

D. MORIN¹, A. FERRÉ¹, B. CAPOLAGHI², C. ZINGLER³, F. FRAISSINET¹, A. TRUCHAUD¹

Evaluation multicentrique d'un nouvel automate d'immuno-analyse, le KRYPTOR compact

RÉSUMÉ

L'analyseur KRYPTOR compact développé par la société CEZANNE SAS et commercialisé par la société B.R.A.H.M.S. est un automate d'immuno-analyse utilisant la technologie TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) en phase homogène. Cet automate a fait l'objet d'une évaluation multi-centrique selon un protocole issu des recommandations du National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) et du protocole de Validation des Techniques (VALTEC) de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC). Ces travaux avaient pour objectif d'évaluer d'une part, les performances analytiques du KRYPTOR compact par rapport à différents analyseurs de laboratoires, et d'autre part, sa praticabilité. Les résultats très satisfaisants, tant sur le plan analytique qu'ergonomique, de cette étude permettent d'envisager l'utilisation du KRYPTOR compact dans les laboratoires d'urgence et de biologie spécialisée.

MOTS-CLÉS

Evaluation multicentrique, immuno-analyse automatisée, urgence, biologie spécialisée

Multicenter evaluation of a new automated immunoassay system, the KRYPTOR compact

SUMMARY

The KRYPTOR compact analyzer, developed by CEZANNE SAS and marketed by B.R.A.H.M.S., is a new automated immunoassay system using TRACE technology. (Time Resolved Amplified Cryptate Emission). This system has been evaluated by three different sites, according to the National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recommendations, and to the guidelines "Protocole de Validation des Techniques" (VALTEC) of the "Société Française de Biologie Clinique" (SFBC). The aim of this study was to evaluate its analytical performances, compared to those of others automated systems, and its practicability.

This study has shown very good analytical performances and practicability. The results presented in this article prove that the KRYPTOR compact analyser may be integrated in STAT or specialized laboratories.

KEYWORDS

Multicenter evaluation, immunoassay automated system, emergency laboratory, specialized testing

I - Introduction

Le KRYPTOR compact est un automate d'immuno-analyse multiparamétrique de paillasse utilisant la technologie TRACE, une mesure de fluorescence de la réaction antigène-anticorps en phase homogène (1-3). Cet appareil a été mis au point par la société nîmoise CEZANNE (voir note 1) et se trouve commercialisé par l'entreprise allemande B.R.A.H.M.S. (voir note 2).

L'évaluation analytique a porté sur six paramètres : Procalcitonine (PCT), chaîne β libre de l'Hormone Chorio-Gonadotrophique (Free- β hCG), Al-

pha-Foeto-Protéine (AFP), Pregnancy Associated Plasma Protein A (PAPP-A), Prostate Specific Antigen (PSA) et Hormone Chorio-Gonadotrophine (hCG), et a été réalisée selon un protocole issu des recommandations du NCCLS et du protocole VALTEC (4, 5). Trois sites ont participé à cette étude : le Centre de Recherche en Technologie Biomédicale - CHU Nantes/Université de Nantes (site 1) ; l'Institut de chimie clinique et de médecine de laboratoire de Rostock (Institute of Clinical Chemistry and laboratory Medecine, Rostock, Allemagne)(site 2), et le laboratoire de Biochimie - CHR Metz/Thionville (site 3).

¹ Centre de Recherche en Technologie Biomédicale – Institut de Biologie – CHU Nantes/Université de Nantes

² Laboratoire de Biochimie – Hôpital Bel Air – CHR Metz/Thionville

³ Institute of Clinical Chemistry and laboratory Medecine – University of Rostock – Rostock Allemagne



Evaluation multicentrique d'un nouvel automate d'immuno-analyse, le KRYPTOR compact

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les performances analytiques du KRYPTOR compact et de les comparer à celles des analyseurs Elecsys 2010[®] (Roche Diagnostics, voir note 3), AutoDelfia[®] (PerkinElmer, voir note 4), Immulite[®] (SIEMENS Medical Solutions Diagnostics, voir note 5), et à l'analyseur de première génération, le KRYPTOR[®] (Cezanne SAS) (6). Parallèlement, une évaluation de praticabilité a été réalisée par les trois sites.

II - Matériels et Méthodes

1. Description du KRYPTOR compact

Le KRYPTOR compact (figure 1) est un automate d'immuno-analyse permettant un mode de travail par patient ou par série. Il réalise le dosage des marqueurs tumoraux, des paramètres de la thyroïde et de la fertilité, le dépistage anténatal de la trisomie 21, la procalcitonine (PCT), la ferritine, l'ostéocalcine, et la protéine C réactive (CRP) en phase homogène. C'est un système fermé utilisant uniquement des réactifs et des consommables KRYPTOR compact.

Il est composé de deux modules : le module de pipetage et le module de lecture. Le module de pipetage comprend le carrousel, le bras de pipetage et le système fluïdique. Le carrousel peut accueillir cinq portoirs échantillons et/ou réactifs. Chaque portoir réactifs est constitué d'une enceinte fermée réfrigérée entre 2 °C et 8 °C, pouvant accueillir quatre kits réactifs identifiés par un code-barres unique. Les réactifs lyophilisés sont reconstitués automatiquement. Les portoirs échantillons ont une capacité maximale de seize échantillons (hauteur : 60 mm - 120 mm, diamètre : 11 mm - 17 mm). Des godets positionnés dans des adaptateurs en aluminium permettent le traitement de petits volumes d'échantillons. La partie haute de ces portoirs permet le positionnement des flacons de solutions de lavages et de reconstitution (solutions 1 à 4) et des plaques de dilutions, chacun d'eux étant muni d'un code-barres. Le KRYPTOR compact est doté d'un bras de prélèvement muni d'une aiguille préchauffée réalisant une détection de niveau capacitive des échantillons

et réactifs, mais aussi une détection barométrique de caillots.

Le module de lecture est composé d'une zone d'incubation contrôlée, de la tête optique et du laser. La réaction s'effectue dans une microplaque préchauffée à 37 °C munie d'un code-barres unique. Les calibrations sont lancées à partir de calibrateurs prêts à l'emploi et les résultats sont archivés par lots de réactifs. Les contrôles qualité sont gérés à la demande avec la possibilité de niveaux différents pour un même paramètre. L'instrument permet la gestion et la traçabilité de plusieurs lots de contrôles et la représentation des résultats sous forme de diagrammes de Levey-Jennings ou de tableaux. Les échantillons urgents sont positionnés de façon aléatoire sur le portoir échantillons, et sont prélevés prioritairement par l'appareil. L'interface logicielle permet à l'utilisateur de piloter l'appareil et d'avoir une vision globale de l'état de celui-ci. Des codes couleurs indiquent l'état des réactifs, des échantillons, des plaques de dilutions et autres consommables (solutions de lavages, fluides systèmes) ainsi que de la plaque réactionnelle. Il permet de connaître les niveaux de volumes des solutions 1 à 4, des bidons de tampon et d'eau distillée et du bidon d'effluents. La maintenance, partiellement automatisée, est gérée par le logiciel. Le KRYPTOR compact est piloté par un multiprocesseur Pentium équipé de Microsoft Windows XP, d'un clavier QWERTY et d'une douchette. Une connexion bidirectionnelle est possible avec la plupart des systèmes d'informatique de laboratoire, suivant les protocoles de type ASTM ou HPRIM.

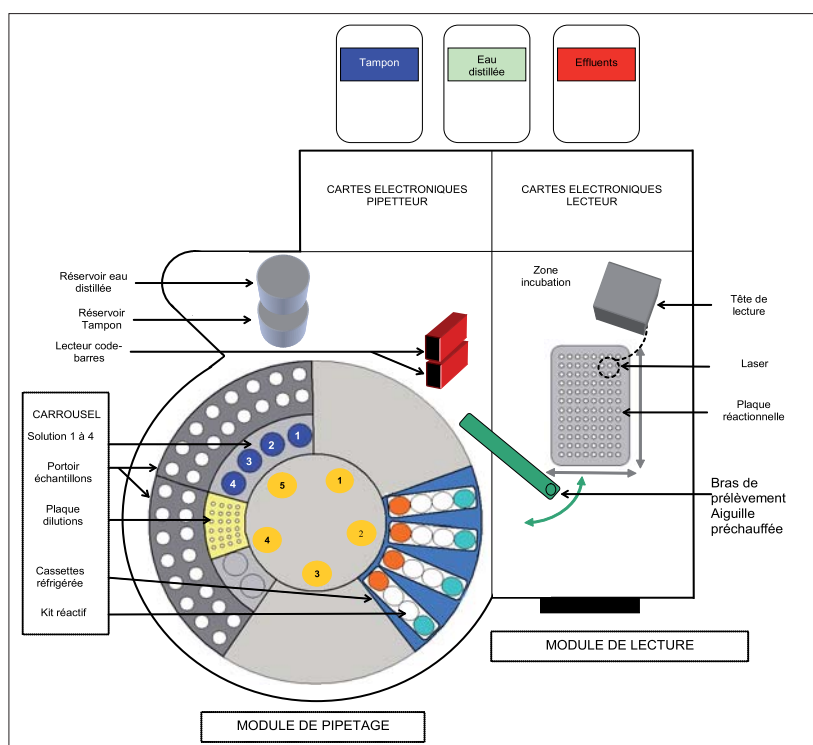


Figure 1
Représentation schématique de l'automate KRYPTOR compact.

NOTE 1

Cézanne : 280, allée
Graham Bell – Parc
Scientifique Georges
Besse – 30035
Nîmes cedex 1 – Tél. :
04 66 36 52 00
– www.cezanne.fr

NOTE 2

B.R.A.H.M.S.
en France :
B.R.A.H.M.S. France
SAS – 17, Les Allées
de l'Europe
92110 Clichy – Tél. :
01 41 40 88 40
– www.brahms-
france.fr

NOTE 3

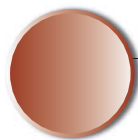
Roche Diagnostics en
France : 2, avenue du
Vercors –
BP 59 – 38242
Meylan cedex
– Tél. : 04 76 76
30 00 – www.
rochediagnostics.fr

NOTE 4

PerkinElmer en
France : 16, avenue
du Québec – Bât
L1 LP 601 – 91945
Courtabœuf Cedex
– Tél. : 0805 111
333 – www.
perkinelmer.fr

NOTE 5

SIEMENS Medical
Solutions
Diagnostics en
France : 15, av.
du gros Chêne
– ZAC des Bellevues
– BP 109 – Eragny
– 95613 Cergy
Pontoise cedex –
Tél. : 01 34 40 40 00
– www.siemens.
com/diagnostics



2. La technologie TRACE

Le principe de mesure du KRYPTOR compact repose sur la technologie TRACE qui mesure en temps résolu le signal de fluorescence émis à partir d'un immunocomplexe. Cette technologie en phase homogène supprime les étapes de lavage et de séparation. De plus, elle permet de détecter rapidement un effet crochet et de relancer l'échantillon concerné avec une dilution appropriée.

3. Les échantillons de patients

Des surplus d'échantillons ont été collectés par les trois sites évaluateurs. Les prélèvements réalisés à partir de sang veineux prélevé sur tube sans anticoagulant sur des patients, ont été centrifugés pendant 15 min à 2500g, puis aliquotés et congelés à

-20 °C. Avant utilisation, les aliquots ont été décongelés entre 20 °C et 25 °C, puis remis en suspension et centrifugés 10 minutes à 2400g.

4. Les techniques automatisées, réactifs et contrôles associés

Chacun des trois sites évaluateurs a réalisé l'évaluation du système KRYPTOR compact en comparaison avec un KRYPTOR® classique et un autre système automatisé utilisé pour les analyses en routine : AutoDelfia® (site 1), Elecsys 2010® (site 2), Immulite® (site 3).

Les réactifs, calibrateurs et contrôles ont été utilisés selon les recommandations du fabricant. Les réactifs et contrôles BRAMHS KRYPTOR utilisés ont été les suivants :

Réactifs : PCT (ref. 825.050), FreeβhCG (ref. 809.075), AFP (ref. 816.075), PAPP-A (ref. 866.075), Total

Tableau I

Etude de précision. Site 1 : CHU Nantes/Université de Nantes ; site 2 : Institut de chimie clinique et de médecine de laboratoire de Rostock ; site 3 : Laboratoire de Biochimie - CHR Metz/Thionville.

			n	Cible	Min-Max mesurés	Moyenne	Ecart type	CV %
PCT (ng/mL)	PCT1	Site 1	20	0,34	0,270 - 0,410	0,337	0,024	7,1
		Site 2				0,373	0,015	4,1
		Site 3				0,348	0,018	5,1
	PCT2	Site 1		13,2	10,56 - 15,84	13,2	0,27	2,1
		Site 2		13,8		13,8	0,32	2,3
		Site 3		13,3		13,3	0,31	2,3
Free-βhCG (ng/mL)	GMC1	Site 1	20	81,8	65,4 - 98,2	82,1	0,68	0,8
	GMC2			20,30	16,24 - 24,36	20,1	0,22	1,1
	GMC3			8,00	6,40 - 9,60	7,9	0,10	1,3
AFP (ng/mL)	GMC1	Site 1	20	10,9	8,72 - 13,08	11,4	0,2	1,4
		Site 2				11,8	0,9	3,2
		Site 3				10,6	0,4	4,2
	GMC2	Site 1		37,0	29,6 - 44,4	37,8	0,4	1,0
		Site 2				38,9	0,9	2,4
		Site 3				35,8	1,4	3,8
	GMC3	Site 1		101,2	80,96 - 121,4	102,9	1,2	1,1
		Site 2				106,2	1,6	1,5
		Site 3				98,2	3,9	3,9
PAAP-A (mUI/mL)	GMC1	Site 1	20	276	220,8 - 331,2	307	6,7	2,2
	GMC2			1 565	1 252 - 1 878	1 640	37,3	2,3
	GMC3			4 100	3 280 - 4 920	3 924	80,6	2,1
PSA (ng/mL)	TMC1	Site 3	20	5,01	4,01 - 6,01	5,01	0,1	1,8
	TMC2			20,0	16 - 24	20,4	0,4	1,7
hCG (mUI/mL)	HCG C2	Site 1	19	249	199,2 - 298,8	248	4,9	2,0
		Site 2	20			267	8,8	3,3
		Site 3				247	4,8	2,0
	HCG C3	Site 1	20	62 800	50 240 - 74 360	60 377	2 064	3,4
		Site 2				65 363	3 462	5,3
		Site 3				56 293	2 173	3,9

Evaluation multicentrique d'un nouvel automate d'immuno-analyse, le KRYPTOR compact

PSA (ref. 810.100), hCG+β (ref. 841.050)

Contrôles : PCT (ref.82592), TM1 QC (ref. 83892), GM QC (ref. 88192), hCG+β QC high (ref. 84193)

5. Les méthodes

Le protocole utilisé a suivi les recommandations NCCLS et celles du protocole VALTEC.

- Une étude de précision a été réalisée selon le protocole NCCLS EP15-P(7) sur des contrôles.
- Une étude de stabilité à bord de l'appareil du réactif FreeβhCG a été réalisée pendant 15 jours, en passant le calibrateur en tant qu'échantillon une fois par jour.
- Une étude de linéarité (NCCLS EP6-A) (8) a été réalisée pour la PCT et l'AFP sur des échantillons élevés en analyte concerné.
- Une étude de contamination inter-échantillons, sur des échantillons et des contrôles, a été effectuée pour le paramètre hCG, selon deux protocoles : NCCLS EP10-A (9) et VALTEC.
- Une étude des dilutions automatiques a été effectuée pour le paramètre PCT en comparant les

moyennes des résultats obtenus après dilution manuelle et dilution automatique des mêmes échantillons.

- Une étude de la limite de détection sur des échantillons et du diluant approprié, a été effectuée pour les paramètres PCT et AFP, selon deux protocoles : NCCLS EP 17-A (10) et VALTEC.
- Une étude de comparaison entre le KRYPTOR compact, le KRYPTOR[®], les trois automates a été réalisée selon le protocole NCCLS EP9-A2 (11).

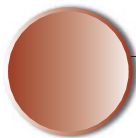
III - Résultats

1. Etude de la précision

Les résultats sont présentés sur le Tableau I. Globalement, les CV% obtenus sont très satisfaisants pour des paramètres d'immuno-analyse. Ils sont comparables à ceux obtenus sur le système KRYPTOR[®] et nettement inférieurs aux normes de répétabilité VALTEC.

Tableau II
Etude de comparaison

Paramètre, unité	Site	Instrument	n	Concentration max de x	Pente	Intercept	r
PCT, ng/mL	1, 2, 3	KRYPTOR	287	46	1,004	0,183	0,993
	Site 1		99	46	1,008	0,106	0,999
	Site 2		97	31,6	1,143	-0,286	0,995
	Site 3		91	45,7	0,919	0,303	0,998
Free-βhCG, ng/mL	Site 1	KRYPTOR	101	119	1,043	-0,023	1,000
		AutoDelfia	71	110	1,102	1,341	0,994
AFP, ng/mL	1, 2, 3	KRYPTOR	292	600	0,987	1,048	0,996
	Site 1		103	202	1,020	0,507	0,999
	Site 2		94	600	0,921	1,592	0,998
	Site 3		95	514	1,044	-0,039	0,999
	Site 1	AutoDelfia	95	205	0,982	-0,125	0,995
	Site 2	Elecsys	94	636	0,843	0,662	0,999
	Site 3	Immulite	65	256	1,106	1,434	0,998
PAPP-A, mUI/mL	Site 1	KRYPTOR	76	4 295	1,013	0,608	1,000
		AutoDelfia	41	4 010	1,046	442	0,973
PSA, ng/mL	Site 3	KRYPTOR	91	60	0,960	0,582	0,998
		Immulite	81	61	0,900	1,046	0,992
hCG, mUI/mL	1, 2, 3	KRYPTOR	239	96 907	0,963	1,787	1,000
	Site 1		93	96 907	0,966	-215	0,999
	Site 2		77	1 840	1,063	-11,2	0,998
	Site 3		69	1 954	1,022	-5,29	0,997
	Site 1	AutoDelfia	93	93 478	1,003	1382	0,994
	Site 2	Elecsys	83	2 299	0,898	12,5	0,983
	Site 3	Immulite	67	1 842	1,090	18,0	0,984



REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les sociétés B.R.A.H.M.S. et CEZANNE SAS pour le prêt des analyseurs, Monsieur Froehlich, Monsieur Hantke, Monsieur Lecomte, Madame Moshage, Monsieur Bois, Monsieur Colombier, Madame Talon, Madame Benne, Monsieur Amar et Monsieur Loison pour leur compétence et leur disponibilité au cours de cette évaluation.

2. Etude de la stabilité à bord

Cette étude a montré une excellente stabilité du réactif FreeβhCG à bord de l'automate durant une période de 15 jours.

3. Etude de linéarité

La linéarité du paramètre PCT a été vérifiée jusqu'à 41,07 ng/mL. La linéarité du paramètre AFP est limitée en mesure directe à 540 ng/mL, au-delà l'appareil rend le message « Out of range » et déclenche une dilution automatique avec le facteur de dilution approprié.

4. Etude de la contamination inter-échantillons

Aucune contamination inter-échantillons n'a été mise en évidence.

5. Etude des dilutions automatiques

Pour le paramètre PCT, les dilutions automatiques ont montré des résultats équivalents à ceux obtenus avec les dilutions manuelles.

6. Etude de la limite de détection

Pour le paramètre PCT, celle-ci a été déterminée à 0,082 ng/mL avec le protocole NCCLS et 0,114 ng/mL avec le protocole VALTEC.

Pour le paramètre AFP, elle a été déterminée à 1,050 ng/mL avec le protocole VALTEC.

7. Etude de comparaison

Les résultats sont présentés sur le Tableau II (*voir page précédente*). Hormis, d'une part, pour le paramètre AFP en comparaison avec les techniques KRYPTOR® (intercept trop élevé à 1,592 ng/mL) et Elecsys (pente faible de 0,843), et d'autre part, le

paramètre PAPP-A pour la technique AutoDelfia (intercept élevé à 442 mUI/mL), les résultats obtenus pour l'étude de comparaison sont très satisfaisants.

IV - Praticabilité

Le KRYPTOR compact est un appareil agréable à utiliser. En effet, peu encombrant avec un niveau sonore faible et une interface logicielle simplifiée, il est rapidement pris en main par le personnel de laboratoire. Le premier résultat est obtenu très rapidement par rapport aux automates d'immuno-analyse du marché. A titre d'exemple, un premier résultat d'AFP est obtenu en 11 minutes puis les suivants toutes les deux minutes. Cette rapidité est compatible avec le traitement des échantillons urgents. La reconstitution automatique des réactifs permet d'assurer une parfaite reproductibilité de kit à kit. Des redilutions sont relancées automatiquement en fonction du paramétrage programmé, ce qui apporte un gain de temps pour l'utilisateur. La maintenance est simple, rapide à réaliser et correctement guidée par le manuel utilisateur en ligne.

V - Discussion et conclusion

Les résultats de l'évaluation analytique multicentrique ont montré des résultats très satisfaisants. Il a donc été démontré que les performances analytiques du système KRYPTOR compact sont équivalentes aux performances du système KRYPTOR®.

La disponibilité 24h sur 24h, la rapidité du rendu des résultats, la présence du manuel utilisateur en ligne ainsi que la sécurisation des opérations de traitement des échantillons, en font un appareil particulièrement adapté à une utilisation dans un contexte d'analyses en urgence, mais aussi pour un laboratoire spécialisé dans le domaine de l'immuno-analyse.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ALPHA B., LEHN JM, MATHIS G., Energy transfer luminescence of Eu (III) and Tb (III) cryptates of macrobicyclic polypyridine ligands, *Angewandte Chemie*, 1987; 26, 266-267

(2) MATHIS G., LEHN JM, Macropolycyclic rare earth complexes and application as fluorescent tracers. Patent Num. Pub : EP180492, CIS bio international

(3) MATHIS G., Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 1953-1959.

(4) VASSAULT A., GRAFMEYER D., NAUDIN C., *et al*, Protocole de validation de techniques, *Ann. Biol. Clin.*, 1986, 46, 686-745

(5) VASSAULT A., GRAFMEYER D., DE GRAEVE J., COHEN R., BEAUDONNET A., BIENVENU J., Analyses de biologie médicales : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques, *Ann. Biol. Clin.*, 1999, 57, 685-695.

(6) HICKEY B., Bulk reagent random-Access Analysers: KRYPTORTM, The immunoassay handbook, second edition, Nature publishing group, Part.2, Chap.37

(7) User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline NCCLS EP15-A Vol.21 No 25 – www.nccls.org

(8) Evaluation of linearity of quantitative measurement procedures : a statistical approach ; approved guideline NCCLS EP6-A Vol.23 No 16 - www.nccls.org

(9) Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods ; approved guideline NCCLS EP10-A Vol.18 No 6 - www.nccls.org

(10) Protocols for determination of limits of quantitation, approved guideline NCCLS EP17-A Vol.24 No 34 - www.nccls.org

(11) Method comparison and bias estimation using patient samples ; approved guideline – second edition NCCLS EP9 - A Vol.22 No 19 - www.nccls.org