

Balance de précision SARTORIUS AC 211 S

Cette balance a une étendue de pesée de 210g. Sa sensibilité est de 0,1mg et sa masse de calibrage externe est de 100 + 50g. Elle est de classe E2. Elle a été étalonnée à l'aide des masses suivantes :

- Masse étalon HÄFNER (ART. Nr: 8507 EJ ; Fabr. Nr: 042674/99; Classe E2) de masse 100g ;
- Masse étalon HÄFNER (ART. Nr: 8506 EJ; Fabr. Nr: 042672/99 ; Classe E2) de masse 50g.

I.2 Pipettes automatiques *Eppendorf Research*

Nous avons utilisé six (6) pipettes automatiques *Eppendorf Research* : deux à pistons jaunes de 100 μ l, une à piston jaune de 200 μ l et trois à pistons bleus de 1000 μ L. Elles sont toutes des pipettes à volumes réglables. Ces pipettes ne peuvent pas être utilisées sans leurs pointes. La couleur des pistons pousoirs de la pipette renvoie directement aux codes couleur des pointes à utiliser. L'affichage d'un volume de consigne s'effectue en tournant la bague. La lecture du cadran se fait de haut en bas. Une balance régulièrement étalonnée doit être utilisée pour contrôler ces pipettes.

I.3 Spectrophotomètre *ELx 800 UV*

Le spectrophotomètre ELx 800 UV permet de lire des densités optiques des solutions colorées dans un domaine s'étendant de 340 et 750 nanomètres. Il s'accommode de nombreux formats de plaques : 24, 48, 96 cellules. Il est doté d'un logiciel intégré et réactualisable permettant l'analyse directe des données. Il réalise les courbes de modélisation, les transformations, les formules, contrôles et validations.

Le spectrophotomètre ELx 800 UV est livré avec une plaque d'étalonnage (Bio-Tek calibration plate PN 9000 547) pour contrôler son fonctionnement. Cette plaque permet de tester l'alignement des cellules, la précision, l'exactitude et la linéarité.

I.4 Sérum de contrôle

Deux sérum de contrôle à deux niveaux de concentrations (une zone physiologique et une zone pathologique) sont analysés. Ces sérum contiennent plusieurs paramètres à des concentrations adéquates. La valeur cible de chaque paramètre est donnée par le fabricant avec un intervalle de valeurs acceptables (voir annexe C).

- **Provenance**

Ces sérum lyophilisés nous sont parvenus par l'intermédiaire d'une agence commerciale de produits chimiques et biochimiques basée à Dakar (Sénégal).

- **Stabilité et conservation**

Ces sérum, dès l'arrivée au laboratoire, ont été conservés à 2-8°C comme indiqué par le fabricant.

- **Description du produit**

Le sérum de contrôle est un sérum bovin lyophilisé qui ne contient pas de conservateurs qui peuvent interférer dans les déterminations. Il est conçu uniquement pour le contrôle de qualité dans les laboratoires de biochimie clinique. Il doit être reconstitué avec cinq millilitres d'eau distillée avant tout dosage. Ce produit est stable sept jours à 2-8°C après reconstitution.

Les réactifs et les étalons utilisés pour doser les sérum de contrôle sont prêts à l'emploi dans le commerce. Leurs constitutions sont données en annexe E.

II. Méthodes

II.1 Balance de précision SARTORIUS AC 211 S

Contrôle de la précision

On a choisi la valeur nominale d'une masse étalon de 100g qui est égale environ à la moitié de la portée de la balance comme indiquée par l'Organisation Internationale de Métrologie Légale (O.I.M.L). La précision est bonne si l'écart-type (ET) est inférieur au tiers de la valeur absolue de l'erreur maximale tolérée (EMT) pour la masse choisie [13].

Mode opératoire

- a) Faire la tare ;
- b) Poser la masse au centre du plateau pour éviter les erreurs d'excentration ;
- c) Attendre la stabilisation de la balance ;
- d) Relever le résultat ;

- e) Retirer la masse.

Les opérations de a) à e) sont répétées 60 fois de suite et les résultats sont consignés dans le tableau I.

Contrôle de l'exactitude

Les valeurs nominales des masses étalon sont choisies de manière à couvrir l'étendue de mesure de la balance comme indiquée par l'Organisation Internationale de Métrologie Légale (O.I.M.L). L'exactitude est bonne si l'écart entre la valeur lue et la valeur conventionnelle, pour chaque point de mesure, est inférieur à la valeur absolue de l'erreur maximale tolérée pour la masse choisie [13].

Deux masses étalon nous sont disponibles : 100g et 50g.

Mode opératoire

- a) Faire la tare ;
- b) Poser la masse au centre du plateau pour éviter les erreurs d'excentration ;
- c) Attendre la stabilisation de la balance ;
- d) Relever le résultat ;
- e) Retirer la masse.

Les opérations de a) à e) sont répétées 10 fois de suite pour les deux masses étalon et les résultats sont présentés dans les tableaux II et III.

II.2 Pipettes automatiques *Eppendorf Research*

Le contrôle de qualité des pipettes se fait au moyen du test gravimétrique qui consiste à faire plusieurs pipetages et pesées d'eau distillée. La pipette, la pointe et l'eau distillée doivent être impérativement à la même température (20 - 25°C, ± 0,5°C, constante) (voir annexe B).

Les volumes retenus sont de 50µl pour les pipettes de 100µl, 100µl pour celles de 200µl et 500µl pour les 1000µl.

Les données obtenues permettent d'évaluer la précision et l'exactitude des pipettes automatiques *Eppendorf Research*. Les spécifications techniques qui permettent d'apprécier l'exactitude et la précision sont données en annexe B.

Mode opératoire

- a) Faire la tare ;
- b) Prélever (50 ; 100 ou 500µl selon le modèle de pipette utilisé) d'eau distillée contenue dans un bêcher ;
- c) Peser cette eau distillée avec la balance de précision régulièrement étalonnée;

- d) Relever le résultat ;
- e) Refaire la tare.

Les opérations a) à e) sont répétées 60 fois de suite. Pour chaque pipette, nous avons calculé la moyenne arithmétique (m) des valeurs obtenues, la précision et le degré d'exactitude relatif (α) à partir des expressions ci-dessous et les résultats sont consignés dans le tableau IV.

$$\text{Précision} = CV = \frac{\text{Ecart-type } (\sigma)}{\text{Moyenne } (m)} \quad \alpha = \frac{|m - X_0|}{X_0}$$

X_0 est la valeur cible retenue pour chaque pipette convertie en gramme.

II.3 Spectrophotomètre *ELx 800 UV*

Le spectrophotomètre *ELx 800 UV* s'accompagne d'une plaque d'étalonnage (Bio-Tek calibration plate PN 9000 547) qui permet de contrôler son fonctionnement en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Cette plaque comporte des cellules de densités optiques standards données. Le contrôle consiste à effectuer la lecture de ces différentes densités optiques et à les comparer avec celles standards. Il permet de vérifier l'alignement des cellules, la linéarité, la précision, l'exactitude des résultats qu'on obtient avec ce spectrophotomètre. Cependant notre étude portera uniquement sur l'exactitude et la précision. Les résultats obtenus permettront de se prononcer sur l'exactitude et la précision des analyses effectuées par spectrophotomètre.

II.4 Sérum de contrôle

Nous avons dosé quatre paramètres qui se trouvent dans les sérum en utilisant les méthodes données par le fabricant et qui sont effectuées dans le laboratoire de l'E.I.S.M.V de Dakar.

➤ **Dosage du calcium : (Méthode au Bleu de Méthylthymol)**

Elle est basée sur l'action d'un indicateur coloré le **Bleu de méthylthymol** qui réagit avec le calcium présent dans le sérum en milieu alcalin pour donner un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie.

Mode opératoire

- Pipeter dans des tubes à essai :

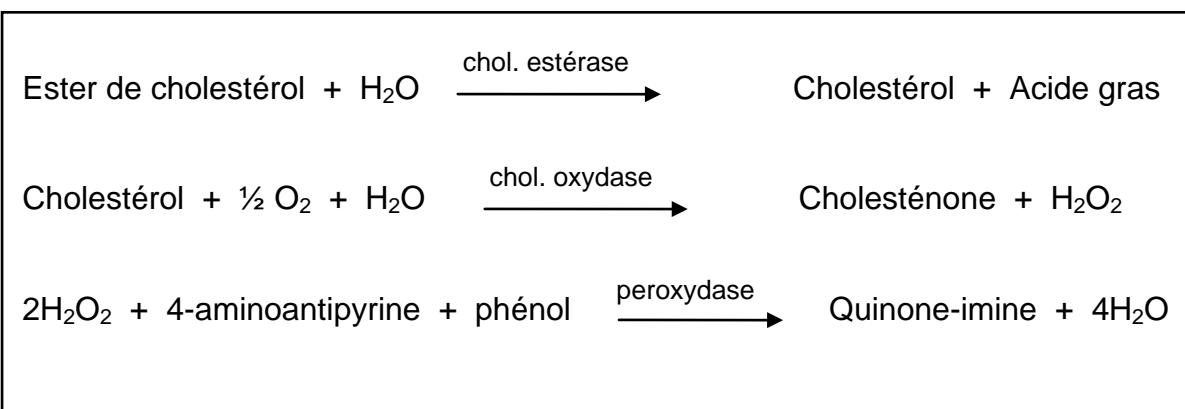
	Blanc	Etalon de calcium	Sérum de contrôle
Etalon de calcium	—	10µl	—
Sérum de contrôle	—	—	10µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

- Bien agiter et placer les tubes pendant 2 minutes à température ambiante.
- Lire les densités optiques du blanc (DO_{bl}), de l'étalon ($DO_{ét}$), et du sérum de contrôle ($DO_{sér}$) à 630 nanomètres au spectrophotomètre. La couleur est stable au moins une heure. La concentration du calcium est calculée de la manière suivante :

$$C_{sér} = \frac{DO_{sér} - DO_{bl}}{DO_{ét} - DO_{bl}} \times 2,5 = \text{mmol/l de calcium}$$

➤ Dosage du cholestérol : (Méthode à la cholestérol oxydase)

Le cholestérol estérifié présent dans le sérum est hydrolysé en présence de la cholestérol estérase qui catalyse la réaction. Il se forme du cholestérol libre et un acide gras. Le cholestérol libre formé est ensuite oxydé par l'oxygène atmosphérique en milieu aqueux sous l'action d'une enzyme spécifique du cholestérol, la cholestérol oxydase, pour donner une solution de cholesténone et d'eau oxygénée. L'eau oxygénée formée sous l'action de la peroxydase libère de l'oxygène moléculaire qui va oxyder le chromogène réduit incolore présent dans la solution en chromogène oxydé coloré. Cette coloration étant proportionnelle à la concentration du cholestérol, on mesure la DO de la solution à l'aide d'un spectrophotomètre pour déterminer cette concentration.



Mode opératoire

1. Placer le réactif de travail à la température ambiante (16-25°C) pendant 10 minutes
2. Pipeter dans des tubes à essai :

	Blanc	Etalon de cholestérol	Sérum de contrôle
Etalon de cholestérol	—	10µl	—
Sérum de contrôle	—	—	10µl
Réactif de cholestérol	1ml	1ml	1ml

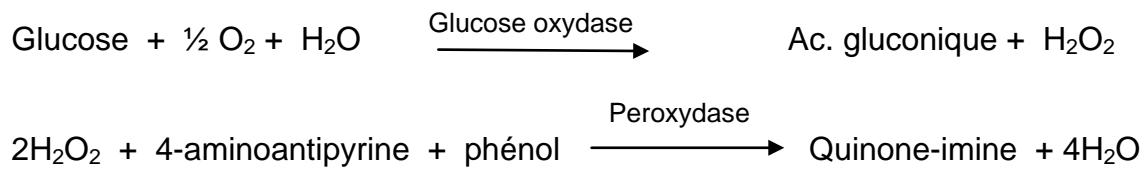
3. Bien agiter et placer les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.
4. Lire les densités optiques du blanc (DO_{bl}), de l'étalon ($DO_{ét}$), et du sérum de contrôle ($DO_{sér}$) à 490 nanomètres au spectrophotomètre.

La couleur est stable au moins 2 heures. La concentration du cholestérol est calculée de la manière suivante :

$$C_{sér} = \frac{DO_{sér} - DO_{bl}}{DO_{ét} - DO_{bl}} \times 5,18 = \text{mmol/l de cholestérol}$$

➤ Dosage du glucose : (Méthode à la glucose oxydase)

Elle repose sur l'action d'une enzyme spécifique du glucose, la glucose oxydase, qui catalyse l'oxydation en milieu aqueux du glucose présent dans le sérum par l'oxygène atmosphérique. Il se forme de l'acide gluconique et de l'eau oxygénée. L'eau oxygénée formée sous l'action de la peroxydase libère un oxygène moléculaire qui va oxyder le chromogène réduit incolore présent dans la solution en chromogène oxydé coloré. Cette coloration étant proportionnelle à la concentration du glucose, on mesure la DO à l'aide d'un spectrophotomètre pour déterminer cette concentration.



Mode opératoire

1. Placer le réactif de travail à la température ambiante (16-25°C) pendant 10 minutes
2. Pipeter dans des tubes à essai :

	Blanc	Etalon de glucose	Sérum de contrôle
Etalon de glucose	—	10µl	—
Sérum de contrôle	—	—	10µl
Réactif du glucose	1ml	1ml	1ml

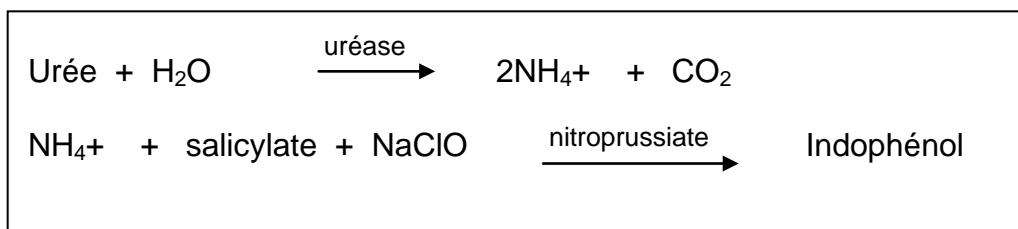
3. Bien agiter et placer les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.
4. Lire les densités optiques du blanc (DO_{bl}), de l'étalon ($DO_{ét}$), et du sérum de contrôle ($DO_{sér}$) à 490 nanomètres au spectrophotomètre.

La couleur est stable au moins 2 heures. La concentration du glucose est calculée de la manière suivante :

$$C_{sér} = \frac{DO_{sér} - DO_{bl}}{DO_{ét} - DO_{bl}} \times 5,55 = \text{mmol/l de glucose}$$

➤ Dosage de l'urée : (Méthode à l'uréase)

On procède à une décarboxylation en milieu aqueux de l'urée présente dans le sérum à l'aide d'une enzyme spécifique de l'urée appelée uréase. L'action de l'hypochlorite de sodium sur l'ion ammonium formé en présence de salicylate et de nitroprussiate conduit à un indophénol coloré de couleur caractéristique quantifiable par spectrophotométrie.



Mode opératoire

1. Placer le réactif de travail à la température ambiante (16-25°C) pendant 10 minutes
2. Pipeter dans des tubes à essai :

	Blanc	Etalon d'urée	Sérum de contrôle
Etalon d'urée	—	10µl	—
Sérum de contrôle	—	—	10µl
Réactif A*	1ml	1ml	1ml

* voir annexe E

3. Bien agiter et placer les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.

4. pipeter :

Réactif B*	1ml	1ml	1ml
------------	-----	-----	-----

* voir annexe E

5. Bien agiter et incuber les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.

6. Lire les densités optiques du blanc (DO_{bl}), de l'étalon ($DO_{ét}$), et du sérum de contrôle ($DO_{sér}$) à 630 nanomètres au spectrophotomètre.

La couleur est stable au moins 2 heures. La concentration de l'urée est calculée de la manière suivante :

$$C_{sér} = \frac{DO_{sér} - DO_{bl}}{DO_{ét} - DO_{bl}} \times 8,3 = \text{mmol/l d'urée}$$

Chapitre 2 : Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Balance de précision SARTORIUS AC 211 S

Contrôle de la précision

60 pesées sont effectuées avec la masse étalon de 100g et les résultats sont consignés dans le tableau I.

Tableau I : Contrôle de la précision de la balance avec la masse étalon de 100g

Paramètres	Valeurs
Nombre d'essais	60
Moyenne (g)	99,9898
Standard (g)	100
Ecart-type (g)	$8 \cdot 10^{-5}$

Selon les normes internationales, la précision est bonne si l'ET est inférieur au tiers de l'EMT qui est de $5 \cdot 10^{-5}$ g pour la masse de 100g.

Contrôle de l'exactitude

10 pesées sont effectuées pour chacune des masses étalon (100 et 50g) et les résultats sont donnés dans les tableaux II et III.

Tableau II : Contrôle de l'exactitude de la balance avec la masse étalon de 50g

Paramètres	Valeurs									
Nombre d'essais	10									
Valeur standard VS (g)	50									
Valeur observée VO (g)	49,995	49,995	49,9948	49,9949	49,9949	49,995	49,9949	49,995	49,9949	49,995
$d^* = VO - VS $	0,005	0,005	0,0052	0,0051	0,0051	0,005	0,0051	0,005	0,0051	0,005

* degré d'exactitude absolu en gramme

D'après les normes internationales, l'exactitude est bonne si le degré d'exactitude absolu pour chaque mesure est inférieur à l'EMT qui est de 10^{-4} g pour la masse de 50g.

Tableau III : Contrôle de l'exactitude de la balance avec la masse étalon de 100g

Paramètres	Valeurs									
Nombre d'essais	10									
Valeur standard VS (g)	100									
Valeur observée VO (g)	99,9898	99,9899	99,9898	99,9899	99,9899	99,9898	99,9899	99,9898	99,9899	99,9898
d = VO - VS	0,0102	0,0101	0,0102	0,0101	0,0101	0,0102	0,0101	0,0102	0,0101	0,0102

D'après les normes internationales, l'exactitude est bonne si le degré d'exactitude absolu pour chaque mesure est inférieur à l'EMT qui est de $1,5 \cdot 10^{-4}$ g pour la masse de 100g.

I.2 Pipettes automatiques *Eppendorf Research*

120 pipetages et pesées d'eau distillée sont effectuées avec chaque pipette et les résultats sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Contrôle de l'exactitude et de la précision des pipettes automatiques *Eppendorf Research*

Paramètres	Pipettes					
	P1/ 100 µl	P2/ 100 µl	P3/ 200 µl	P4/ 1000 µl	P5/ 1000 µl	P6/ 1000 µl
Nombre d'essais	120	120	120	120	120	120
Moyenne m (g)	0,050	0,050	0,099	0,504	0,505	0,499
Valeur standard X ₀ (g)	0,050	0,050	0,100	0,500	0,500	0,500
Ecart-type	0,0001	0,0001	0,0002	0,002	0,001	0,002
Précision (%)	0,20	0,20	0,20	0,40	0,20	0,40
α* (%)	0,00	0,00	1,00	0,80	1,00	0,20

* degré d'exactitude relatif

$$\text{Précision} = \text{CV} = \frac{\text{Ecart-type} (\sigma)}{\text{Moyenne} (m)} \times 100 \quad \alpha = \frac{|m - X_0|}{X_0} \times 100$$

I.3 Spectrophotomètre *Etx 800 UV*

Nous avons effectué 100 lectures des cellules de la plaque d'étalonnage avec le spectrophotomètre et nous avons calculé la moyenne arithmétique des densités optiques obtenues. Nous avons également évalué l'écart-type et le degré d'exactitude absolu des différents résultats de chaque cellule de la plaque. Les résultats sont mentionnés dans le tableau V.

Tableau V : Contrôle de l'exactitude et de la précision du filtre de longueur d'onde 405 nanomètres du spectrophotomètre

Paramètres	Cellules					
	C01	D04	E02	F05	G03	H06
Nombre d'essais	100	100	100	100	100	100
Moyenne m (DO)	0,152	2,793	0,621	2,240	1,199	1,729
Valeur standard X_0 (DO)	0,142	3,026	0,614	2,331	1,192	1,729
Ecart-type	0,001	0,01	0,001	0,003	0,001	0,001
$d^* = m - X_0 $	0,010	0,233	0,007	0,091	0,007	0,000

* degré d'exactitude absolu

I.4 Sérum de contrôle

Contrôle de l'exactitude et de la précision des méthodes de dosage des sérum de contrôle

Les figures suivantes représentent les cartes de contrôle de l'exactitude et de la précision des méthodes utilisées pour doser les sérum de contrôle. En ordonnée, nous avons la concentration en millimoles par litre et en abscisse le numéro de jour de dosage. L'exactitude est bonne si sept valeurs consécutives ne sont pas du même côté de la valeur cible à l'intérieur de la zone de contrôle [17, 19]. La précision, elle, est bonne si tous les résultats sont régulièrement répartis de part et d'autre de la valeur cible à l'intérieur de la zone de contrôle.

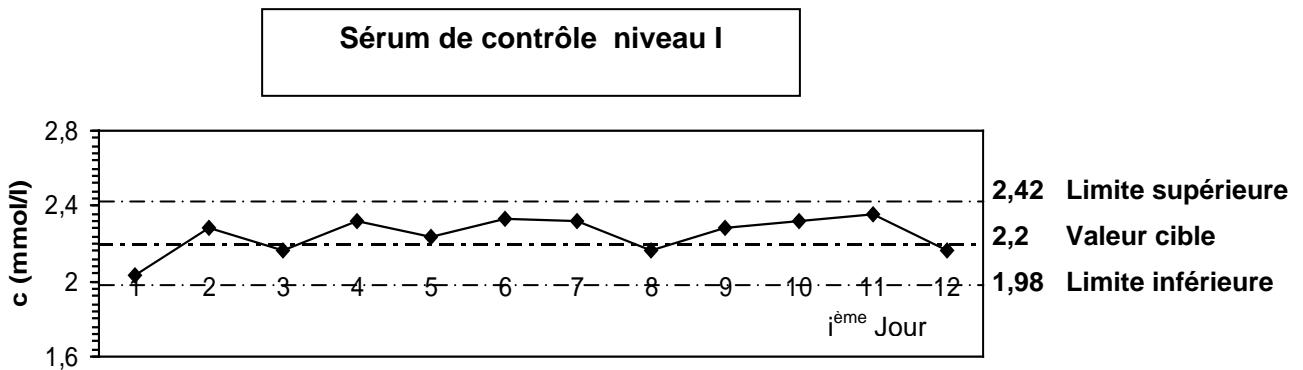


Figure 9 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage du Calcium

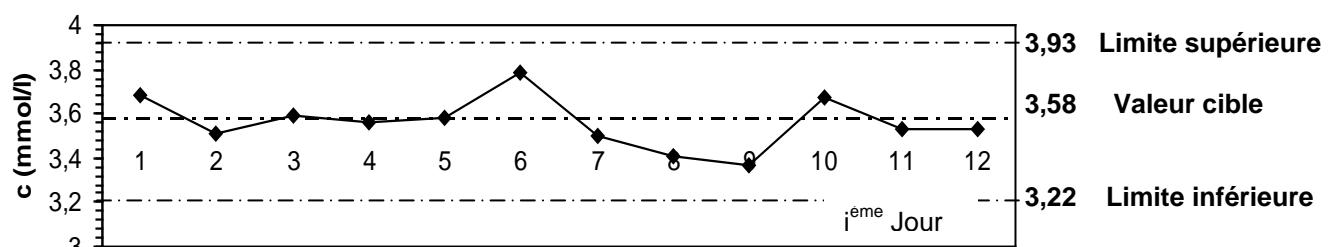


Figure 10 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage du Cholestérol

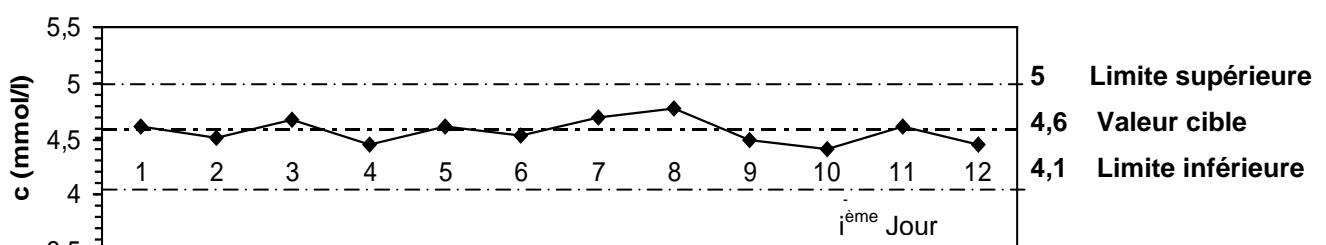


Figure 11 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage du Glucose

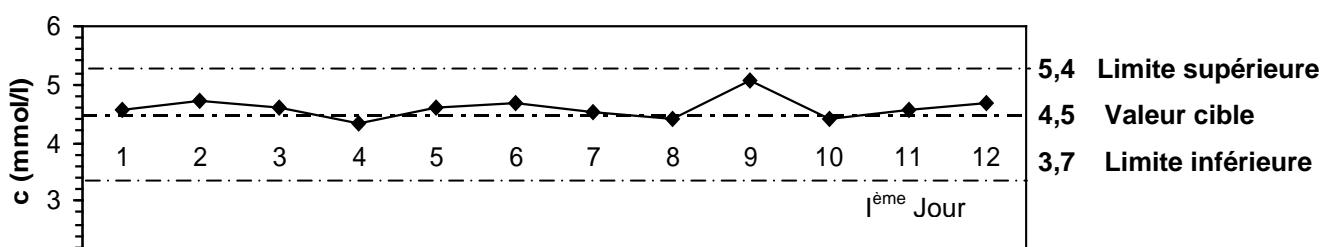


Figure 12 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage de l'Urée

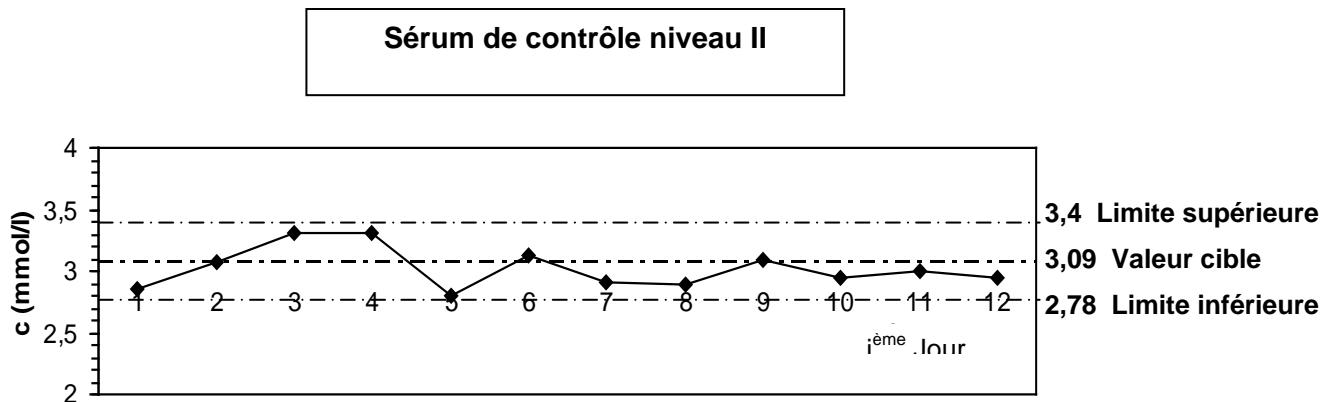


Figure 13 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage du Calcium

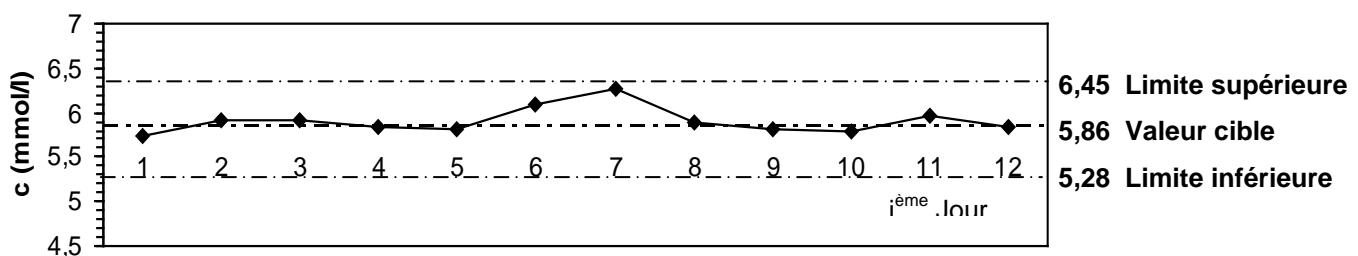


Figure 14 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage du Cholestérol

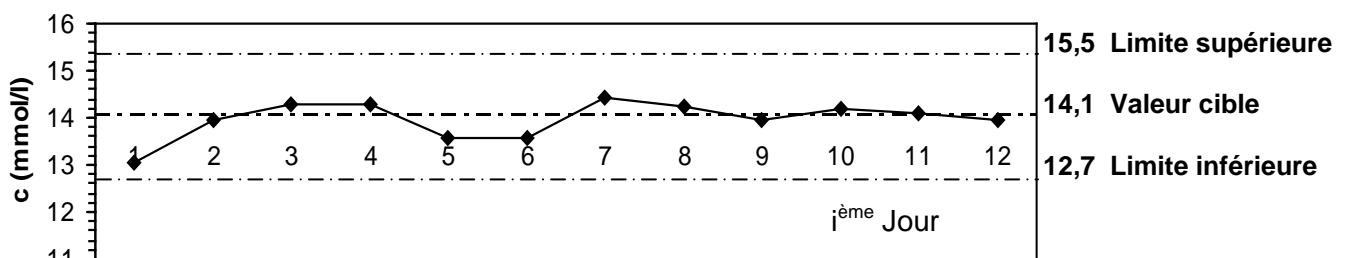


Figure 15 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage du Glucose

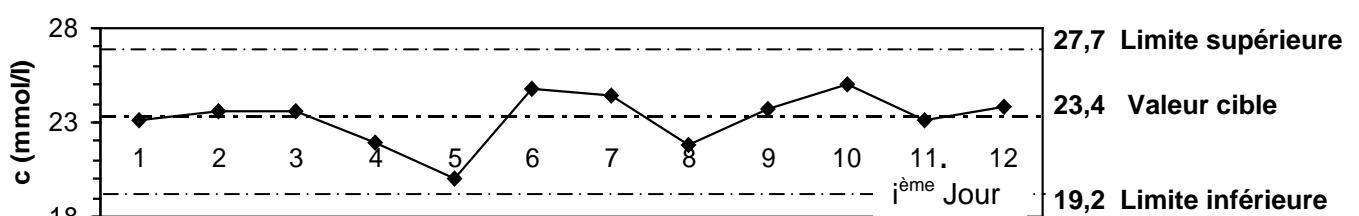


Figure 16 : Valeurs observées (♦), valeur cible, limites du contrôle de l'exactitude et de la précision du dosage de l'Urée

Contrôle de la précision des méthodes de dosage des sérums de contrôle

Pour chacun des deux paramètres à savoir la répétabilité et la reproductibilité, on a effectué douze mesures. Pour la répétabilité, les mesures sont faites en même temps alors que pour la reproductibilité les dosages sont effectués de jour en jour pendant douze jours par la même personne. La répétabilité, la reproductibilité et le rapport γ sont calculés à partir des formules données par la FAO [14] et qui sont les suivantes:

Répétabilité $r = 2,83 \times \sigma$; Reproductibilité $R = 2,83 \times \sigma$; (σ étant l'écart-type obtenu pour chacun de ces deux paramètres) $\gamma = \text{répétabilité} / \text{reproductibilité}$

Les résultats sont présentés dans les tableaux VI et VII pour les deux sérums.

Tableau VI : Répétabilités, reproductibilités, écarts-types et rapports γ pour le contrôle niveau I

Paramètres		Ecart-type (σ)	$\beta^* = 2,83 \times \sigma$	$\gamma = \text{répétabilité} / \text{reproductibilité}$
Calcium	Répétabilité	0,098	0,277	0,662
	Reproductibilité	0,148	0,418	
Cholestérol	Répétabilité	0,116	0,328	0,539
	Reproductibilité	0,215	0,608	
Glucose	Répétabilité	0,111	0,314	0,566
	Reproductibilité	0,196	0,554	
Urée	Répétabilité	0,197	0,557	0,540
	Reproductibilité	0,364	1,030	

Expression mathématique de la répétabilité et de la reproductibilité pour chaque paramètre

Tableau VII : Répétabilités, reproductibilités, écarts-types et rapports γ pour le contrôle niveau II

Paramètres		Ecart-type (σ)	$\beta^* = 2,83 \times \sigma$	$\gamma = \text{répétabilité} / \text{reproductibilité}$
Calcium	Répétabilité	0,167	0,472	0,830
	Reproductibilité	0,201	0,568	
Cholestérol	Répétabilité	0,144	0,407	0,695
	Reproductibilité	0,207	0,585	
Glucose	Répétabilité	0,387	1,095	0,696
	Reproductibilité	0,556	1,573	
Urée	Répétabilité	1,412	3,995	0,680
	Reproductibilité	2,075	5,872	

* Expression mathématique de la répétabilité et de la reproductibilité pour chaque paramètre