOT 528104</b>		<b>EXP</b> CCYY-MM-DD 2014-01-30				
<b>Reagents/Reagenzien/Réactifs</b> <b>Reagenti/Reactivos/Reagentes</b> <b>Reagens/Reagenser/Αντιδραστήρια</b>	Assigned value Sollwert valeur-cible valore teorico valor teórico valor nominal analyseværdi analytiska värde Τιμή αναφοράς	Confidence interval Vertrauensbereich domaine de confiance Intervallo di accettabilità rango de confianza intervalo de confiança konfidensintervall konfidensintervall Τιάστημα εμπιστοσύνης	Assigned value Sollwert valeur-cible valore teorico valor teórico valor nominal analyseværdi analytiska värde Τιμή αναφοράς	Confidence interval Vertrauensbereich domaine de confiance Intervallo di accettabilità rango de confianza intervalo de confiança konfidensintervall konfidensintervall Τιάστημα εμπιστοσύνης	Assigned value Sollwert valeur-cible valore teorico valor teórico valor nominal analyseværdi analytiska värde Τιμή αναφοράς	Confidence interval Vertrauensbereich domaine de confiance Intervallo di accettabilità rango de confianza intervalo de confiança konfidensintervall konfidensintervall Τιάστημα εμπιστοσύνης
<b>Mechanical instruments/ Mechanische Instrumente/ Instruments mécanique/ Strumentazione meccanica/ Instrumentos mecánicos/ Instrumentos mecânicos/ Mekaniske instrumenter/ Tekniska instrument/ Μηχανικά όργανα</b>						
<b>Prothrombin time/Thromboplastinzeit/ Temps de Quick/Tempo di protrombina/ Tiempo/Tempo de tromboplastina/ Protrombintid/χρόνο προθρομβίνης</b>			<b>PT/TQ</b>			
	<b>%</b>		<b>INR</b>		<b>sec</b>	
Thromborel® S	80	70 - 90	1.11	0.98 - 1.24	12.4	10.9 - 13.9
Innovin®	94	83 - 105	1.02	0.90 - 1.14	9.5	8.4 - 10.6

Figure 3 Extrait de la fiche technique d'analyse d'un niveau normal de plasma témoin

### Valeurs cibles des plasmas témoins

Les plasmas témoins utilisés pour les tests de détermination du TQ et de l'APTT peuvent être analysés ou non. Un plasma témoin jugé « analysé » est fourni avec les valeurs cibles. Les valeurs cibles attribuées à un plasma témoin sont propres au réactif et à l'analyseur employé pour générer le résultat de test. Par conséquent, il est important de s'assurer que la bonne plage cible est utilisée. Aucune valeur cible n'est attribuée aux plasmas témoins non analysés. Si un laboratoire choisit d'utiliser des plasmas témoins non analysés, il doit savoir qu'il devra générer sa propre plage cible en traitant le nouveau lot de plasmas témoins sur un analyseur cinq fois par jour, pendant au moins cinq jours consécutifs.

Les résultats obtenus sont ensuite utilisés pour calculer la plage cible avec la formule « moyenne ± 2ET ». Pendant la durée d'établissement de cette plage cible, il faut continuer à contrôler les tests quotidiens au moyen du précédent numéro de lot de plasmas témoins. En d'autres termes, les jours où l'on établit une nouvelle plage cible, il faut utiliser deux lots de plasmas témoins. La figure 3 présente un exemple de fiche technique d'analyse d'un plasma témoin.

### Pourquoi l'utilisation de réactifs et témoins tiers est-elle problématique ?

L'utilisation de réactifs et témoins tiers pose problème pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les plages cibles de la fiche technique d'analyse fournies avec les plasmas témoins analysés ne sont en général disponibles que pour les réactifs et analyseurs d'un seul et même fabricant.

Si le couple réactif/analyseur exact (marque et modèle) n'est pas répertorié, le plasma témoin est par essence « non analysé » pour ce couple ou système analytique. Le laboratoire devra alors établir sa propre plage cible. Cette méthode n'est pas recommandée, sauf si le personnel du laboratoire est très expérimenté en matière de tests de coagulation. Les résultats obtenus à partir du même réactif, mais avec différents modèles d'analyseurs d'un même fabricant ne seront pas identiques. Il faut s'attendre à des différences étant donné que le temps de coagulation généré est le produit de l'ensemble du système analytique, c.-à-d. l'analyseur, la configuration du protocole et les réactifs. Comme la plage thérapeutique d'anticoagulation est étroite, les moindres variations des temps de coagulation peuvent entraîner un changement de la prise en charge clinique. À cet égard, il est impératif de déterminer des valeurs cibles de témoins propres au modèle de réactif et d'analyseur employés.

L'utilisation de réactifs tiers pose un second problème important : le fabricant des protocoles d'analyseurs automatisés les adapte précisément aux réactifs spécifiques qui ne sont pas interchangeables. Si un laboratoire décide d'utiliser des réactifs autres que ceux recommandés par le fabricant, il est l'unique responsable de la bonne configuration de l'analyseur.

### Toutes les variables qui ont une influence sur les résultats de test sont-elles décelables au moyen de plasmas témoins ?

Il est important de savoir que plusieurs facteurs pré-analytiques peuvent générer des résultats de test erronés. Ces facteurs sont en effet spécifiques à l'échantillon et indétectables par le biais des procédures de contrôle qualité internes standard. Le bulletin d'information SEED n° 2 donne une description détaillée des variables pré-analytiques ayant un impact sur les résultats des tests de coagulation. Les plasmas témoins n'évaluent que la composante analytique du procédé de test. L'utilisation de plasmas témoins ne permet pas de détecter les erreurs provoquées par la pré-analyse de traitement des échantillons dans les tests des échantillons des patients.

### À quelle fréquence doit-on traiter les plasmas témoins ?

En règle générale, il faut traiter les plasmas témoins au moins une fois toutes les 8 h. Il convient alors d'inclure un témoin normal et au moins un anormal.

### Comment détermine-t-on si les résultats du contrôle qualité sont acceptables ou pas ?

Il ne faut pas oublier que l'objectif d'un contrôle qualité interne est de garantir la fiabilité des résultats des patients. Les valeurs obtenues pour chaque niveau de plasma témoin doivent être comparées avec la plage cible acceptable conformément à la fiche technique d'analyse propre au numéro de lot de la combinaison témoin/réactif/analyseur. La valeur doit se situer dans la plage spécifiée. Cependant, la plage cible fournie est généralement assez large et en pratique, la plage des valeurs obtenues sur tel ou tel analyseur simple dans un laboratoire se réduit de jour en jour. Le degré acceptable de variation d'un jour à l'autre est déterminé par la valeur CV% de l'analyse. La valeur CV% est une mesure de la précision du test. Si une seule valeur se démarque anormalement des résultats des jours précédents, ou que plusieurs valeurs montrent une tendance à une déviation progressive des résultats au fil du temps, il faut rechercher l'éventuelle source d'erreurs. Il faut alors différer rendus des résultats des patients jusqu'à la résolution du problème.

### Quelle procédure adopter pour résoudre les problèmes ayant provoqué des résultats de CQ erronés ?

Il convient de prendre en considération un certain nombre de facteurs initiaux lorsque l'on évalue les sources d'erreur possibles :

- Est-ce qu'un seul paramètre est affecté ou bien l'ensemble d'entre eux sont concernés ?
- S'il y en a plus d'un, ces paramètres suivent-ils un principe de test commun ou pas ? Par exemple, les tests réalisés à partir de caillots uniquement ou les paramètres chromogéniques (p. ex. antithrombine) sont-ils également concernés ?
- Un seul niveau de contrôle est-il concerné ou bien s'agit-il de tous les niveaux de la plage ?
- Est-ce que tous les niveaux et tous les paramètres montrent une déviation dans la même direction. Autrement dit, sont-ils tous associés à des valeurs trop élevées ou trop basses ?
- Est-ce un événement isolé ou le même problème a-t-il déjà été observé avant ?
- A-t-on respecté la stabilité des flacons ouverts de tous les réactifs ?
- A-t-on respecté la date de péremption de tous les réactifs ?
- Le numéro de lot de la substance témoin utilisée correspond-il à celui de la plage cible du CQ ?
- Les réactifs et témoins ont-ils été correctement reconstitués ?
- Le diluant utilisé pour la reconstitution était-il le bon ?
- Le diluant était-il de bonne qualité ?
- Y a-t-il eu un problème lors du pipetage ?
- Le réactif a-t-il été bien mélangé et l'a-t-on bien laissé reposer le temps nécessaire avant utilisation ?
- L'analyseur était-il bien calibré (le cas échéant) ?
- L'analyseur a-t-il fait l'objet d'une maintenance comme demandée ?

La première étape à valider pour résoudre les problèmes de qualité interne consiste à estimer le délai susceptible de s'écouler avant résolution des problèmes. On peut ainsi déterminer s'il est nécessaire de prendre d'autres mesures pour analyser les échantillons des patients, car il est impossible de communiquer les résultats des patients tant que leurs résultats de contrôle qualité ne sont pas revenus dans des limites de performance acceptables.

Il n'existe pas de procédure fixe pour la résolution des problèmes. Il faut évaluer chaque problème au cas par cas. Il convient d'adopter une approche progressive suivant un ordre de vérifications logique. Il faut d'abord vérifier les points évidents. Il est également nécessaire de faire preuve de prudence et de prendre en considération les facteurs coût et temps. Il faut essayer de déterminer si le problème est probablement dû à une substance témoin, des réactifs ou un analyseur défectueux. En règle générale, le problème vient souvent de la substance témoin car il s'agit de la cause la plus labile ; viennent ensuite les réactifs et puis l'analyseur qui est la composante la plus stable du système analytique.

### **Quels types de problèmes sont souvent associés au plasma témoin ?**

Comme le plasma témoin reconstitué est très labile, avec une courte stabilité des flacons ouverts (maximum 16 heures pour Citrol®), l'utilisation d'une substance témoin trop ancienne est la cause la plus fréquente d'erreur de contrôle qualité interne.

On peut facilement éviter ce problème si le laboratoire respecte la pratique qui consiste à étiqueter chaque flacon reconstitué avec la date, l'heure et la signature de la personne qui l'a ouvert. Cela peut influencer sur tous les paramètres et habituellement, sur tous les niveaux : en général la personne reconstituant les témoins du jour (ou de tel ou tel changement) réalise un flacon pour chaque niveau à utiliser à ce moment. Un autre aspect à prendre en considération est la précision dont il faut faire preuve en pipetant le diluant. Un excès de diluant entraîne la dilution des facteurs de coagulation avec des temps de coagulations prolongés, tandis qu'une quantité trop faible donne lieu à un échantillon

concentré avec des temps de coagulation plus courts que prévu. Le diluant du plasma témoin est de l'eau distillée. Il est fortement conseillé aux laboratoires d'utiliser de l'« eau stérile pour injection » comme elle est vendue en petits conditionnements stériles à usage unique. Il est toutefois fréquent que les laboratoires se procurent de l'eau distillée pour reconstitution de plasma témoin et réactif à partir d'un système de purification local qui ne maintient pas toujours le niveau de stérilité souhaité, en particulier pendant le processus de prélèvement. Le développement d'éléments fongiques est relativement fréquent, ce qui peut interférer avec les optiques de l'analyseur et par conséquent avec les résultats des tests. Une simple vérification consiste à réaliser un nouveau flacon de contrôle au moyen d'eau stérile puis de retester l'échantillon. Les pannes de courant coupant par intermittence la chaîne du froid doivent également être considérées comme de possibles sources d'erreur, étant donné que la stabilité des flacons ouverts du plasma témoin Citrol® passe de 16 h si le flacon est conservé avec un bouchon au réfrigérateur entre 2 et 8 °C à seulement 8 h si la température atteint 15 °C.

### **Quels sont les problèmes les plus fréquemment associés aux réactifs ?**

Le problème le plus fréquent, à l'instar des plasmas témoins, est le non-respect de la période maximale de stabilité des flacons ouverts et la mauvaise reconstitution le cas échéant. Si le réactif est en cause, alors le problème ne concerne pas tous les niveaux du plasma témoin mais seulement les paramètres ayant un réactif en commun. Par exemple, si le réactif suspect est Innovin®, les résultats relatifs au TQ (INR) et les facteurs intrinsèques varient, mais l'APTT et les facteurs intrinsèques se situent dans les limites. Une autre source d'erreur fréquente avec les résultats relatifs à l'INR est l'utilisation d'un nouveau numéro de lot ou réactif, sans saisir la nouvelle valeur ISI et une valeur moyenne de contrôle récemment déterminée dans le protocole de la méthode sur l'analyseur. Les valeurs INR produites par l'analyseur sont établies à partir du temps de coagulation de l'échantillon de plasma mesuré avec un nouveau lot de réactifs, mais exploitant la valeur moyenne de contrôle et une valeur ISI issue de numéros de lots antérieurs. Bien que de telles différences soient

en général peu notables, elles peuvent être suffisamment significatives pour causer une erreur de contrôle qualité. C'est un cas extrêmement rare pour les réactifs pour lesquels on a maintenu la chaîne du froid, respecté la procédure de reconstitution et les limites de stabilité des flacons ouverts.

### Quels types de problèmes peuvent être dus à l'analyseur ?

L'analyseur est la composante la moins susceptible d'être la cause d'erreur du contrôle qualité. Toutefois, certains aspects simples peuvent générer des résultats erronés. Tout déversement de plasma dans les puits de détection peut nuire à la performance des optiques. Il en va de même pour les LED, composantes centrales du système optique de détection des caillots, dont il convient de vérifier de temps en temps l'intensité dans le cadre de la maintenance de base de l'analyseur. Tout manquement à cette procédure peut générer des variations des résultats. La température des puits de détection doit être de  $37\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$ . Les analyseurs sont équipés d'un système de vérification automatique permettant de confirmer que la température est idéale. Comme la formation des caillots dépend de l'activité biologique des facteurs de coagulation qui agissent de manière optimale à température corporelle, le moindre écart à la hausse ou à la baisse peut influencer nettement sur les résultats des tests. Comme chacun des puits de détection est doté de sa propre LED et de son propre système de contrôle de la température, les erreurs de résultats des tests se limitent en général à un seul puits de détection, ce qui facilite relativement leur identification.

### À retenir

Le contrôle qualité interne est un processus faisant partie intégrante des tests de laboratoire semblables aux tests de coagulation. Il faut toujours vérifier que les valeurs cibles utilisées sont adaptées au couple réactif/analyseur. En cas d'erreur de contrôle qualité des échantillons, on conserve les résultats des patients et si possible, on teste à nouveau les échantillons jusqu'à résolution du problème. Les sources d'erreur possibles sont multiples, donc il faut adopter une approche logique de résolution des problèmes. Cependant, en général, on peut imputer l'erreur en premier lieu au plasma témoin, puis aux réactifs et enfin à l'analyseur.

*Compilé par*  
Dr Marion Münster