



**HAL**  
open science

# Mesure isotopique des volumes sanguins : validation de l'asepsie des préparations requises et habilitation des opérateurs impliqués

Marine Stainmesse

## ► To cite this version:

Marine Stainmesse. Mesure isotopique des volumes sanguins : validation de l'asepsie des préparations requises et habilitation des opérateurs impliqués. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02988214

**HAL Id: dumas-02988214**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02988214>**

Submitted on 4 Nov 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année 2020

Thèse n°102

THÈSE POUR L'OBTENTION DU  
**DIPLÔME D'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 Octobre 2020

Par Marine STAINMESSE

Née le 8 Novembre 1993 à Châtenay-Malabry

**MESURE ISOTOPIQUE DES VOLUMES SANGUINS :  
VALIDATION DE L'ASEPSIE DES PRÉPARATIONS REQUISES  
ET HABILITATION DES OPÉRATEURS IMPLIQUÉS**

Sous la direction du Docteur Valérie POTTIER

Membres du jury :

Mme le Professeur Sylvie CRAUSTE-MANCIET	Présidente
M. le Docteur Arnaud VENET	Juge
Mme le Docteur Isabelle QUELVEN-BERTIN	Juge
Mme le Professeur Laurence BORDENAVE	Juge



## REMERCIEMENTS

### À MA DIRECTRICE DE THÈSE

À *Madame le Docteur Valérie Pottier*, pour m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet, pour ton implication, ton enthousiasme contagieux et ta persévérance qui ont permis l'aboutissement de ce beau projet, pour ta sympathie et ta spontanéité, pour nos conversations enrichissantes tant sur le plan professionnel que personnel, reçois toute ma reconnaissance.

### AUX MEMBRES DU JURY

À *Madame le Professeur Sylvie Crauste-Manciet*, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et pour m'avoir autorisée à intégrer votre Master 2, me permettant ainsi d'approfondir mes connaissances en pharmacotechnie, veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude et mon profond respect.

À *Monsieur le Docteur Arnaud Venet*, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse, pour ton professionnalisme, tes précieux conseils, ainsi que tes encouragements, je te remercie sincèrement.

À *Madame le Docteur Isabelle Quelven-Bertin*, pour t'être rendue disponible afin de juger ce travail et m'avoir fait découvrir le rôle du radiopharmacien au sein du service de médecine nucléaire du CHU de Limoges, je te remercie.

À *Madame le Professeur Laurence Bordenave*, pour votre bienveillance et pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury, je vous remercie grandement.

### AUX PERSONNES QUI ONT CONTRIBUÉ À CE PROJET

À *Monsieur le Docteur Frédéric Debordeaux*, pour avoir accepté de co-diriger mon projet de Master 2 et suivi de près l'avancement de la thèse, pour tes conseils pertinents, pour ta disponibilité, pour toutes les connaissances que tu m'as transmises, et pour ton soutien concernant la suite de mon parcours professionnel, je te remercie.

*Aux manipulatrices du pool d'hématologie isotopique, Élise, Nicole, Stéphanie et Mounia*, merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée pour mener à bien ce travail et pour votre patience. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

À *Madame le Professeur Véronique Dubois*, pour avoir permis à ce projet d'évoluer grâce à votre expertise et vos remarques éclairées, je vous remercie vivement.

À *l'équipe du service de bactériologie*, notamment Valentin, je vous remercie pour votre accueil et pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Et merci à Thierry Moga de l'ABC qui, grâce à son expérience, a pu sauver toute une série de flacons.

À l'équipe du service d'hygiène hospitalière et plus particulièrement à Madame Sylvie Cresto, qui a su faire face au grand nombre d'échantillons envoyés avec souplesse et rigueur.

À Monsieur le Docteur Guillaume Bouguéon, merci pour tes conseils avisés et tes encouragements (et de m'avoir prêté la lampe UV !).

#### À L'ÉQUIPE DU SERVICE DE MÉDECINE NUCLÉAIRE DE HAUT-LÉVÊQUE

Aux radiopharmaciens de Haut-Lévêque, Julie pour ta gentillesse, ta bonne humeur permanente et ton soutien, Charles, pour ta patience et ta pédagogie. J'ai beaucoup appris à vos côtés, je vous en remercie.

Aux manipulateurs, aux radiophysiciens, à Catherine, aux ASH, aux médecins, pour votre accueil chaleureux. Je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler avec vous.

#### À TOUTES LES ÉQUIPES DES SERVICES DANS LESQUELS J'AI EFFECTUÉ MES STAGES D'INTERNAT

À l'équipe du service de stérilisation de Pellegrin, particulièrement à Monsieur Marque pour votre bienveillance concernant mon projet de réaliser le DESC. Et à Alice, grâce à qui j'ai passé un semestre haut en couleurs et appris de nombreuses expressions du Nord, merci pour la pause pâté de 10h.

À l'équipe de la PUI de Haut-Lévêque, du service de médecine nucléaire du CHU de Limoges, du CRPV de Bordeaux, de la PDMS et de l'URC de Saint-André.

#### AUX AUTRES PERSONNES QUE J'AI EU LA CHANCE DE RENCONTRER LORS DE MON PARCOURS PROFESSIONNEL

À Anne-Claire Cuquel sans qui mon externat à l'HIA Percy n'aurait vraiment pas été le même.

À Yvan Mouraëff, qui m'a aidé à choisir ma voie en me faisant découvrir la pharmacie hospitalière et notamment la radiopharmacie à Cochin et Hôtel Dieu.

À Audrey Caridi de la pharmacie Bellevue qui a attentivement suivi mon parcours.

#### À MA FAMILLE

À mes parents, pour votre amour inconditionnel et votre soutien indéfectible tout au long de mon parcours scolaire et professionnel, pour tout le chemin accompli grâce à votre aide, votre écoute et vos encouragements. Mais aussi pour tout le reste : les TDF, les chasses aux lézards, les voyages, les levers de soleil sur les chevaux assoupis à Villeperdrix, les Fousitous et autres Mélocos... Bref, je vous dois beaucoup, je vous aime !

À mon frère et Beth, Arthur pour notre complicité. Je suis fière de la personne que tu es devenue. Reste toujours aussi curieux et aussi drôle quand tu gagnes au Jungle Speed. Et Beth, pour ta gentillesse et ton talent de traductrice.

À mes grands-parents, Mamie qui me manque mais qui m'a tant apporté et devant qui j'aurais été si fière de prêter serment, Papi grâce à qui j'ai eu une enfance merveilleuse.

À *ma grande tante*, tata Huguette pour ta générosité et tous les bons moments partagés (Pingu, la dinette et le manège à Villers entre autres !).

À *mon oncle*, Christophe, qui depuis le début, a soutenu mon projet d'orientation vers la radiopharmacie.

À *mes oncles, tantes et cousins*.

À *ma belle-famille*, Marie, Joël, Christophe et Diane, Jeanne, pour votre accueil à bras ouverts au sein de votre famille, pour votre générosité, pour les vacances à Cassis, les Noël magiques, les barbecues de chef et votre patience incroyable face à mon régime alimentaire !

## À MES AMIS

*Aux amis de l'ASPIC*, Marie et Édouard, Jo', Gaga, Marine, Sam ma bibi, Nico, Caro, Thomas (et Max !), pour ces soirées, ces weekends, ces semaines inoubliables : les séminaires très formateurs de Jacquville, EuropaPark et notre arrivée palpitante sur Strasbourg, le tonus de Rouen, l'Armada, la rando pour admirer le magnifique lac de la Plagne, le brunch champagne-jacuzzi et bientôt l'expédition à PortAventura, le mariage de ... et la naissance du bébé de ... !  
Merci d'avoir contribué à ce que les années fac fassent partie des plus belles de ma vie.  
l'm blue dabedi dabeda !

*Aux salsicornes*, Livia et Margaux, le gang des mémés tisanes/plaids, pour nos discussions sans filtre (la patacu ?), la soirée au Loufoque qui a révélé notre talent de manageuses de restaurant, pour la danse du pigeon et le dictionnaire Dorval. Un jour, on arrivera à programmer la fameuse semaine sans mec et sans enfant !

*Aux amis de la fac*, Marion, et Lauriane, Claire et Julie qui ont rendu les révisions du concours de l'internat beaucoup plus légères. Vivement les prochains weekends à Bordeaux !

*Aux morues*, Charlotte, Lucile, Maïté et Hélène, pour tous ces bons moments partagés tout au long de ces quatre ans d'internat. La soirée mousse, la fête du SLIP, les soirées lentilles ou cassoulet à Limoges, les férias de Mont de Marsan, les multiples AG (avec radio Charlotte pour les trajets du début). Ces soirées ne se sont jamais terminées très tard pour moi mais ce fut intense !  
Pour ma soirée de thèse, j'essaierai de passer minuit !

*Aux internes de Bordeaux et d'ailleurs*, Marie-Sophie ma binôme de poney et cuisinière hors pair trois étoiles, Micka pour ta gentillesse et ta bonne humeur sans faille, Clémence pour ta jovialité et tes étonnantes histoires d'adoucesseur, Céline pour ce brunch spontané en post-garde, et à tous les autres.

*Aux Laqueutois*, Thibault, Aurélien, Maxime, Tanguy, Jérôme et Jonathan, merci de m'avoir intégrée si rapidement à votre groupe et de permettre à Jerem d'exprimer ce grain de folie comme il ne peut le faire qu'avec vous. Merci aussi pour vos blagues tout en finesse et en légèreté !

*Aux amies du lycée et d'encore avant*, Morgane, Céline, Julia, Clara.

À JÉRÉMY,

Quelle bonne idée d'avoir franchi la porte du local de l'ASPIC et de t'avoir laissé me dessiner des moustaches de chat !

Merci pour ton soutien, ton réconfort et ta patience tout au long de ce travail.

Merci d'égayer mon quotidien et de me suivre un peu plus chaque jour dans ma bizarrerie.

Merci pour les nombreuses aventures partagées (et ça commence à s'accumuler en 6 ans et 9 mois de relation !) : des plus romantiques (la baignade dans ce lac des Vosges au soleil couchant, le carnet d'amour, notre anniversaire surprise en plein milieu du DESC avec le jeu de l'oie customisé, les fleurs post-mauvais rêve), aux plus sportives (les randonnées à la Réunion, sur la Rhune et dans les Pyrénées avec l'aide du pousse-fesses, à cheval dans la Drôme), en passant par les plus drôles et étonnantes (les masques tigre et loutre, notre duo de petits pois/carottes, nos parties de Uno dignes d'un match de catch, les sessions déguisements pour le TBC, ou encore l'attaque du chat volant).

Je suis heureuse de partager ta vie ! À notre futur !

(Et à Pathogène !)

# SOMMAIRE

Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des acronymes et abréviations.....	13
Introduction.....	15
Première partie : marquages cellulaires radioisotopiques et asepsie des préparations.....	17
I. Préparations réalisées en médecine nucléaire.....	19
II. Mesure isotopique des volumes sanguins.....	26
III. Contrôle de l'asepsie des préparations injectables.....	34
Deuxième partie : développement et application de tests de remplissage aseptique.....	39
I. Enquête nationale.....	41
II. Développement de tests de remplissage aseptique.....	41
III. Validation de l'asepsie des procédés de préparation requis pour la mesure des volumes sanguins.....	51
IV. Habilitation des opérateurs.....	52
V. Discussion.....	53
Troisième partie : développement et application d'un essai de stérilité.....	57
I. Enquête nationale.....	59
II. Développement d'un essai de stérilité pour la préparation d' <sup>99m</sup> Tc-hématies.....	59
III. Validation de l'asepsie des procédés de préparation requis pour la mesure des volumes sanguins.....	72
IV. Habilitation des opérateurs.....	73
V. Discussion.....	74



Quatrième partie : développement et application d'une évaluation des connaissances et des pratiques .....	77
I. Évaluation des connaissances .....	79
II. Évaluation des pratiques .....	81
III. Discussion .....	90
Conclusion .....	93
Références bibliographiques.....	95
Annexes .....	99
Annexe 1 : mode opératoire du fractionnement du <sup>125</sup> I-Seralb® .....	99
Annexe 2 : mode opératoire de la mesure des volumes globulaires et plasmatiques.....	102
Annexe 3 : formulaire de réalisation du TRA n°1.....	110
Annexe 4 : photos de l'installation et de la réalisation d'un TRA n°2 .....	113
Annexe 5 : formulaire de réalisation du TRA n°2.....	114
Annexe 6 : grille d'évaluation pour l'audit des pratiques.....	121
Annexe 7 : arbre décisionnel pour l'habilitation des opérateurs au poste de la mesure isotopique des volumes sanguins .....	132
Annexe 8 : certificat d'habilitation des opérateurs pour la mesure isotopique des volumes sanguins .....	133
Tables des matières.....	135

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : schéma du marquage d'une trousse par un radionucléide (1).....	21
Figure 2 : schéma des principales étapes d'un marquage cellulaire (1).....	22
Figure 3 : illustration des différents types de polyglobulie.....	27
Figure 4 : schéma du principe de dilution isotopique.....	28
Figure 5 : comparaison du procédé de fractionnement du <sup>125</sup> I-Seralb® avec le TRA.....	44
Figure 6 : comparaison du procédé de mise en seringue du <sup>125</sup> I-Seralb® et de préparation des hématies radiomarquées au <sup>99m</sup> Tc avec le TRA.....	46
Figure 7 : photo d'une contamination « radioactive » mise en évidence par la fluorescéine lors d'un TRA n°1 « témoin ».....	52
Figure 8 : photos du système BACT/ALERT® et principe de détection.....	62
Figure 9 : schéma de la gestion de la radioactivité des échantillons des essais de stérilité avant envoi en bactériologie.....	63
Figure 10 : schéma de la gestion des échantillons du test de fertilité avant envoi en bactériologie .....	64
Figure 11 : schéma de la gestion de la radioactivité des échantillons du test d'applicabilité avant envoi en bactériologie.....	65
Figure 12 : photos des germes observés au microscope lors du test de fertilité.....	67
Figure 13 : photos des germes observés au microscope lors du test d'applicabilité.....	68
Figure 14 : graphique montrant l'évolution de la croissance microbiologique d'une hémoculture faussement négative.....	68
Figure 15 : schéma de la gestion modifiée de la radioactivité des échantillons des essais de stérilité avant envoi en bactériologie.....	71
Figure 16 : schéma de la gestion de la positivité d'une gélose lors d'un essai de stérilité.....	72
Figure 17 : évolution des connaissances sur l'hygiène en radiopharmacie.....	80
Figure 18 : évolution des connaissances sur l'étude des volumes sanguins.....	80
Figure 19 : évolution des connaissances sur la maladie de Vaquez.....	81
Figure 20 : évolution des connaissances sur les bonnes pratiques de pipetage.....	81
Figure 21 : taux de conformité moyen par activité.....	85
Figure 22 : taux de conformité moyen par thème.....	86



## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : caractéristiques particulières des ZAC (4) .....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 2 : recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC.....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 3 : valeurs biologiques de référence dans le sang (CHU de Bordeaux) .....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 4 : composition du bouillon trypticase soja pour 1 L d'eau .....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 5 : matériel utilisé pour les TRA .....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 6 : prélèvements microbiologiques réalisés lors de chaque TRA.....</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 7 : prélèvements microbiologiques réalisés après chaque session de TRA .....</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 8 : souches et milieux de cultures utilisés pour le test de fertilité des TRA .....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 9 : résultats du test de fertilité du TSB seul .....</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 10 : résultats du test de fertilité du TSB + fluorescéine .....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 11 : matériel utilisé pour les essais de stérilité .....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 12 : souches et milieu de culture utilisés pour les tests de fertilité et d'applicabilité .....</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 13 : résultats du test de fertilité des flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques .....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 14 : résultats de l'étude dosimétrique pour le personnel extérieur au service de médecine nucléaire .....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 15 : résultats du test d'applicabilité .....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 16 : résultats de la recherche de la limite de détection.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 17 : résultats de l'estimation de l'exactitude pour S. epidermidis.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 18 : résultats de l'évaluation de la robustesse .....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 19 : extrait de l'onglet « Amélioration » du tableur Excel® .....</i>	<i>87</i>



## LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

<sup>51</sup> Cr	Chrome-51
<sup>99m</sup> Tc	Technétium-99 métastable
<sup>99m</sup> Tc-hématies	Hématies radiomarquées au Technétium-99 métastable
<sup>125</sup> I	Iode-125
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARS	Agence Régionale de Santé
ASN	Autorité de Sûreté Nucléaire
BPP	Bonnes Pratiques de Préparation
CISH	Commission Internationale de Standardisation en Hématologie
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de Carbone
DDD	Détergeant-Désinfectant-Décontaminant
EPO	Érythropoïétine
Hb	Hémoglobine
HFL	Hotte à Flux Laminaire
HMPAO	HéxaMéthylPropylèneAmine Oxime
Ht	Hématocrite
ISO	International Standardization Organization
KI	Iodure de potassium
MBq	MégaBecquerel
MCR	Marquage Cellulaire Radioisotopique
MDS	Médicament Dérivé du Sang
MERM	Manipulateur en ÉlectroRadiologie Médicale
MO	Microorganisme
MRP	Médicament RadioPharmaceutique
MV	Maladie de Vaquez
NaCl	Chlorure de Sodium
O <sub>2</sub>	Dioxygène
PPH	Préparateur en Pharmacie Hospitalière
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur
SC	Surface Corporelle
Sv	Sievert
SoFRa	Société Française de Radiopharmacie
TRA	Test de Remplissage Aseptique
TSB	Bouillon Trypticase Soja (Tryptic Soy Broth)
UFC	Unité Formant Colonie
UV	UltraViolets
VG	Volume Globulaire
VP	Volume Plasmatique
VST	Volume sanguin total
ZAC	Zone à Atmosphère Contrôlée



## INTRODUCTION

---

La mesure isotopique des volumes sanguins est un examen diagnostique de médecine nucléaire réalisé dans le cadre d'une recherche de polyglobulie vraie.

Depuis des années, le chromate-51 de sodium était utilisé pour marquer les hématies. Suite à un arrêt de commercialisation survenu au début de l'année 2019, une méthode alternative en double isotope a été mise en place : des hématies autologues radiomarquées au technétium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sont maintenant utilisées pour déterminer le volume globulaire et de l'albumine humaine radiomarquée à l'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ ) est utilisée pour mesurer le volume plasmatique.

Cependant, cette nouvelle méthode comporte des procédés de préparation aseptiques complexes et multi-étapes, réalisés en système ouvert. Il y a donc un risque important de contamination microbiologique.

De plus, au CHU de Bordeaux, la mise en œuvre de cet examen est actuellement effectuée par des manipulateurs en électroradiologie médicale (MERM), sous la responsabilité technique des radiopharmaciens. La réalisation de tâches très diversifiées est nécessaire et la formation initiale des MERM peut parfois ne pas être suffisante.

Dans le cadre d'une démarche d'assurance qualité et de sécurisation de la prise en charge des patients, nous avons souhaité nous assurer que les procédés de préparation aseptiques mis en œuvre permettent effectivement d'obtenir des préparations stériles et qu'ils sont correctement effectués.

L'objectif de ce travail est double : d'une part, il a pour but de valider l'asepsie de nos procédés de préparation liés à la mesure isotopique des volumes sanguins, et d'autre part, il vise à former et à habilitier nos opérateurs à ce poste.

Après avoir exposé les principes de la radiopharmacie, nous nous attacherons à étudier les marquages cellulaires radioisotopiques et plus particulièrement la réalisation de la mesure isotopique des volumes sanguins, ainsi que le contrôle de l'asepsie des préparations requises.

Dans un second temps, nous présenterons les travaux menés au CHU de Bordeaux portant sur le développement et l'application de deux tests de remplissage aseptique challengés, d'un essai de stérilité par méthode alternative rapide, ainsi que d'une évaluation des connaissances et des pratiques.





PREMIÈRE PARTIE

MARQUAGES CELLULAIRES RADIOISOTOPIQUES  
ET ASEPSIE DES PRÉPARATIONS



# I. PRÉPARATIONS RÉALISÉES EN MÉDECINE NUCLÉAIRE

---

## 1. MÉDECINE NUCLÉAIRE ET RADIOPHARMACIE

La médecine nucléaire est une spécialité fondée sur l'utilisation des rayonnements ionisants émis par une molécule contenant un radionucléide artificiel nommé radiotraceur. C'est une technique d'imagerie fonctionnelle qui s'intéresse au métabolisme des organes. Elle utilise l'administration de médicaments radiopharmaceutiques (MRP) à des fins diagnostiques (imagerie fonctionnelle) ou thérapeutiques (radiothérapie interne vectorisée ou thérapie métabolique) (1).

La radiopharmacie est une activité soumise à autorisation de l'ARS (Agence Régionale de Santé), rattachée à la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) et intégrée au service de médecine nucléaire. Elle consiste en la gestion, la préparation, le contrôle et la dispensation des MRP.

Selon l'article L5121-1 du Code de la Santé Publique, un médicament radiopharmaceutique est défini comme « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales » (2).

Du fait de leur nature ambivalente, les MRP doivent satisfaire à la fois aux exigences de qualité pharmaceutique qui s'appliquent à tout médicament et à leur préparation, et aux exigences réglementaires permettant d'assurer la radioprotection des travailleurs, des patients, du public et de l'environnement. Ils sont donc soumis à une double réglementation (1,3) :

- Celle qui régit le médicament et sa préparation, dont les autorités compétentes sont l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) et les ARS. Les MRP font partie du monopole pharmaceutique. Ils sont donc placés sous la responsabilité d'un radiopharmacien par délégation du pharmacien gérant de la PUI de l'établissement.
- Celle qui régit les radionucléides, dont l'autorité compétente est l'ASN (Autorité de Sureté Nucléaire). L'utilisation et la détention de radionucléides à des fins médicales sont soumises à autorisation dont le titulaire est un médecin qualifié en médecine nucléaire.

## 2. PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES ET MARQUAGES CELLULAIRES RADIOISOTOPIQUES

Les préparations réalisées en médecine nucléaire étant majoritairement des préparations stériles, elles doivent répondre aux exigences des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) spécifiques à la préparation de médicaments stériles et à la préparation des MRP, le cas échéant.

Dans les BPP, trois procédés de préparation de médicaments stériles sont explicités : la stérilisation terminale, la filtration stérilisante et la préparation aseptique (4). En ce qui concerne les préparations radiopharmaceutiques et les marquages cellulaires radioisotopiques, la stérilisation dans le conditionnement final n'étant pas possible, il s'agit majoritairement de préparation aseptique.

L'objectif de celle-ci est de « maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants stériles (matières premières, articles de conditionnement) en utilisant des matériels de préparation stérilisés selon les méthodes décrites à la Pharmacopée ». Pour ce faire, il faut « opérer dans des conditions et au sein d'installations conçues pour empêcher la contamination microbienne, c'est-à-dire dans une zone à atmosphère contrôlée » (ZAC), dont les qualités microbiologiques et particulaires des locaux et/ou équipements qui la constituent sont maîtrisées (4).

Les préparations aseptiques peuvent être réalisées selon deux procédés :

- Un procédé de transfert en système clos, défini comme étant « un procédé de répartition aseptique permettant le prélèvement et le transfert d'un produit stérile vers un autre contenant stérile, dans lequel les systèmes de fermeture des contenants et le matériel de transfert restent en place pendant toute la durée du processus. Le transfert du produit stérile est réalisé à l'aide d'un dispositif de prélèvement (une seringue, une aiguille stérile, une tubulure stérile ou tout autre dispositif de transfert stérile), de telle manière qu'il ne soit jamais en contact avec l'environnement » (4). C'est le cas de la préparation des MRP qui se fait dans une enceinte blindée ventilée en dépression et équipée d'un sas d'entrée et de sortie du matériel et des produits, placée dans un environnement immédiat au minimum de classe D.
- Un procédé en système ouvert, lorsqu'au moins une des étapes de préparation n'est pas réalisée en système clos (4). C'est le cas des marquages cellulaires radioisotopiques qui sont réalisés dans une hotte à flux laminaire (HFL) vertical de classe A, placée dans un environnement contrôlé au minimum de classe C.

La complexité des préparations radiopharmaceutiques est variable, allant d'un simple reconditionnement d'un MRP prêt à l'emploi à la préparation réalisée à partir de cellules

sanguines. Les conditions de manipulation et les exigences en termes d'hygiène sont donc très différentes (1).

### A. MRP prêts à l'emploi

Certains MRP sont réceptionnés prêts à l'emploi (iodure [ $^{123}\text{I}$ ] de sodium,  $^{123}\text{I}$ -Datscan®,  $^{125}\text{I}$ -Seralb®,  $^{177}\text{Lu}$ -Lutathera® par exemple). Dans ce cas, la préparation consiste à conditionner ce médicament en doses individuelles ajustées aux patients (1).

### B. MRP réalisés à partir de trousse et de précurseurs

Ces préparations sont réalisées extemporanément à partir d'une trousse marquée par un radionucléide (figure 1).

La trousse est un médicament commercialisé non radioactif, stérile et apyrogène, qui se présente le plus souvent sous la forme d'un lyophilisat. Elle contient un vecteur spécifique au type d'exploration visée et différents composants nécessaires au marquage par un radionucléide.

Le radionucléide ou marqueur provient soit de l'éluat d'un générateur ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  par exemple), soit d'un précurseur radioactif commercialisé comme tel ( $^{111}\text{In}$ -oxinate ou  $^{111}\text{In}$ -chlorure par exemple) (1).

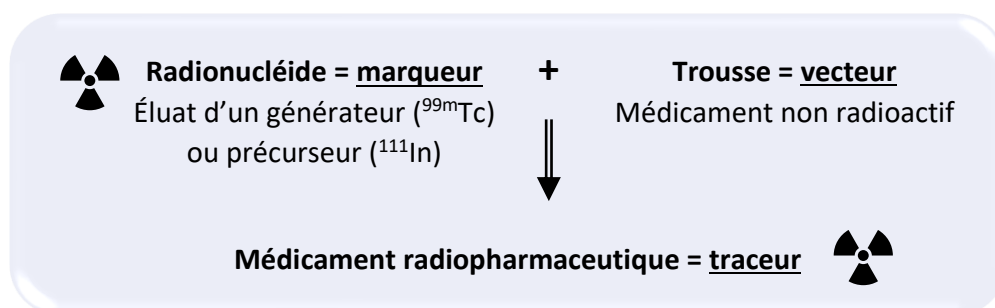


Figure 1 : schéma du marquage d'une trousse par un radionucléide (1)

### C. Marquages cellulaires radioisotopiques

Les marquages cellulaires radioisotopiques (MCR) correspondent à un ensemble de procédés consistant en l'incorporation *in vitro* d'un radioélément (marqueur) à une cellule sanguine autologue (vecteur). Le but principal est de rendre possible la révélation de la présence de cette cellule *in vivo* (5). Les cellules sanguines concernées sont les polynucléaires neutrophiles (ou leucocytes totaux), les plaquettes et les hématies. Le choix du radionucléide est fonction du type d'exploration et de la nécessité ou non d'obtenir des clichés ou comptages tardifs (1).

Les MCR comprennent généralement les étapes suivantes : le prélèvement du sang du patient, la séparation des cellules sanguines, le marquage de la lignée d'intérêt, le lavage et la réinjection au patient (figure 2).

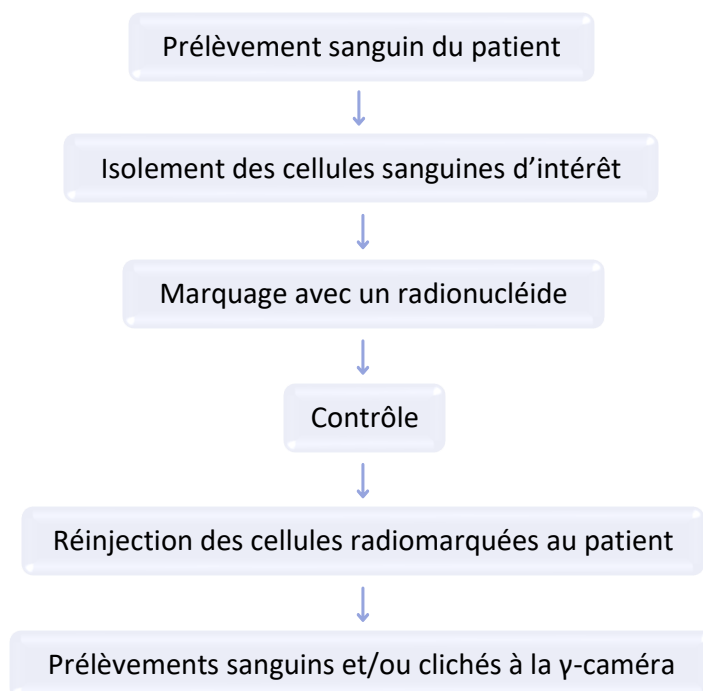


Figure 2 : schéma des principales étapes d'un marquage cellulaire (1)

En raison de la nature radioactive et biologique du produit, des différentes opérations réalisées en système ouvert et de l'absence de contrôle de stérilité avant injection au patient, il est nécessaire d'être extrêmement vigilant aux conditions d'hygiène et de préparation (1).

Par ailleurs, lors de la réalisation de marquages cellulaires, il est important de respecter un certain nombre d'éléments (1) :

- Du fait de la manipulation de sang, toutes les précautions nécessaires doivent être prises pour éviter un accident d'exposition au sang,
- L'asepsie à l'étape du prélèvement sanguin doit être particulièrement rigoureuse (désinfection en cinq temps) car tout germe présent au prélèvement se retrouvera dans la préparation finale,
- Les cellules radiomarquées doivent se comporter in vivo de manière identique à leurs homologues non radiomarqués et pour cela, elles ne doivent pas être endommagées durant la procédure de marquage.
- Le temps de préparation doit être le plus court possible.

- Une seule préparation doit être réalisée à la fois afin d'éviter les risques de contamination croisée entre prélèvements sanguins. La personne qui fait le prélèvement doit si possible assurer la réinjection de la préparation pour éviter les erreurs de patient.

Actuellement, du fait des propriétés de la matière première spécifiques à chaque patient, les MCR ne répondent pas à la définition des médicaments (ils ne font donc pas partie du monopole pharmaceutique) et n'ont pas de statut juridique défini. Ils se retrouvent à la frontière de trois domaines : la médecine nucléaire, la radiopharmacie et la biologie. Il se pose donc la question des règles applicables aux modalités de réalisation du radiomarquage concernant les opérateurs, les locaux, les contraintes réglementaires de type bonnes pratiques (2).

En effet, les cellules radiomarquées constituent une source radioactive non scellée d'origine biologique et sont donc sous la responsabilité du médecin nucléaire qui, souvent, délègue la responsabilité technique aux radiopharmaciens.

Les MCR sont des préparations aseptiques généralement réalisées en système ouvert et donc à risque élevé de contamination microbiologique. Ils doivent ainsi répondre aux BPP.

Des disparités portant sur les méthodes utilisées ou sur les personnes en charge de la réalisation de ces opérations ont été constatées et peuvent conduire à des incertitudes pouvant mettre en danger la sécurité des patients. La nature à risque des produits et des pratiques implique donc la nécessité de voir les MCR effectués exclusivement par des personnes formées et qualifiées (5).

### 3. CONDITIONS REQUISES POUR LA PRÉPARATION DE MARQUAGES CELLULAIRES RADIOISOTOPIQUES

#### A. Locaux et équipements

Étant donné la complexité des MCR, des équipements nécessaires et le niveau de sécurité exigé, il est nécessaire de disposer d'un local spécifique dédié à cette activité (1).

Ce local doit répondre aux normes pharmaceutiques imposées par les BPP en termes de qualité microbiologique et particulière de l'air. Il doit au minimum respecter les niveaux d'exigence d'une ZAC de classe C. Compte tenu des faibles activités et de la nature des radioéléments manipulés, le risque microbiologique prime sur le risque radiologique et le local doit donc être en surpression. Les surfaces de l'ensemble du local doivent être lisses, imperméables, et faciliter la décontamination microbiologique, particulière et radioactive. L'accès doit se faire grâce à un sas en surpression par rapport à l'extérieur et en dépression par rapport au local, permettant au personnel de revêtir la tenue de travail adéquate et de respecter les mesures d'hygiène en vigueur, avec un asservissement des portes (1,4).



L'essentiel des MCR est réalisé dans une HFL vertical de classe A (poste de sécurité microbiologique de type II) afin de protéger la préparation d'un risque de contamination microbiologique, ainsi que l'opérateur et l'environnement d'un risque de contamination radioactive. Cependant, certaines étapes doivent se faire à l'extérieur de la HFL, comme les étapes de centrifugation, d'agitation, ou de contrôle de l'activité (1).

Afin de garantir le niveau de classe d'air des différentes ZAC, des contrôles environnementaux microbiologiques et particuliers des hottes, équipements et locaux doivent être effectués. Les limites exigées sont définies dans les tableaux 1 et 2 suivants.

*Tableau 1 : caractéristiques particulières des ZAC (4)*

Nombre maximal autorisé de particules par m <sup>3</sup>				
Classe	Au repos		En activité	
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
<b>A</b>	<b>3520</b>	<b>20</b>	<b>3520</b>	<b>20</b>
B	3520	29	352 000	2900
<b>C</b>	<b>352 000</b>	<b>2900</b>	<b>3 250 000</b>	<b>29 000</b>
D	3 520 000	29 000	Non défini	Non défini

*Tableau 2 : recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC*

Limites recommandées de contamination microbiologique				
Classe	Échantillon d'air UFC/m <sup>3</sup>	Boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) UFC/4 heures	Géloses de contact (diamètre 55 mm) UFC/plaque	Empreintes de gant (5 doigts) UFC/gant
<b>A</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>&lt; 1</b>
B	10	5	5	5
<b>C</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	-
D	200	100	50	-

De plus, divers équipements et matériels sont nécessaires à la réalisation de ces préparations. On retrouve notamment une centrifugeuse, une étuve, un agitateur simple, un agitateur type Vortex®, un réfrigérateur, des poubelles et collecteurs de dispositifs coupants et tranchants placés dans des protections blindées, du matériel de radioprotection (protèges-seringues, containers blindés, pinces), des équipements à usage unique (charlottes, surchaussures, surblouses, gants

non stériles et stériles, masques chirurgicaux, casaques stériles), du matériel à usage unique stérile et apyrogène, un contaminamètre et un débitmètre (1).

## *B. Personnel*

### a) Hygiène et sécurité

Pour accéder à une zone contrôlée, le port d'un dosimètre opérationnel et de dosimètres passifs (poitrine et bague) est obligatoire.

Pour accéder au local de marquage cellulaire (classe C), les cheveux, la barbe et la moustache doivent être couverts, le personnel doit porter un vêtement constitué d'une veste et d'un pantalon ou d'une combinaison serrée aux poignets et munie d'un col montant, ainsi que de chaussures ou surchaussures adaptées. Le tissu de ces vêtements ne doit pas libérer de fibres ou particules. Les bijoux, montres, ou tout autre objet personnel, ainsi que le maquillage ou la nourriture sont à proscrire de ces zones. Il est demandé au personnel d'avoir une hygiène corporelle adaptée (1,4).

D'autre part, le nombre de personnes présentes dans la ZAC doit être limité au minimum et les déplacements doivent être maîtrisés (4).

Concernant la manipulation sous HFL de classe A, il est demandé au personnel de porter un masque chirurgical couvrant le visage pour éviter l'émission de gouttelettes, des gants stériles non poudrés (4), ainsi qu'une casaque stérile serrée aux poignets.

### b) Formation et habilitation

Ces préparations sont longues et fastidieuses. Elles nécessitent donc un personnel spécialement formé et expérimenté (1).

Les BPP soulignent l'importance d'une formation initiale et continue du personnel, et de son évaluation régulière. Ces formations doivent notamment porter sur les thèmes de la radiopharmacie, l'hygiène et la microbiologie, ainsi que sur la radioprotection des personnels, des patients, du public et de l'environnement (4).

Par ailleurs, la formation et l'habilitation des préparateurs en pharmacie hospitalière (PPH) et des MERM par les radiopharmaciens sur le poste de préparation des MRP sont actuellement requises par l'ASN. Il serait donc opportun d'étendre cette habilitation au poste des MCR. Ce poste nécessite un savoir-faire concernant les marquages cellulaires qui n'est pas inclus dans la

formation initiale des PPH et MERM. Il en est de même pour tout ce qui relève de l'aspect analytique de certains MCR comme le pipetage de différents prélèvements.

## II. MESURE ISOTOPIQUE DES VOLUMES SANGUINS

---

### 1. GÉNÉRALITÉS

Les hématies ou globules rouges sont des cellules anucléées qui assurent le transport du dioxygène (O<sub>2</sub>) et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'organisme, grâce à l'hémoglobine qui est leur principal constituant. La production des hématies par la moelle osseuse est régulée par l'érythropoïétine (EPO), une hormone majoritairement produite par le rein et le foie, selon la concentration en oxygène disponible dans les tissus. Lorsque celle-ci est insuffisante (hypoxie), la synthèse d'EPO augmente ainsi que la production d'hématies. À l'inverse, la production d'EPO et donc d'hématies diminue en cas d'hyperoxygénation. La durée de vie des hématies circulantes est d'environ 120 jours dans les conditions physiologiques. Les valeurs biologiques de référence sont rappelées dans le tableau 3 suivant (6).

Tableau 3 : valeurs biologiques de référence dans le sang (CHU de Bordeaux)

	Homme	Femme
Hématies	4,28 - 5,57 T/L	3,99 - 5,12 T/L
Hémoglobine (Hb)	13,4 - 16,7 g/L	12,1 - 15,0 g/dL
Hématocrite (Ht)	39,2 - 48,6 %	35,9 - 44,6 %

Lorsque le taux d'Hb est en dessous des valeurs usuelles, on parle d'anémie. Généralement, une diminution du nombre d'hématies circulantes et un pourcentage d'Ht abaissé sont aussi observés (l'Ht correspond au volume occupé par les hématies circulantes dans le sang, exprimé en pourcentage par rapport au volume total de sang).

Lorsque le taux d'Hb est supérieur aux valeurs usuelles, on parle de polyglobulie. Dans ce cas, un taux élevé d'Ht, lié à l'augmentation du volume globulaire, est aussi retrouvé (6).

Dans le cadre d'une polyglobulie, plusieurs cas de figure peuvent être distingués (figure 3) (6–8) :

- Une polyglobulie vraie, comme la maladie de Vaquez (MV) qui est un syndrome myéloprolifératif prédominant sur la lignée érythrocytaire. Une mutation (V617F) sur le gène codant pour la protéine Janus kinase 2 (JAK2) est retrouvée dans 98% des cas (et

dans 2% sur l'exon 12). Une augmentation du nombre d'hématies, ainsi que de l'Hb et de l'Ht est retrouvée. Des signes cliniques comme une érythrose faciale et palmaire, des céphalées, des vertiges, des érythromélgies, des troubles visuels, des acouphènes, un prurit aquagénique, des thromboses, ou une splénomégalie peuvent être observés.

D'autres polyglobulies vraies existent, comme les polyglobulies congénitales, les polyglobulies secondaires (à une hypersécrétion d'EPO induite par une hypoxie tissulaire ou à une sécrétion inappropriée d'EPO), ou les polyglobulies associées à d'autres syndromes myéloprolifératifs (leucémie myéloïde chronique, splénomégalie myéloïde chronique, thrombocytemie essentielle).

- Une pseudo-polyglobulie due à une hémococentration avec diminution du volume plasmatique (déshydratation, traitement diurétique, chocs, brûlure grave, tabagisme, stress), à une microcytose ( $\beta$ -thalassémie hétérozygote), ou à une autre cause (obésité, hypertension artérielle, tabagisme, alcoolisme).

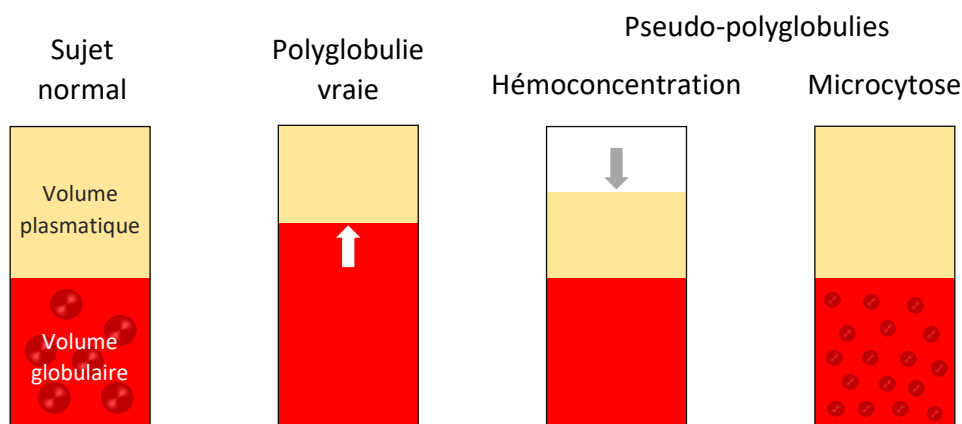


Figure 3 : illustration des différents types de polyglobulie

Les indications de la mesure isotopique des volumes sanguins sont les suivantes : l'aide au diagnostic de polyglobulie vraie en les distinguant des pseudo-polyglobulies, le diagnostic différentiel entre polyglobulie vraie et thrombocytemie essentielle, le suivi de l'efficacité thérapeutique pour les patients atteints de la maladie de Vaquez, et la recherche de polyglobulie vraie avant l'instauration d'un traitement par EPO chez les patients atteints d'hypotension orthostatique résistante aux traitements, dans le cadre d'une atrophie multisystématisée.

Selon la Commission Internationale de Standardisation en Hématologie (CISH), il est recommandé d'utiliser du chrome-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) pour le marquage des hématies autologues afin d'effectuer une mesure isotopique des volumes sanguins. Le  $^{51}\text{Cr}$  fixé sur la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine a l'avantage d'être peu labile (< 1% d'éluion par jour). De plus, sa période radioactive ( $T_{\text{phy}}$ ) est de 27,7 jours, ce qui est suffisamment long pour pouvoir s'affranchir de la décroissance radioactive lors des calculs.

Suite à l'arrêt de commercialisation du chromate-51 de sodium, une nouvelle méthode a été développée. Elle comprend :

- La mesure du volume globulaire (VG) grâce au marquage *in vitro* des hématies par le  $^{99m}\text{Tc}$  ( $T_{\text{phy}} = 6,007$  heures (9)).
- La mesure du volume plasmatique (VP) grâce au marquage *in vivo* du plasma par l' $^{125}\text{I}$ -Seralb® ( $T_{\text{phy}} = 59,39$  jours (9)).

Cet examen s'appuie sur le principe de dilution isotopique en compartiment fermé : un traceur est injecté en quantité connue dans un compartiment dont le volume ne varie pas. Ce traceur se dilue de manière homogène dans l'espace à mesurer et lorsqu'un équilibre est atteint, des échantillons sont prélevés. Suite à un comptage externe, la radioactivité volumique moyenne des échantillons prélevés est connue et permet de déduire le volume du compartiment fermé en divisant la quantité de radioactivité injectée par cette radioactivité volumique moyenne (figure 4).

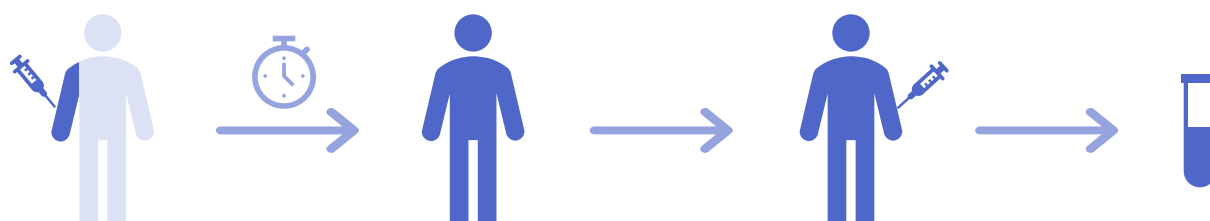


Figure 4 : schéma du principe de dilution isotopique

## 2. DÉROULEMENT DE L'EXAMEN EN DOUBLE ISOTOPE AU CHU DE BORDEAUX

### A. Ciblage des patients

En concertation avec les hématologues, il a été décidé de réaliser en amont une recherche de la mutation JAK2 V617F et de vérifier les autres critères diagnostiques pour la MV de l'OMS 2016 afin d'éviter aux patients un examen irradiant non nécessaire. De plus, en raison de la complexité de l'examen en double isotope (temps de manipulation, temps d'examen pour le patient, prise d'iodure de potassium pendant une semaine), le résultat de la recherche de mutation JAK2 permet d'effectuer un tri des patients dans le but d'affiner leur prise en charge.

En effet, au CHU de Bordeaux, seul le volume globulaire est mesuré pour les patients qui présentent une mutation de JAK2, alors que les volumes globulaires et plasmatiques sont mesurés pour les patients qui ne présentent pas cette mutation. Cela s'explique de plusieurs façons :

- Lorsque la mutation JAK2 V617F est présente, soit le diagnostic de polyglobulie de Vaquez a déjà été établi et l'examen est demandé pour suivre l'évolution de la maladie, soit un

diagnostic différentiel entre thrombocytémie essentielle et polyglobulie de Vaquez est requis. La mesure du volume plasmatique n'est donc pas nécessaire.

- Lorsque la mutation JAK2 V617F n'est pas retrouvée, une mesure exacte du volume plasmatique est réalisée car il peut s'agir de pseudo-polyglobulies (comme une hémococoncentration) ou encore d'autres polyglobulies vraies.

### *B. Accueil des patients*

À l'arrivée du patient, le radiopharmacien effectue un entretien pour lui expliquer le déroulement et l'objectif de l'examen. Il recueille aussi divers renseignements qui permettront l'interprétation des résultats : la taille et le poids du patient (une pesée peut être réalisée sur place si besoin), les antécédents hématologiques, l'historique médicamenteux (notamment une prise de diurétiques), le tabagisme, ou des symptômes évoquant une polyglobulie. Il est demandé au patient de rester allongé pendant toute la durée de l'examen. Par ailleurs, on s'assure que le patient est bien à jeun et qu'il n'a pas eu de saignée au cours des trois semaines précédentes.

Si le VP est évalué, l'administration de <sup>125</sup>I-Seralb® est requise. S'agissant d'un médicament dérivé du sang (MDS), le <sup>125</sup>I-Seralb® impose des contraintes liées à l'utilisation de ce type de médicament, telles que l'information du patient, le recueil de son consentement écrit, une traçabilité particulière. Le pharmacien recueille donc le consentement du patient après l'avoir informé sur la nature de ce médicament.

De plus, le marquage de l'albumine par l'<sup>125</sup>I est labile et l'<sup>125</sup>I libre va se fixer préférentiellement au niveau de la thyroïde. Le pharmacien fournit alors au patient des comprimés d'iodure de potassium à prendre pendant sept jours, afin de saturer la thyroïde et de la protéger des rayonnements ionisants.

### *C. Mesure du volume plasmatique*

En accord avec les BPP, les préparations utilisées pour cet examen sont réalisées en système ouvert dans des hottes à flux laminaire vertical de classe A, avec un environnement immédiat de classe C (4), par des MERM.

En amont de l'examen, le flacon de <sup>125</sup>I-Seralb® reçu doit préalablement être fractionné en trois doses-patient. À ce moment-là, une seringue-témoin de <sup>125</sup>I-Seralb® est préparée avec le <sup>125</sup>I-Seralb® restant. Avec celle-ci, une solution-témoin de <sup>125</sup>I-Seralb® est préparée. Cette solution-témoin nous permettra de connaître la radioactivité par gramme de <sup>125</sup>I-Seralb®, pour ensuite calculer la radioactivité théoriquement injectée aux patients, et servira lors de l'examen de trois patients.

Pendant que le radiopharmacien s'entretient avec le patient, dans le local de marquages cellulaires, le MERM prépare le matériel nécessaire à l'examen, ainsi que la seringue de <sup>125</sup>I-Seralb® destinée au patient. Il procède à la pesée de la seringue-patient <sup>125</sup>I vide puis pleine.

Le MERM pose ensuite deux voies périphériques au patient. L'une sera réservée aux injections et l'autre, aux prélèvements. La distinction des deux voies a pour but d'empêcher la contamination croisée des prélèvements avec une potentielle radioactivité résiduelle.

Un prélèvement 0 (P0) est d'abord réalisé. Il servira à s'assurer que le patient n'a pas récemment bénéficié d'un examen de médecine nucléaire pouvant perturber l'interprétation de l'examen. Il permettra aussi d'obtenir l'Ht sur lequel reposeront les calculs du volume globulaire.

Le <sup>125</sup>I-Seralb® préparé en amont est ensuite injecté et des prélèvements sont effectués 15 (P15) et 30 minutes (P30) après l'injection (et à 60 minutes en cas de splénomégalie en raison de l'allongement du temps de dilution isotopique).

Dans le local de marquage cellulaire, une mesure de l'Ht est réalisée.

La seringue-patient de <sup>125</sup>I-Seralb® est conservée et rincée. Les eaux de rinçage sont diluées dans une fiole jaugée de 25 mL. Cela nous permettra de soustraire la radioactivité résiduelle non injectée à la radioactivité théoriquement injectée, pour connaître avec précision la quantité de radioactivité réellement injectée.

Les tubes de prélèvements P0, P15 et P30 sont centrifugés et 1 mL de plasma de chaque tube, ainsi que 1 mL de la solution-témoin et des restes sont ensuite déposés dans des tubes à hémolyse, en duplicat. La radioactivité contenue dans ces tubes à hémolyse est alors mesurée grâce à un  $\gamma$ -compteur (fenêtre de détection de l'<sup>125</sup>I : 15 - 75 KeV).

#### *D. Détermination du volume globulaire*

Pour la préparation des <sup>99m</sup>Tc-hématies, 10 mL de sang sont prélevés avec une seringue héparinée.

Dans la HFL, le MERM injecte les 10 mL de sang prélevé dans un flacon stérile, puis il réalise la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies selon les étapes suivantes (le mode opératoire détaillé est consultable en annexe 1) :

- Prétraitement des hématies : ajout de 1,5 mL de solution de Technescan PYP® diluée au 1/400<sup>ème</sup>. Cette trousse est composée de pyrophosphate de sodium et de chlorure stanneux. Cela permet la formation d'un complexe réducteur qui rentre dans les hématies et qui, dans un second temps, permettra la réduction du <sup>99m</sup>Tc. Le flacon de préparation

est ensuite placé en agitation lente à 37°C pendant 5 minutes, puis centrifugé pendant 5 minutes.

- Lavage des hématies : avant d'introduire le  $^{99m}\text{Tc}$ , les hématies sont lavées pour éliminer l'étain libre. Le surnageant est retiré et 5 mL de NaCl 0,9 % sont ajoutés. Le flacon est délicatement agité pour remettre en suspension le culot globulaire puis il est de nouveau centrifugé pendant 5 minutes.
- Préparation de la solution de  $^{99m}\text{Tc}$  : le MERM affecté au poste de préparation des MRP prépare une seringue de 5 mL contenant 10 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$  (pertechnétate de sodium) fraîchement élué dans une enceinte blindée de classe A placée dans un environnement de classe D.
- Marquage : le surnageant est retiré et les 5 mL de solution de  $^{99m}\text{Tc}$  sont ajoutés. Le  $^{99m}\text{Tc}$  traverse la membrane érythrocytaire, puis il est réduit par le pyrophosphate stanneux. Le  $^{99m}\text{Tc}$  intracellulaire peut alors se fixer à la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine. Le flacon est délicatement agité pour remettre en suspension le culot globulaire et il est de nouveau mis en agitation lente à 37°C pendant 5 minutes, puis centrifugé pendant 5 minutes.
- Mise en seringue : le surnageant est retiré et 5 mL de NaCl 0,9 % sont ajoutés. Le flacon est délicatement agité pour remettre en suspension le culot globulaire. Après avoir pesé les seringues-patient et témoin  $^{99m}\text{Tc}$  vides, 2 mL de préparation d' $^{99m}\text{Tc}$ -hématies sont prélevés avec la seringue-patient  $^{99m}\text{Tc}$  et 1 mL avec la seringue-témoin  $^{99m}\text{Tc}$ . Les seringues-patient et témoin  $^{99m}\text{Tc}$  pleines sont ensuite pesées.
- Contrôle : le MERM va ensuite enregistrer l'activité contenue dans la seringue-patient  $^{99m}\text{Tc}$  grâce à l'activimètre de l'enceinte blindée (environ 2 MBq sont attendus).

Un deuxième prélèvement 0 est réalisé pour faire une seconde mesure de l'Ht, puis les 2 mL de préparation d' $^{99m}\text{Tc}$ -hématies sont injectés au patient via le cathéter « injection ». Des prélèvements sont effectués à 15 et 30 minutes après l'injection (et à 60 minutes en cas de splénomégalie, en raison de l'allongement du temps de dilution isotopique).

Le contenu de la seringue-témoin  $^{99m}\text{Tc}$  est injecté dans une fiole jaugée puis rincée. La seringue-patient d' $^{99m}\text{Tc}$ -hématies est conservée et rincée. Les eaux de rinçage sont diluées dans des fioles jaugées de 100 mL distinctes. La solution-témoin nous permettra de connaître la radioactivité par gramme d' $^{99m}\text{Tc}$ -hématies pour ensuite calculer la radioactivité théoriquement injectée aux patients. La solution de restes nous permettra de soustraire la radioactivité résiduelle non injectée à la radioactivité théoriquement injectée pour connaître avec précision la quantité de radioactivité réellement injectée.



Pour chaque tube de prélèvement P0, P15 et P30, et pour la solution-témoin ainsi que la solution de restes, 1 mL est déposé dans un tube à hémolyse, en duplicat. La radioactivité contenue dans ces tubes à hémolyse est alors mesurée grâce à un  $\gamma$ -compteur (fenêtre de détection du  $^{99m}\text{Tc}$  : 110 – 170 KeV).

Toutes les données concernant le patient, les hématokrites mesurés, les pesées et les comptages sont transmis au radiopharmacien qui, grâce à un tableur Excel® prenant en compte la décroissance radioactive du  $^{99m}\text{Tc}$ , interprète les résultats des volumes mesurés et envoie un compte-rendu au médecin prescripteur.

### 3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE LA MESURE DES VOLUMES SANGUINS

#### A. Mesure du volume sanguin total

Si le patient présente la mutation JAK2 et que seul le VG est mesuré, le volume sanguin total (VST) est obtenu lors de la détermination du VG.

La préparation d' $^{99m}\text{Tc}$ -hématies d'activité connue est injectée en intraveineux dans le compartiment vasculaire du patient. Après homogénéisation totale du traceur dans l'espace à évaluer (dilution isotopique), la mesure de la radioactivité volumique de différents prélèvements sanguins permet la détermination du VST, en divisant la radioactivité réellement injectée (Q) par la radioactivité volumique à l'équilibre (C).

La décroissance radioactive du  $^{99m}\text{Tc}$  étant de 6,007 heures, il est nécessaire de la prendre en compte lors des calculs.

$$\text{VST} = Q / C$$

Si le patient ne présente pas la mutation JAK2 et que le VG et le VP ont été mesurés, le VST est calculé en additionnant le VG et le VP.

$$\text{VST} = \text{VG} + \text{VP}$$

#### B. Détermination du volume globulaire

Le volume globulaire (VG) est calculé en multipliant le VST par l'hématocrite somatique ( $Ht_s$ ) (1,10).

$$\text{VG} = \text{VST} \times Ht_s$$

L'hématocrite somatique correspond à l'hématocrite lu corrigé d'un premier facteur dû à la quantité de plasma restante entre les hématies, et d'un second facteur (0,91 – 0,92) lié au fait que les capillaires contiennent plus de plasma que les gros vaisseaux (10).

Le résultat de l'examen est exprimé en pourcentage d'écart entre le VG mesuré et le VG théorique ( $VG_{th}$ ) d'un sujet « normal » de même surface corporelle. La surface corporelle (SC) est déterminée grâce à la formule de Dubois à partir du poids et de la taille du patient (1).

$$SC (m^2) = 0,20247 \times Taille (m)^{0,725} \times Poids (kg)^{0,425}$$

Le  $VG_{th}$  est calculé selon les formules établies par la CISH (2012) (1).

$$\text{Homme adulte : } VG_{th} (mL) = (1486 \times SC (m^2)) - 825$$

$$\text{Femme adulte : } VG_{th} (mL) = (1,06 \times \text{âge (années)}) + (822 \times SC (m^2))$$

La valeur de VG obtenue est considérée comme pathologique si elle s'écarte de  $\pm 25\%$  de la valeur théorique (1).

### *C. Mesure du volume plasmatique*

Le volume plasmatique peut être obtenu par calcul, en faisant la différence entre le VST et le VG.

$$VP = VST - VG$$

Cependant, ce calcul ne permet pas d'obtenir une valeur fiable. En effet, en cas de mauvais marquage des hématies, le VP pourra être sur- ou sous-estimé.

Une mesure réelle du compartiment plasmatique est donc préférable puisqu'elle permet d'obtenir un résultat fiable et d'apprécier la qualité du marquage des hématies en comparant les valeurs de VP mesurées et calculées.

La mesure du VP peut être effectuée grâce à l'injection de sérum albumine humaine marquée à l' $^{125}I$ . Ce traceur est un médicament radiopharmaceutique prêt à l'emploi ( $^{125}I$ -Seralb®). La réalisation de cette mesure, indépendamment du volume globulaire mais en parallèle de celui-ci, permet aussi de confirmer les mesures précédentes (1).

Le résultat de l'examen est exprimé en pourcentage d'écart entre le VP mesuré et le VP théorique ( $VP_{th}$ ) d'un sujet « normal » de même surface corporelle. Le  $VP_{th}$  est calculé selon les formules suivantes :

$$\text{Homme adulte : } VP_{th} (mL) = 1578 \times SC (m^2)$$

$$\text{Femme adulte : } VP_{th} (mL) = 1395 \times SC (m^2)$$

Les valeurs sont considérées comme pathologiques si elles s'écartent de  $\pm 25\%$  de la valeur théorique.

### III. CONTRÔLE DE L'ASEPSIE DES PRÉPARATIONS INJECTABLES

---

Les préparations de cellules radiomarquées sont destinées à être réinjectées aux patients. Elles doivent donc répondre aux mêmes exigences de qualité microbiologique que celles appliquées à toute préparation injectable.

La garantie de la stérilité des préparations injectables est assurée par le respect d'un ensemble de conditions et de paramètres. Ceux-ci couvrent en particulier la qualification des locaux et des équipements, la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, la validation et la maîtrise des procédés de préparation, les contrôles microbiologiques et particuliers de l'environnement, la qualification du personnel, ainsi que les contrôles réalisés sur les préparations terminées (4).

Il existe deux tests complémentaires s'inscrivant dans cette démarche : le test de remplissage aseptique qui permet de s'assurer *a priori* de l'asepsie des procédés de préparation, et l'essai de stérilité qui permet de s'assurer *a posteriori* de la stérilité des préparations.

#### 1. TEST DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

Le test de remplissage aseptique (TRA), aussi appelé media fill test, consiste à simuler la réalisation d'une préparation aseptique en remplaçant les matières premières par un milieu de culture microbiologique (4,11–20). Cela a pour objectif de s'assurer *a priori* que les procédures mises en place permettent d'empêcher une contamination microbiologique durant la préparation (14,16,18). Les TRA doivent se rapprocher le plus possible du procédé de préparation aseptique, en comprendre toutes les étapes critiques et intégrer les cas les plus défavorables (12,18,21). Tous les échantillons de milieu de culture issus de ce test sont ensuite mis en incubation pour vérifier leur stérilité.

D'après les BPP, les TRA font partie intégrante de la validation des procédés de préparation aseptique. Ils doivent être réalisés lors de la qualification de performance et répétés après toute modification importante des procédés (4).

Les TRA présentent aussi un intérêt dans le cadre de la formation et de l'habilitation des opérateurs (12–19,21,22). En effet, en évaluant le risque de production de préparations non stériles, les TRA permettent d'évaluer la capacité d'un opérateur à maintenir la stérilité d'une

préparation tout au long du procédé de fabrication (23). Ainsi, avant de pouvoir participer à des opérations de préparation aseptique de routine, le personnel doit avoir été habilité, notamment grâce à des TRA (14,22).

Actuellement, les TRA sont largement utilisés en pharmacie hospitalière, y compris dans le domaine de la radiopharmacie, que ce soit pour la validation de procédés aseptiques ou bien pour l'habilitation des opérateurs.

C'est le cas, d'Urbano *et al.* qui ont souhaité valider l'asepsie de leur procédé de marquage radioisotopique des leucocytes par  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO après avoir apporté d'importantes modifications. Ils ont aussi utilisé le TRA pour habiliter leurs opérateurs. Suite aux 18 TRA effectués, aucune croissance microbiologique n'a été détectée (21).

Concernant le marquage radioisotopique des hématies avec le  $^{51}\text{Cr}$ , un TRA a aussi été développé par C. Berlion pour valider l'asepsie du procédé. Six TRA ont été réalisés et les « préparations finales » n'ont pas présenté de croissance microbiologique (24).

Par ailleurs, l'équipe de Chantry a mis au point un TRA combiné au test à la fluorescéine (25). De par leur fluorescence sous ultraviolets (UV), la fluorescéine ou la quinine permettent de simuler la contamination chimique ou radioactive pouvant être due à des projections générées lors des manipulations. Ces solutions ont un double intérêt : leur fluorescence sous lumière ultraviolette et leur innocuité (23).

Lors de la qualification des opérateurs, cette équipe a donc utilisé la fluorescéine pour rechercher des contaminations radioactives. Vingt TRA couplés à la fluorescéine ont été effectués. Aucune contamination microbiologique n'a été retrouvée mais la présence de fluorescéine a été mise en évidence sur les gants des opérateurs (25).

Cependant, ces TRA manquent de sensibilité. Moody *et al.* ont mis en évidence qu'après le retrait des mesures « barrières » de la manipulation aseptique (alcool isopropylique 70 %, gants stériles, flux d'air de classe A, stockage des flacons sans flip-off hors zone à atmosphère contrôlée (ZAC)), aucune contamination microbiologique n'était détectée. Sur les 250 unités produites lors de 25 TRA, aucune n'a montré de croissance microbiologique (26).

En effet, les TRA ont initialement été développés pour l'industrie pharmaceutique. Dans les current Good Manufacturing Practice, il est écrit que pour les productions de petite taille (< 5000 unités), le nombre de contenants remplis lors des TRA doit être égal à la taille maximale d'un lot de production (15). Le nombre d'unités joue un rôle important. D'après l'International Organization for Standardization (ISO), il faudrait 3000 unités pour pouvoir obtenir une détection sur un lot contaminé à  $1/1000^{\text{ème}}$  avec un niveau de confiance de 95% (27).

Mais comparativement à l'industrie pharmaceutique, les lots fabriqués en pharmacie hospitalière sont relativement petits. Au sein de notre laboratoire de marquage cellulaire radioisotopique, un lot correspond à une seule unité. Un TRA classique aurait donc une sensibilité trop faible et nécessite une optimisation.

Sigward *et al.* ont développé une méthode de TRA challengé permettant d'augmenter la sensibilité de ce test grâce à des microorganismes. Les septums des flacons utilisés ont volontairement été contaminés avec une suspension d'*Enterococcus faecalis* et ont mis en évidence un taux de contamination des échantillons de 2,3% (27).

## 2. ESSAI DE STÉRILITÉ

L'essai de stérilité appliqué à la préparation terminée est considéré comme le dernier d'une série de contrôles permettant de garantir la stérilité (4). Il doit être effectué dans des conditions aseptiques mais les précautions prises ne doivent pas affecter les microorganismes recherchés (28).

Il peut être réalisé selon différentes méthodes : une filtration sur membrane, un ensemencement direct du milieu de culture, ou des méthodes alternatives rapides.

La filtration sur membrane est la technique de référence et doit être utilisée chaque fois que la nature du produit le permet. Cela consiste à filtrer un volume de la préparation à contrôler sur une membrane de porosité inférieure ou égale à 0,45 µm. Après avoir été partagée en deux, la membrane est placée dans deux milieux de culture différents (TSB et thioglycolate). Le tout est mis à incuber à des températures adaptées pendant au minimum 14 jours (28).

L'ensemencement direct du milieu de culture consiste à inoculer un volume de la préparation à contrôler dans deux milieux de culture différents (TSB et thioglycolate). Les milieux ensemencés sont ensuite incubés à des températures adéquates pendant au minimum 14 jours (28).

Pour les deux méthodes ci-dessus, les cultures doivent être examinées à plusieurs reprises au cours et à la fin de l'incubation afin de détecter visuellement des signes de prolifération microbienne comme une turbidité (28).

Les méthodes alternatives rapides présentent des avantages par rapport aux méthodes précédemment évoquées, notamment une meilleure sensibilité et des délais de détection plus courts. Elles sont classées en trois catégories (29) :

- Les méthodes fondées sur la croissance, avec généralement, obtention d'un signal détectable au terme d'une période de culture (méthodes électrochimiques, mesure de la

consommation ou production d'un gaz, bioluminescence, turbidimétrie, détection de croissance sur milieux sélectifs et/ou indicatifs).

- La mesure directe, avec différenciation et/ou visualisation de cellules individuelles (cytométrie en phase solide, cytométrie en flux, technique de filtration et épifluorescence directe, autofluorescence).
- L'analyse de composants cellulaires, avec mesure indirecte d'une présence microbienne et identification de microorganismes via l'expression des composants cellulaires spécifiques (méthodes immunologiques, profils de composition en acides gras, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, spectrométrie de masse, dosages biochimiques fondés sur des réactions physiologiques, hybridation directe, techniques d'amplification génique, empreinte génétique).

L'essai de stérilité est couramment utilisé pour contrôler la stérilité des MRP préparés. Dans le domaine de la radiopharmacie, il est par ailleurs admis que l'essai de stérilité soit réalisé après injection de la préparation (12,19,30).

C'est le cas de l'équipe de Maia *et al.* qui a réalisé des essais de stérilité de leurs MRP préparés extemporanément dans le but de compléter leur système d'assurance qualité concernant les contaminations microbiologiques. Une méthode par ensemencement direct de 1 à 3 mL de préparation dans deux milieux de cultures (trypticase soja (TSB) et thioglycolate) a été utilisée. Pour les préparations contenant du  $^{99m}\text{Tc}$  ou de  $^{123}\text{I}$ , les échantillons étaient incubés pendant 14 jours, ce qui a permis leur décroissance radioactive pour une lecture par une personne du service d'hygiène. Ces contrôles étaient réalisés à une fréquence bimensuelle et concernaient environ une préparation sur 50. Au total, sur les 50 essais de stérilité, aucune croissance microbiologique n'a été détectée (31).

Aussi, dans les travaux de thèse de M. Plasse, un essai de stérilité a été développé pour contrôler l'asepsie d'un médicament radiopharmaceutique expérimental pour essai clinique. Une méthode par ensemencement direct dans les milieux thioglycolate et TSB a été utilisée. Dû au faible volume de préparation, le volume de l'échantillon était de 0,5 mL par milieu. La validation de la méthode a été réalisée avec les six souches microbiennes indiquées par le chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne. Pour éviter le risque de faux négatif, il a été décidé d'effectuer l'essai de stérilité immédiatement après la préparation du produit. Cependant, la radiopharmacie ne disposant pas de l'équipement nécessaire, les échantillons ont été mis à incuber dans une étuve du laboratoire de contrôle qualité. Des mesures de radioprotection ont donc dû être mises en place pour le transport et l'incubation des échantillons (32).

Enfin, lors de la validation d'un procédé et de l'habilitation des opérateurs, l'essai de stérilité doit être réalisé en triplicat, selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne (19,33).

## DEUXIÈME PARTIE

### DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION DE TESTS DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE





## I. ENQUÊTE NATIONALE

---

En raison du peu de données retrouvées dans la littérature, nous avons effectué une enquête nationale en avril/mai 2020 afin de faire un état des lieux sur la réalisation de TRA en radiopharmacie. Pour cela, un questionnaire Google Form® a été créé. Il comportait huit questions sur les tests de remplissage aseptique. Il a été diffusé via la Société Française de Radiopharmacie (SoFRa) aux radiopharmaciens adhérents pendant 45 jours.

Nous avons obtenu 36 réponses d'établissements différents.

Il en ressort que 36 % (13) des unités radiopharmaceutiques réalisent des TRA portant sur la préparation des MRP. L'objectif de ces TRA concerne à 25 % (3) la validation de procédés de préparation, à 33 % (4) l'habilitation des opérateurs, et à 42 % (5) la validation de procédés et l'habilitation des opérateurs. Parmi les 13 unités qui réalisent des TRA, 38 % (5) ont validé leur méthode.

De plus, sur les 25 unités de radiopharmacie qui font des MCR, 28 % (7) effectuent des TRA portant sur ces préparations. Ces TRA ont pour objectifs la validation du processus de préparation dans 43 % (3) des cas et l'habilitation dans 57 % (4) des cas. Parmi les centres qui réalisent des essais de stérilité sur les marquages cellulaires, 29 % (2) ont validé leur méthode.

Cette enquête montre que peu d'unités de radiopharmacie réalisent des TRA, particulièrement en ce qui concerne les MCR. Cela souligne l'importance de développer des outils adaptés, afin de pouvoir valider l'asepsie des procédés de préparation et habiliter les opérateurs impliqués.

## II. DÉVELOPPEMENT DE TESTS DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

---

### 1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### A. Matériel

Différents référentiels et publications recommandent d'utiliser un milieu de culture limpide et non sélectif pour la réalisation de TRA (12,13,15,20,11). Nous avons donc choisi le TSB qui permet la croissance de bactéries aérobies, de levures et de moisissures.

Sa composition est détaillée dans le tableau 4 suivant (28).

Tableau 4 : composition du bouillon trypticase soja pour 1 L d'eau

Composant	Quantité
Hydrolysate pancréatique de caséine	17 g
Hydrolysate papaïque de farine de soja	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté/Glucose	2,5/2,3 g

Le tableau 5 ci-dessous récapitule le matériel spécifique utilisé lors de la validation et de l'application des TRA.

Tableau 5 : matériel utilisé pour les TRA

Milieu de culture	Fabricant	Numéro de lot	Péremption
Trypticase soja (poches de 3L)	VWR	110684	13/04/2021
Trypticase soja (tubes)	Thermoscientific	2933900	01/02/2021

Souche	Fabricant	Numéro de lot	Péremption
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Eurofins	3010111-A1829-3581	26/09/2020
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		3020101-A2030-3745	12/03/2022
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		3030111-A1829-3569	05/09/2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		3070101-A2025-3748	23/03/2021
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228		3100201-A1930 3742	20/02/2021

Autre	Fabricant	Numéro de lot	Péremption
Fluorescéine (doses)	SERB	3L63D	31/08/21

Tous les autres consommables utilisés lors des TRA (flacons, seringues, aiguilles, ...) étaient identiques à ceux utilisés en routine.

## B. Méthode

### a) Mise au point du protocole de TRA

Dans le but de valider l'asepsie de nos procédés de préparation, deux TRA ont été développés :

- Le TRA n°1 correspond au fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®,
- Le TRA n°2 correspond à la mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et au marquage radioisotopique des hématies au <sup>99m</sup>Tc.

Cela s'explique par le fait que, dans la pratique, la première partie s'effectue en amont et indépendamment de la deuxième.

En raison de la complexité de nos préparations et pour que les TRA soient les plus représentatifs possible, ils ont été réalisés dans les locaux utilisés habituellement lors de nos marquages cellulaires radioisotopiques.

Nous avons souhaité améliorer la sensibilité des TRA. Pour cela, nous avons réalisé des TRA challengés en contaminant intentionnellement les septums des flacons utilisés avec des bactéries, à l'instar de ce qui a été fait par Sigward *et al* (27).

Pour ce faire, *Staphylococcus epidermidis* a été choisi puisqu'il s'agit d'un *coccus* à coloration de Gram positive aérobic/anaérobic facultatif, communément retrouvé dans la flore cutanée et sensible à l'alcool isopropylique. Dans les régions sèches de la peau, la densité de la population microbienne varie entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> et les *cocci* à coloration de Gram positive représentent 90 % de la flore cutanée (34,35). De plus, parmi les staphylocoques à coagulase négative, l'espèce la plus fréquemment retrouvée est *S. epidermidis* (36). Après avoir reconstitué la suspension de *S. epidermidis* à l'aide d'un bouillon tryptone sel, nous avons donc contaminé le septum de tous les flacons avec environ 875 UFC (soit 20 µL de suspension).

Par ailleurs, comme l'équipe de Chantry, nous avons couplé les TRA à une évaluation de la contamination radioactive du plan de travail grâce à la fluorescéine (25). L'utilisation de la quinine a d'abord été envisagée puisque son absence de couleur permet une révélation terminale. Mais suite à des tests préliminaires, il s'est avéré que le TSB empêche la fluorescence de la quinine aux concentrations testées. Nous avons donc eu recours à la fluorescéine.

Pour le choix de la concentration des solutions de fluorescéine utilisées, plusieurs équipes ont préféré employer des solutions de fluorescéine à 10 mg/mL pour obtenir une meilleure sensibilité (25,37,38). Pour une question de disponibilité, nous avons réalisé des tests avec une solution à 0,2 mg/mL, ce qui nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Lors de ces tests, le recours à un brumisateur a été nécessaire pour réhydrater la solution de fluorescéine ayant séché et permettre la révélation grâce à une lampe UV.

Pour simuler le <sup>125</sup>I-Seralb®, nous avons préparé des flacons de 0,4 mL de fluorescéine (soit 2 mg) avec 9,6 mL de TSB. Pour simuler la solution de <sup>99m</sup>Tc, nous avons préparé des seringues de 5 mL de solution de fluorescéine en prélevant 0,8 mL de fluorescéine (soit 4 mg), complétée avec 4,2 mL de TSB.

Les modes opératoires des TRA ont été définis de façon à être les plus représentatifs possible des procédés habituels. Les étapes critiques ont été spécifiées et les cas les plus défavorables ont été intégrés. Différents formulaires de traçabilité ont été créés (matériel nécessaire, étapes du TRA, suivi des échantillons, résultats).

- TRA n° 1 : fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®

La figure 5 représente la comparaison des différentes étapes du fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb® et du TRA correspondant. Les septums de tous les flacons ont été contaminés par *S. epidermidis*.

Nous avons identifié comme étapes critiques la désinfection des septums et les manipulations en système ouvert (prélèvement du <sup>125</sup>I-Seralb®). Les cas les plus défavorables impliquaient la contamination des septums, l'absence de changement d'aiguille entre la pesée à vide de la seringue-témoin et le fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®, et une sortie/entrée supplémentaire du local de marquage cellulaire.

Ce TRA comportait 29 étapes et permettait d'obtenir cinq échantillons (annexe 3).

La validité de ce TRA reposait uniquement sur la stérilité des trois flacons de « Seralb® fractionné ».

Lors du TRA, 1 mL de TSB + fluorescéine a été prélevé au lieu de 0,4 mL de <sup>125</sup>I-Seralb® habituellement prélevé afin de permettre une meilleure observation d'une éventuelle croissance microbienne.

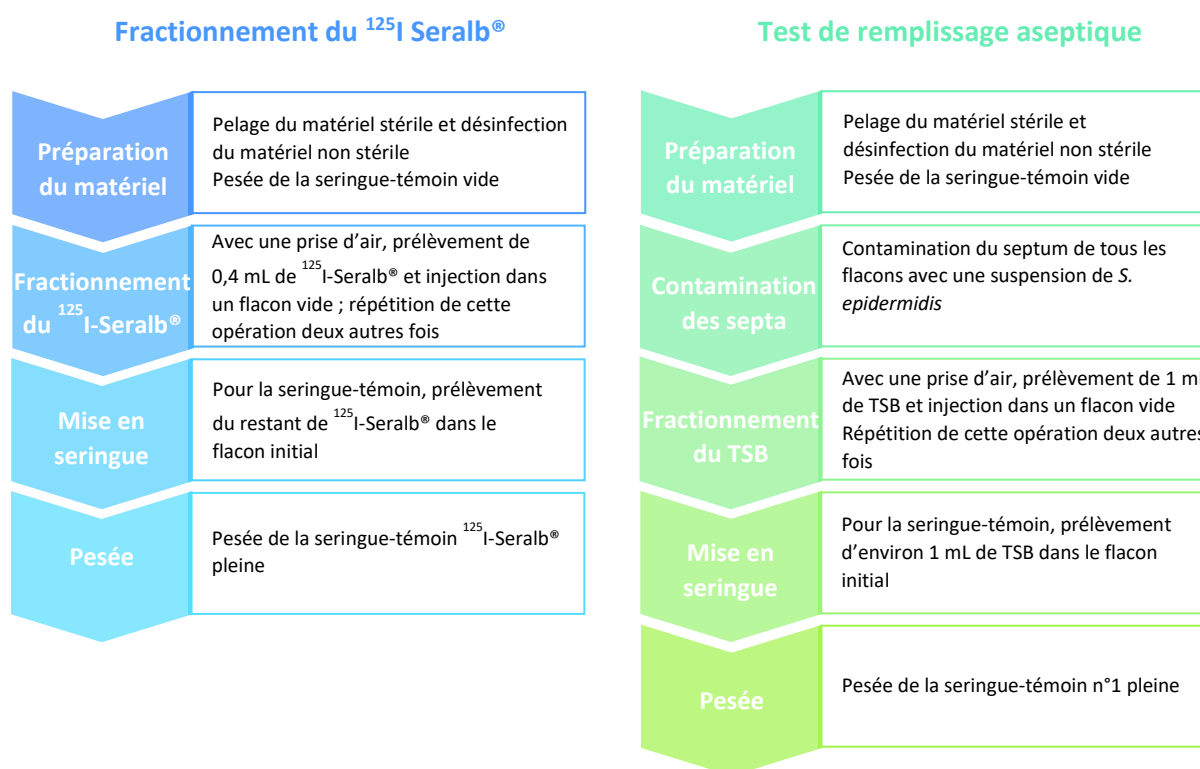


Figure 5 : comparaison du procédé de fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb® avec le TRA

- **TRA n°2 : mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et marquage radioisotopique des hématies au <sup>99m</sup>Tc**

La figure 6 représente la comparaison des différentes étapes de mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et de la préparation des hématies radiomarquées au <sup>99m</sup>Tc avec le TRA correspondant.

Tous les septums des flacons ont été contaminés avec *S. epidermidis* et le septum du flacon de préparation a été contaminé une seconde fois à la moitié du protocole du TRA (annexe 4).

Nous avons identifié comme étapes critiques la désinfection des septums des flacons et les manipulations en système ouvert (comme le retrait des surnageants). Les cas les plus défavorables impliquaient la contamination des septums, deux sorties/entrées supplémentaires du local, le retrait des surnageants en regardant sous la vitre de la HFL, l'ouverture de la porte du local au cours d'une des étapes en système ouvert et l'injection de la solution de fluorescéine avec un protège-seringue plombé.

Ce TRA comportait 129 étapes et permettait d'obtenir 18 échantillons (annexe 5).

La validité de ce TRA reposait uniquement sur la conformité de la seringue-patient de « Seralb® », de la seringue-patient de « <sup>99m</sup>Tc-hématies » et du flacon de « préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies ».

Dans le but de faciliter l'observation d'une éventuelle croissance microbienne dans les échantillons du TRA, les volumes mis en seringue ont été fixés à 2,5 mL et les volumes prélevés dans les tubes de TSB ont été plafonnés à 8 mL.

Dans le protocole des TRA portant sur la préparation des <sup>99m</sup>Tc-hématies, nous avons décidé de ne pas utiliser la centrifugeuse, l'étuve et l'activimètre. Ceci avait pour but de ne pas risquer de contaminer ces équipements qui sont plus compliqués à nettoyer. Pour simuler les étapes de centrifugation, d'agitation à 37°C et de contrôle d'activité, nous avons utilisé des contenants et emplacements dédiés (annexe 4).

Les durées de centrifugation et d'agitation à 37°C ont été réduites car elles ne présentaient pas de risque microbiologique particulier.

De plus, des tubes de TSB ont été choisis pour simuler les ampoules unidoses de NaCl 0,9 %. Cela ne permettait pas une simulation exacte puisque la préhension et le système d'ouverture sont très différents. En raison d'un problème de disponibilité des ampoules de TSB, nous avons opté pour les tubes de TSB avec bouchon vissable comme alternative.

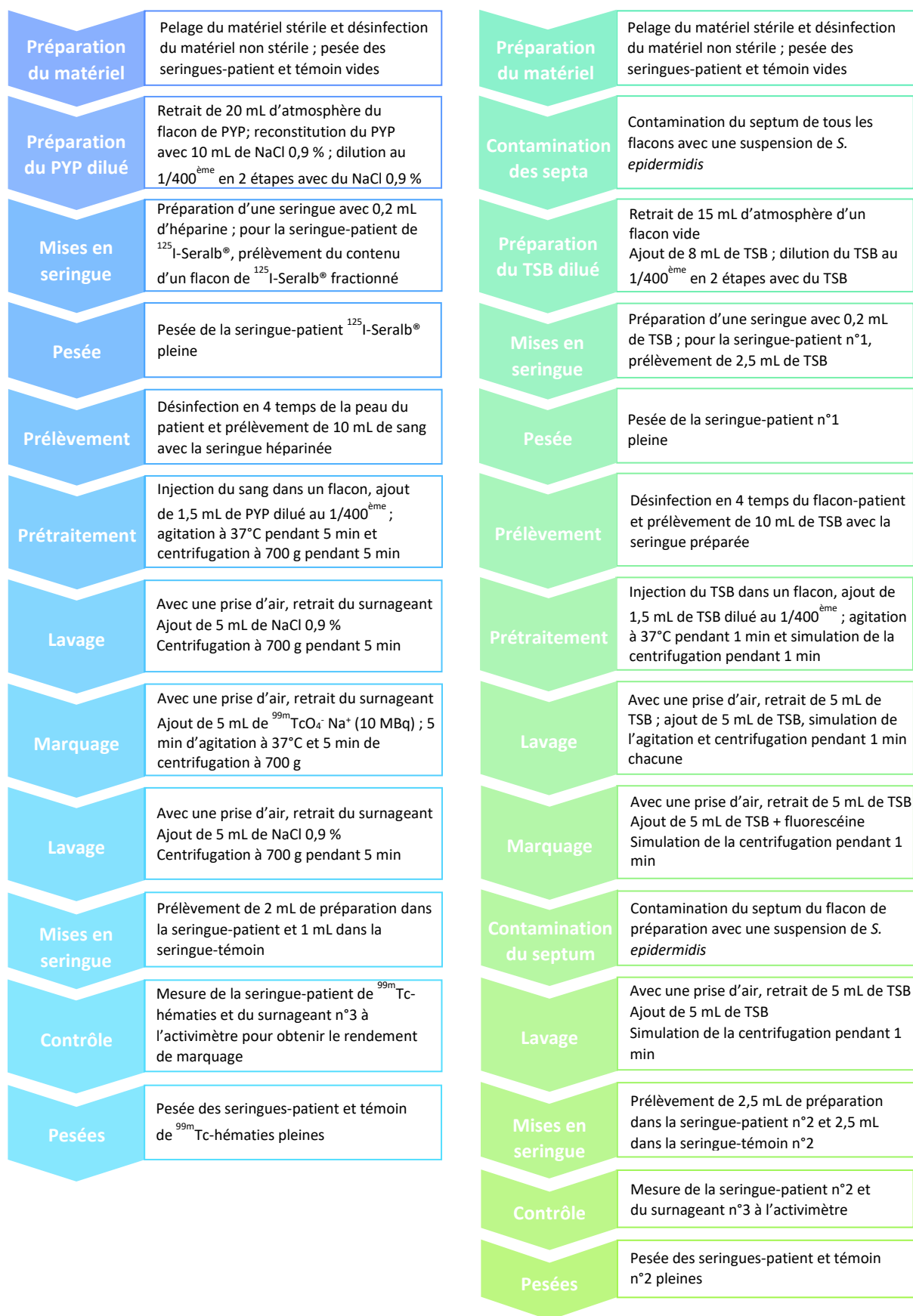


Figure 6 : comparaison du procédé de mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et de préparation des hématies radiomarquées au <sup>99m</sup>Tc avec le TRA

- **Maîtrise de l'environnement**

Lors de la réalisation de chaque TRA, il est recommandé d'effectuer une surveillance microbiologique de l'environnement (air, personnel et surfaces critiques) dans et autour des zones de forte activité. Cela permet de confirmer que la qualité environnementale requise pour la ZAC est maintenue (13,15,17,18,20) et d'aider à déterminer l'origine d'une éventuelle contamination des échantillons.

D'après les BPP, « il convient de veiller à ce que les opérations de validation n'entraînent aucun risque pour les préparations » (4,12). Des contrôles post-bionettoyage ont donc été réalisés, permettant ainsi de vérifier que l'environnement n'a pas été contaminé par *S. epidermidis*.

Pour cela, nous avons réalisé différents types de prélèvements au sein du local d'hématologie et de la HFL, mais aussi dans le local de préparation des MRP et au niveau du sas transmurale communiquant entre les deux.

Ces prélèvements sont regroupés dans les tableaux 6 et 7.

*Tableau 6 : prélèvements microbiologiques réalisés lors de chaque TRA*

Type de prélèvement	Matériel	Emplacement	Phase	TRA	
				N°1	N°2
Surface	Gélose contact	HFL	Avant manipulation	x	x
Contact			Après manipulation		x
Air	Gélose sédimentation	HFL	Pendant manipulation	x	x
		Local	Pendant manipulation	x	x
Gants		Empreintes des gants droit et gauche	Après manipulation	x	x

*Tableau 7 : prélèvements microbiologiques réalisés après chaque session de TRA*



Type de prélèvement	Matériel	Emplacement	Phase	TRA	
				N°1	N°2
Surface	Gélose contact	HFL	Après bionettoyage	x	x
		Bureau		x	x
		Paillasse hématologie 1		x	x
		Paillasse hématologie 2		x	x
		Sas transmurale		x	x
		Balance		x	x
		Poubelle		x	x
		Charriot		x	x
		Étuve			x
	Paillasse radiopharmacie			x	
Écouvillon	Centrifugeuse			x	

Ces prélèvements ont ensuite été envoyés au laboratoire d'hygiène hospitalière pour incubation et analyse.

Les critères d'acceptation ont été définis en se basant sur les limites de contamination microbiologique recommandées par les BPP (4). Celles-ci sont présentées dans le tableau 2.

#### b) Validation de la méthodologie des TRA

- **Fractionnement du TSB et test de stérilité**

Des flacons de TSB de différents volumes ont été nécessaires à la validation et réalisation des TRA :

- Des flacons de 9,6 mL de TSB + 0,4 mL de fluorescéine pour les tests de fertilité et pour mimer les flacons de <sup>125</sup>I-Seralb®
- Des flacons de 10 mL et 15 mL de TSB pour les tests de fertilité
- Des flacons de 15 mL de TSB pour mimer le patient prélevé
- Des flacons de 10 mL de TSB pour mimer les flacons d'héparine.

Des poches de 3 L de milieu TSB ont donc été fractionnées de manière aseptique (sous HFL de classe A) en :

- 55 flacons de 9,6 mL auxquels a été ajouté 0,4 mL de fluorescéine (2 mg)
- 30 flacons de 10 mL
- 25 flacons de 15 mL.

Ces flacons ont ensuite été incubés à 30°C pendant 14 jours. Un contrôle visuel a été effectué à J0, J3, J7, J14 afin de rechercher une éventuelle croissance microbiologique.

Concernant les tubes de TSB utilisés lors des TRA, un certificat d'analyse a été archivé.

- **Test de fertilité du TSB**

Le test de fertilité consiste à vérifier que le milieu de culture utilisé permet effectivement la croissance d'un large panel de souches microbiologiques.

Le chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne recommande de faire le test de fertilité avec six souches microbiologiques dont *Staphylococcus aureus*. Nous avons choisi de le remplacer par *Staphylococcus epidermidis* puisque nous avons ensuite utilisé cette souche pour contaminer les septums des flacons lors des TRA challengés.

De plus, *Clostridium sporogenes* n'a pas été retenu puisque c'est une bactérie anaérobie stricte et que le TSB ne permet pas sa croissance.

Selon les recommandations, chaque flacon et tube ont été ensemencés avec un maximum de 100 UFC (tableau 8).

Tableau 8 : souches et milieux de cultures utilisés pour le test de fertilité des TRA

Souche	Milieu de culture	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Flacon de 10 mL de TSB	Tubes de 10 mL de TSB
<i>Bacillus subtilis</i>	Flacon de 10 mL de TSB	
<i>Candida albicans</i>	Flacon de 15 mL de TSB	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flacon de 10 mL de TSB	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Flacon de 15 mL de TSB	

Les flacons et tubes ensemencés, ainsi que deux témoins négatifs (un flacon de 10 mL de TSB et un tube de 10 mL de TSB non ensemencés) ont ensuite été incubés à 30°C pendant trois jours pour les bactéries et pendant cinq jours pour les moisissures et levures. Un contrôle visuel quotidien a été effectué.

De plus, un certificat d'analyse mentionnant un test de fertilité a été conservé pour les tubes et les poches de TSB.

- **Test de fertilité du TSB + fluorescéine**

Nous nous sommes assurés que l'ajout de fluorescéine au TSB n'interférait pas avec la croissance microbiologique. Ce test a été réalisé sur les flacons de 9,6 mL de TSB + 0,4 mL de fluorescéine, soit à une concentration finale de 0,2 mg/mL correspondant à la concentration utilisée lors des TRA.

Comme pour le test de fertilité du TSB seul, cinq souches microbiologiques ont été utilisées et chacun des cinq flacons a été ensemencé avec un maximum de 100 UFC. Ce test a été réalisé en triplicat, conduisant donc à un total de 15 flacons ensemencés. Un témoin négatif de préparation finale non ensemencée a été ajouté et le test de fertilité du TSB seul, réalisé en parallèle, a servi de témoin positif. Tous les flacons ont ensuite été incubés à 30°C pendant cinq jours. Un contrôle visuel quotidien a été effectué.

## 2. RÉSULTATS

### Validation de la méthodologie des TRA

#### a) Reconditionnement du TSB ± fluorescéine et test de stérilité

Le certificat d'analyse des tubes de TSB utilisés atteste de leur stérilité. Après 14 jours d'incubation à 30°C, les 55 flacons de TSB ± fluorescéine reconditionnés n'ont pas montré de croissance microbiologique. Ils ont donc été considérés comme stériles et ont pu être utilisés pour la suite des TRA.

#### b) Test de fertilité du TSB

Les résultats du test de fertilité sur les flacons et tubes de TSB sont regroupés dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : résultats du test de fertilité du TSB seul

Souche	Quantité	Milieu de culture	Positivité
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	59,1 UFC (500 µL)	Flacon de 10 mL de TSB	J4
		Tube de 10 mL de TSB	J4
<i>Bacillus subtilis</i>	60,6 UFC (500 µL)	Flacon de 10 mL de TSB	J2
		Tube de 10 mL de TSB	J2
<i>Candida albicans</i>	64,6 UFC (500 µL)	Flacon de 15 mL de TSB	J3
		Tube de 10 mL de TSB	J3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60,7 UFC (500 µL)	Flacon de 10 mL de TSB	J2
		Tube de 10 mL de TSB	J2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	60,6 UFC (500 µL)	Flacon de 15 mL de TSB	J2
		Tube de 10 mL de TSB	J2

Pour chaque souche, un flacon de TSB reconditionné et un tube de TSB ont étéensemencés avec un nombre d'UFC compris entre 59 et 65. Une turbidité due à une croissance microbiologique a pu être observée au bout de deux jours d'incubation pour les trois bactéries, à J3 pour *C. albicans* et à J4 pour *A. brasiliensis*. Les témoins négatifs sont restés limpides pendant les cinq jours d'incubation.

#### c) Test de fertilité du TSB + fluorescéine

Les résultats du test de fertilité sur les flacons de TSB + fluorescéine sont récapitulés dans le tableau 10 suivant.

Tableau 10 : résultats du test de fertilité du TSB + fluorescéine

Souche	Quantité	Milieu de culture	Positivité
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	59,1 UFC (500 µL)	Flacon de 9,6 mL de TSB + 0,4 mL de fluorescéine	J4
<i>Bacillus subtilis</i>	60,6 UFC (500 µL)		J3
<i>Candida albicans</i>	64,6 UFC (500 µL)		J4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60,7 UFC (500 µL)		J3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	60,6 UFC (500 µL)		J2

Pour chaque souche, un flacon de 9,6 mL de TSB + 0,4 mL de fluorescéine a étéensemencé avec un nombre d'UFC compris entre 59 et 65, en triplicat. Une turbidité due à une croissance microbiologique a pu être observée au bout de deux jours d'incubation pour *S. epidermidis*, à J3 pour *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, et à J4 pour *C. albicans* et *A. brasiliensis*. Les témoins négatifs sont restés limpides pendant les cinq jours d'incubation.

### III. VALIDATION DE L'ASEPSIE DES PROCÉDÉS DE PRÉPARATION REQUIS POUR LA MESURE DES VOLUMES SANGUINS

---

#### 1. MÉTHODE

La validation initiale d'un procédé de préparation aseptique nécessite trois TRA consécutifs conformes (11,13,22). Pour chaque TRA (n° 1 et n°2), nous avons donc décidé de réaliser trois tests en respectant les règles de manipulation aseptique (TRA « propres ») et trois tests en ne les respectant pas (TRA « témoins »), servant de témoins positifs (désinfection des septums incorrecte ; septums, aiguilles et extrémité des seringues touchés). Les échantillons ont été incubés à 30°C pendant 14 jours et visuellement contrôlés quotidiennement.

#### 2. RÉSULTATS

#### A. 1<sup>ère</sup> partie : TRA du procédé de fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®

Les échantillons issus des trois TRA « propres » sont restés limpides pendant les 14 jours d'incubation, alors que ceux issus des trois TRA « témoins » se sont positivés entre J4 et J7.

Une exception a été constatée pour les trois seringues témoins de « <sup>125</sup>I-Seralb® » issues des TRA « témoins ». En effet, aucune croissance microbologique n'a pu être observée.

L'utilisation de fluorescéine a permis de mettre en évidence une contamination « radioactive » lors de deux TRA, (un « propre » et un « témoin ») au niveau du gant gauche, d'une compresse et du champ (figure 7).



Figure 7 : photo d'une contamination « radioactive » mise en évidence par la fluorescéine lors d'un TRA n°1 « témoin »

#### B. 2<sup>ème</sup> partie : TRA du procédé de mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et de marquage radioisotopique des hématies au <sup>99m</sup>Tc

Les échantillons issus des trois TRA « propres » sont restés limpides pendant les 14 jours d'incubation, alors que tous ceux issus des trois TRA « témoins » se sont positivés entre J3 et J4.

L'utilisation de la fluorescéine a permis de mettre en évidence une contamination « radioactive » lors de trois TRA, (un « propre » et deux « témoins ») au niveau du gant gauche, d'une compresse et du champ.

#### C. Maîtrise de l'environnement

L'empreinte du gant gauche a permis de mettre en évidence une contamination par *S. epidermidis* lors de deux TRA « témoins ».

Tous les autres résultats des prélèvements d'hygiène environnementaux étaient inférieurs aux limites de contamination microbologique recommandées par les BPP, et donc conformes.

### **IV. HABILITATION DES OPÉRATEURS**

---

## 1. MÉTHODE

Dans le cadre de l'habilitation des opérateurs, les TRA précédemment développés ont été appliqués. D'après les recommandations, un opérateur doit réaliser trois TRA consécutifs conformes pour pouvoir être initialement habilité sur un procédé (18,19,21,22).

Les opérateurs ont donc effectué trois TRA n°1 (fractionnement du  $^{125}\text{I}$ -Seralb®) et trois TRA°2 (mise en seringue du  $^{125}\text{I}$ -Seralb® et le marquage radioisotopique des hématies au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).

Si pour chaque procédé, les trois TRA étaient conformes, cette partie de l'habilitation était validée. En revanche, si l'un des trois TRA n'était pas conforme, les activités de l'opérateur concernant la mesure des volumes sanguins étaient suspendues et le nombre de TRA manquants pour arriver à un total de trois TRA consécutifs conformes était de nouveau effectué. Suite à ce deuxième essai, si trois TRA consécutifs conformes étaient obtenus, cette partie de l'habilitation était validée. Mais si ce n'était pas le cas, il a été décidé que l'opérateur soit non habilité (annexe 7).

## 2. RÉSULTATS

Deux des quatre opérateurs (n°1 et 2) ont effectué trois fois les deux TRA.

Pour chaque opérateur, tous les échantillons issus des trois TRA n°1 et des trois TRA n°2 sont restés limpides au cours des 14 jours d'incubation.

Tous les prélèvements environnementaux sont revenus conformes du service d'hygiène hospitalière sauf deux prélèvements réalisés lors du deuxième TRA n°1 de l'opérateur n°1 : l'empreinte du gant droit a mis en évidence la présence de *S. epidermidis* et la gélose sédimentation de la paillasse qui a permis la croissance de 120 UFC de *Micrococcus luteus*.

L'évaluation de la contamination « radioactive » grâce à la fluorescéine a mis évidence des contaminations sur le gant gauche, des compresses et des pots plombés lors du premier TRA n°1 de l'opérateur n°1. Concernant les TRA n°2, des contaminations ont aussi été retrouvées sur un flacon de «  $^{125}\text{I}$ -Seralb® », sur la manche droite de la casaque stérile et le gant droit lors des TRA n°2 de l'opérateur n°1 et sur le champ lors du deuxième TRA n°2 de l'opérateur n°2.

## V. DISCUSSION

---

Les tests de fertilité du TSB seul et du TSB + fluorescéine ont été réussis selon les critères du chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne, puisqu'une croissance microbiologique a été détectée au cours des trois jours d'incubation pour toutes les bactéries et au cours des cinq jours d'incubation pour les fungi (28).

Les tests de fertilité ont montré que les bouillons TSB ± fluorescéine permettaient bien la croissance d'un large panel de microorganismes. Ils ont mis en évidence l'absence d'effet inhibiteur de la fluorescéine sur la croissance des germes. La méthode des TRA a donc été validée.

Il est cependant important de souligner que le nombre d'UFC inoculées lors des tests de fertilité a été obtenu par calcul et que le dénombrement exact des microorganismes dans les suspensions utilisées n'a pas été effectué. Néanmoins, les flacons et tubes de TSB avec et sans fluorescéine ont étéensemencés avec une quantité de germes suffisamment basse (environ 60 UFC) pour ne pas dépasser la limite des 100 UFC recommandée par la Pharmacopée Européenne.

Lors de la validation de l'asepsie des procédés, pour le TRA n°1, les seringues-témoins de « <sup>125</sup>I-Seralb® » ont été préparées avec 0,5 mL de TSB dans des seringues de 1 mL. Mais aucune turbidité n'a pu être observée pour les trois seringues issues des TRA « témoins ». Cette limpidité apparente a pu être induite par un trop faible volume prélevé ou par les seringues de 1 mL qui n'étaient pas adaptées pour mettre en évidence une turbidité à l'œil nu. Afin de lever le doute sur ces résultats, nous aurions pu filtrer ces échantillons visiblement limpides et mettre les filtres à incuber sur gélose. Cela n'a pas été réalisé mais pourra faire l'objet d'études de consolidation. Nous avons donc choisi d'exclure la seringue-témoin de « <sup>125</sup>I-Seralb® » des TRA n°1 puisqu'en pratique, elle n'est pas destinée au patient et ne nécessite donc pas d'être stérile. De plus, il s'agissait de la dernière étape du TRA et n'aurait donc pas apporté d'information en cas de positivité des échantillons réalisés en amont. Cela nous a aussi incités à adapter les volumes prélevés et à utiliser des seringues de plus grande contenance pour le TRA n°2, puis lors de l'habilitation des opérateurs.

Les échantillons issus des trois TRA « propres » sont restés négatifs, alors que ceux issus des trois TRA « témoins » se sont positivés. Cela démontre que, grâce à la contamination intentionnelle des septums des flacons utilisés avec une suspension de *S. epidermidis*, la sensibilité des TRA a bien été améliorée. Cela permet donc de mettre en évidence les fautes d'asepsies pouvant potentiellement être commises lors des TRA.

Par ailleurs, les contaminations « radioactives » mises en évidence grâce à la fluorescéine ont été provoquées par des problèmes de surpression dans les flacons de « préparation ». Dans un objectif d'amélioration continue, cela nous a amenés à remettre en question notre mode opératoire et à l'adapter. À présent, lors de l'ajout de réactifs dans le flacon, un volume équivalent d'air est ensuite retiré, notamment lors de l'étape de marquage des hématies au <sup>99m</sup>Tc.

Les prélèvements d'hygiène environnementaux post-bionettoyage sont revenus conformes aux limites de contamination microbiologique recommandées par les BPP du service d'hygiène hospitalière. Cela nous a permis de reprendre une activité de routine normale dans le local de marquage cellulaire radioisotopique, sans engendrer de risque pour les patients suivants.

Nous étions en lien étroit avec le service d'hygiène hospitalière qui a pu nous fournir des résultats anticipés, notamment pour la HFL, afin qu'elle puisse être réutilisée pour les activités de routine.

L'asepsie des procédés de fractionnement du  $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup>, de la mise en seringue du  $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup> et du marquage radioisotopique des hématies au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a pu être validée puisque trois TRA consécutifs sont revenus conformes pour chacun des procédés.

Néanmoins, il est nécessaire de garder à l'esprit que les TRA ne permettent d'obtenir qu'un aperçu momentané de l'asepsie des procédés et qu'ils ne permettent pas de garantir que la préparation finale répondra continuellement aux exigences microbiologiques requises (21).

Deux opérateurs (n°1 et 2) ont pu valider une partie de leur habilitation pour la mesure isotopique des volumes sanguins, puisque leurs trois TRA n°1 et n°2 étaient conformes.

La contamination d'un des prélèvements environnementaux par *Micrococcus luteus* lors d'un des TRA n°1 est assez difficile à interpréter. En effet, cette bactérie fait partie de la flore environnementale banale. L'origine de cette contamination peut donc être multiple. Mais cela n'a pas eu d'impact sur le bon déroulement du TRA.

À l'avenir, les TRA seront répétés tous les ans dans le cadre de l'habilitation périodique des opérateurs.





## TROISIÈME PARTIE

### DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION D'UN ESSAI DE STÉRILITÉ



## I. ENQUÊTE NATIONALE

---

L'enquête nationale précédemment évoquée pour les tests de remplissage aseptique a aussi permis de faire un état des lieux sur la réalisation des essais de stérilité en radiopharmacie. Dans le Google Form® diffusé, 12 questions portaient sur les essais de stérilité.

Il en ressort que 64 % (23) des unités radiopharmaceutiques réalisent des essais de stérilité sur leurs MRP. Ils sont effectués à une fréquence variable, allant de ponctuelle à quotidienne. Concernant le délai entre la préparation des MRP et la réalisation des essais de stérilité, 52 % (12) des unités les effectuent le même jour alors que 44 % (10) les réalisent de manière différée, et 4 % (1) font les deux. Parmi les différents centres, 74 % (17) réalisent leurs essais de stérilité selon une méthode classique (ensemencement direct ou filtration sur membrane) et 9 % (2) selon une méthode alternative rapide. La méthode des essais de stérilité a été validée dans 30 % (7) des cas.

Par ailleurs, sur les 25 unités de radiopharmacie qui font des marquages cellulaires radioisotopiques, 8% (2) effectuent des essais de stérilité sur les préparations cellulaires radiomarquées. Ces essais de stérilité sont réalisés systématiquement, le même jour que la préparation, selon une méthode classique. Parmi les 2 unités qui réalisent des essais de stérilité sur les marquages cellulaires, 50 % (1) ont validé leur méthode.

Cette enquête montre que très peu d'unités de radiopharmacie réalisent des essais de stérilité pour les MCR. Cela souligne l'importance de développer des outils adaptés, afin de pouvoir contrôler la stérilité de ces préparations, et éventuellement de compléter la validation de l'asepsie des procédés de préparation et l'habilitation des opérateurs impliqués.

## II. DÉVELOPPEMENT D'UN ESSAI DE STÉRILITÉ POUR LA PRÉPARATION D'<sup>99m</sup>Tc-HÉMATIES

---

### 1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### A. Matériel

Le tableau 11 ci-dessous récapitule le matériel spécifique utilisé lors de la validation et de l'application des essais de stérilité.

Tableau 11 : matériel utilisé pour les essais de stérilité

Milieu de culture	Fabricant	Numéro de lot	Péremption
Hémoculture BACT/ALERT® PF Plus pédiatrique	Biomérieux	0004054746	07/11/2020

Système de détection automatisé	Fabricant
BACT/ALERT® VIRTUO®	Biomérieux, Craponne, France

Souche	Fabricant	Numéro de lot	Péremption
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Eurofins	3010111-A1829-3581	26/09/2020
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		3020101-A2030-3745	12/03/2022
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		3030111-A1829-3569	05/09/2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		3070101-A2025-3748	23/03/2021
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228		3100201-A1930 3742	20/02/2021

Tous les autres consommables utilisés lors des essais de stérilité et de leur validation (flacons, seringues, aiguilles, ...) étaient identiques à ceux utilisés en routine.

## B. Méthode

### a) Mise au point du protocole de l'essai de stérilité

La décroissance radioactive, ainsi que la durée limitée du marquage et de la viabilité cellulaire ne permettent pas de différer l'injection des préparations d'hématies radiomarquées au  $^{99m}\text{Tc}$ . En effet, la période radioactive du  $^{99m}\text{Tc}$  étant de 6,007 heures (9), l'activité disponible pour l'injection aura diminué de moitié au bout de cette période. De plus, le marquage des hématies par le  $^{99m}\text{Tc}$  manque de stabilité puisqu'il existe une élution du  $^{99m}\text{Tc}$  fixé aux hématies de 4 à 10 % par heure (39). L'essai de stérilité n'est donc pas un contrôle libératoire, ce qui est admis dans le chapitre relatif à la préparation extemporanée des médicaments radiopharmaceutiques de la Pharmacopée Européenne.

Le chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne décrit l'essai de stérilité couramment appliqué en pharmacotechnie hospitalière (28). Cependant, en regard des spécificités de notre préparation, il n'est pas approprié pour plusieurs raisons :

- Du fait de la composition cellulaire de notre préparation, la méthode par filtration sur membrane n'est pas réalisable.
- La méthode par ensemencement direct n'est pas optimale puisque la présence de sang dans notre préparation entraînerait une turbidité du milieu empêchant la lecture de l'échantillon.

- Pour les préparations dont le volume final est compris entre 1 et 40 mL, la quantité minimale de préparation à utiliser pour chaque milieu doit correspondre à la moitié du contenu de chaque récipient. Il faudrait donc dédier une préparation à l'essai de stérilité.
- De plus, pour un lot dont le nombre d'unités produites est inférieur ou égal à 100, au moins 10 % du nombre de récipients doivent être examinés par milieu, avec un minimum de 4. Cette exigence n'est pas applicable puisque dans notre cas, un lot ne comporte qu'une unité.

Un référentiel plus adéquat a donc été recherché. Le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne portant sur le contrôle microbiologique des produits cellulaires tient compte des caractéristiques et des limites de ces produits (durée de conservation et quantités disponibles) et répond à nos problématiques en apportant des précisions :

- L'échantillon contrôlé doit être représentatif de tous les composants du produit cellulaire. En effet, des contaminants microbiens peuvent se trouver à la surface ou à l'intérieur des cellules, et peuvent ne pas être détectés si seuls des surnageants sont analysés.
- Lorsque le volume total du produit cellulaire est compris entre 1 et 10 mL, le volume total de l'inoculum doit être de 100 µL, ce qui est plus adapté à notre cas, puisque le volume d'une préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies varie entre 7 et 10 mL.
- La composition du produit cellulaire peut physiquement entraver certaines méthodes d'essai (par exemple, en cas de turbidité du milieu de culture après addition de l'échantillon). Des méthodes automatisées fondées sur la croissance peuvent alors être appliquées (40).

Celles-ci sont détaillées dans le chapitre 5.1.6 de la Pharmacopée Européenne portant sur les méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique. Parmi celles-ci, on retrouve la mesure de la consommation ou de production d'un gaz. C'est une méthode qualitative. Le principe est le suivant : les microorganismes peuvent être cultivés en récipient clos, avec un suivi continu et automatisé mesurant la production ou la consommation de gaz comme marqueurs indirects d'une croissance microbiologique. La production de métabolites ou l'épuisement d'éléments nutritifs peuvent entraîner des changements qui vont être mesurés directement ou indirectement au moyen de marqueurs colorimétriques introduits dans le milieu de culture (29).

Le dispositif BACT/ALERT® composé de flacons d'hémoculture et d'un automate de détection utilise cette méthode et a été choisi pour développer notre essai de stérilité. En effet, les microorganismes présents dans le milieu produisent du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) lors de leur phase de croissance. Le CO<sub>2</sub> produit une diminution du pH du milieu de culture. Ce changement de pH induit le virage colorimétrique irréversible d'un indicateur déposé au fond de chaque flacon. Toutes les 10 minutes, une diode électroluminescente envoie un faisceau lumineux sur l'indicateur et une photodiode collecte l'intensité de lumière réfléchiée par l'indicateur (figure 8). Cette intensité sera alors analysée grâce à trois algorithmes (41).



Figure 8 : photos du système BACT/ALERT® et principe de détection

Des flacons BACT/ALERT® pédiatriques ont été choisis comme milieu de culture puisqu'ils requièrent un volume de préparation moindre et qu'ils permettent de diviser par deux le nombre de flacons envoyés dans le service de bactériologie (42). Ils permettent la détection des microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs.

Bien que le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne nous autorise à utiliser un volume d'inoculum de 100  $\mu$ L, le volume de notre préparation était suffisant pour nous permettre d'avoir un échantillon de 1 mL.

Des échantillons de 1 mL d' $^{99m}\text{Tc}$ -hématies ont donc été ajoutés aux flacons d'hémoculture BACT/ALERT® immédiatement après leur réalisation. Afin d'éviter l'apparition de faux positifs, cela a été effectué dans une HFL de classe A, avec du matériel stérile ou désinfecté et en respectant les règles de manipulation aseptique.

Idéalement, nous aurions souhaité envoyer les flacons pour mise en incubation dans l'automate directement après leur ensemencement. Cependant, afin de minimiser la radioactivité contenue dans les flacons, une période de décroissance radioactive dans le service de médecine nucléaire a dû être intégrée dans notre protocole. En accord avec le service de bactériologie, celle-ci a été initialement fixée à 48 heures (temps nécessaire pour que la radioactivité détectée soit inférieure à deux fois le bruit de fond) (figure 9). Après enregistrement informatique des flacons, ceux-ci devaient être incubés cinq jours dans l'automate BACT/ALERT®. Si une croissance microbiologique était détectée, une identification était effectuée afin de déterminer le germe à l'origine de cette contamination et d'évaluer sa pathogénicité.

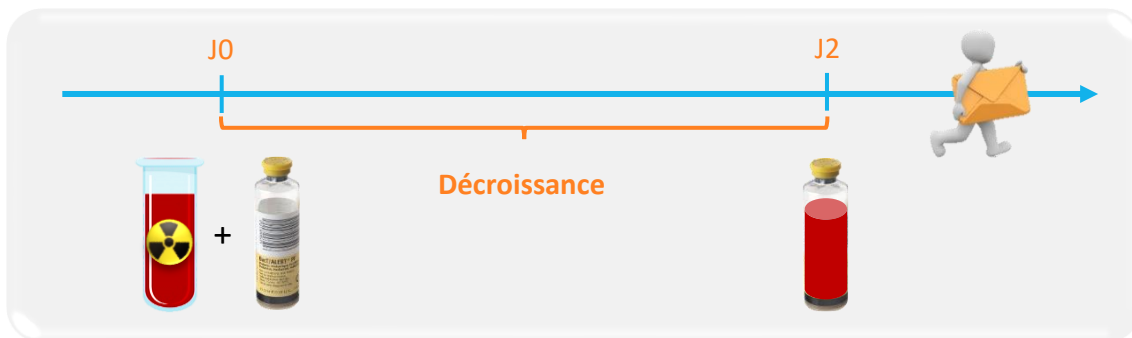


Figure 9 : schéma de la gestion de la radioactivité des échantillons des essais de stérilité avant envoi en bactériologie

### b) Validation de la méthodologie de l'essai de stérilité

D'après les chapitres 5.1.6 et 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne, les critères de validation applicables aux essais qualitatifs sont les suivants : spécificité, sensibilité, applicabilité, limite de détection, reproductibilité, robustesse, exactitude et équivalence (29,40).

- **Test de stérilité**

Le certificat d'analyse des flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques utilisés a été conservé.

- **Test de fertilité**

Ce test permet de vérifier que les flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques utilisés permettent la croissance d'un large panel de souches microbiologiques.

Le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne recommande de faire le test de fertilité avec une souche microbiologique de plus que le chapitre 2.6.1 précédemment évoqué. Cependant, pour des raisons financières, nous avons utilisé les cinq mêmes souches que pour le test de fertilité du milieu TSB employé pour le TRA (*A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*). *C. sporogenes* n'a pas été retenu puisque c'est une bactérie anaérobie stricte et que les flacons d'hémoculture pédiatriques ne permettent pas sa croissance.

Selon les recommandations, après reconstitution et dilution des suspensions microbiennes, chaque flacon a été ensemencé avec un maximum de 100 UFC (tableau 12).

Tableau 12 : souches et milieu de culture utilisés pour les tests de fertilité et d'applicabilité

Souche	Milieu de culture
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Flacon d'hémoculture BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	



Après une période de stockage de 48 heures dans le service de médecine nucléaire, l'absence de changement de couleur de l'indicateur colorimétrique des flacons d'hémoculture a été contrôlée visuellement. Les flacons ensemencés ainsi qu'un témoin négatif ont ensuite été envoyés dans le service de bactériologie et mis à incuber dans l'automate BACT/ALERT® à 35°C pendant cinq jours pour les bactéries et les fungi (figure 10). Suite à la positivité des flacons, une coloration de Gram a été effectuée.

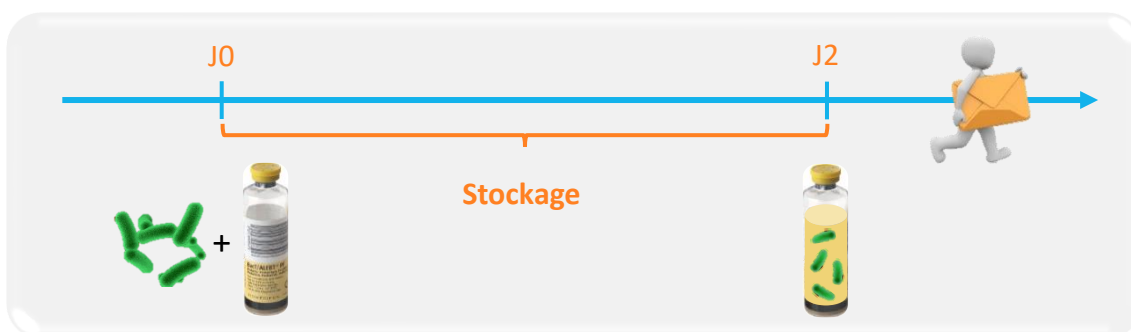


Figure 10 : schéma de la gestion des échantillons du test de fertilité avant envoi en bactériologie

Le test de fertilité couvre convenablement la spécificité des méthodes qualitatives utilisant la croissance pour démontrer la présence/absence de microorganismes. La spécificité est décrite comme la « capacité à détecter exclusivement les microorganismes recherchés, c'est-à-dire à ne pas générer de résultats faussement positifs » (29).

- **Test d'applicabilité ou recherche d'effet inhibiteur**

Le test d'applicabilité permet de démontrer que la préparation d'hématies radiomarquées n'interfère pas avec le système d'essai, en termes de capacité de détection ou de recouvrement microbien. Cela concerne la capacité de la méthode à détecter les microorganismes en présence de la matrice de l'échantillon et l'absence d'interférence de la matrice de l'échantillon avec le système alternatif (par inhibition d'une réaction chimique par exemple) (29).

Le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne recommande de faire le test d'applicabilité avec trois souches microbiologiques de plus que le chapitre 2.6.1 (40). Cependant, comme pour le test de fertilité, nous avons utilisé cinq souches préconisées par le chapitre 2.6.1 en excluant *C. sporogenes* et en remplaçant *S. aureus* par *S. epidermidis*.

Une fois les hématies radiomarquées, 1 mL de préparation a immédiatement été transféré dans les flacons BACT/ALERT® dans des conditions aseptiques. Puis, après reconstitution et dilution des suspensions microbiennes, les flacons ont été ensemencés avec un maximum de 100 UFC et en triplicat afin de s'assurer de la reproductibilité du test. Un témoin négatif non ensemencé pour chaque préparation a été ajouté et le test de fertilité décrit ci-dessus a été effectué en parallèle et

a servi de témoin positif. Les flacons obtenus ont ensuite été stockés pour 48 heures de décroissance radioactive (figure 11).

Après avoir visuellement contrôlé l'absence de changement de couleur de leur indicateur colorimétrique, les flacons ont ensuite été envoyés en bactériologie pour être mis en incubation dans l'automate BACT/ALERT® à 35°C. Suite à la positivité des échantillons, une coloration de Gram a été effectuée.



Figure 11 : schéma de la gestion de la radioactivité des échantillons du test d'applicabilité avant envoi en bactériologie

- **Limite de détection**

D'après le chapitre 5.1.6 de la Pharmacopée Européenne, la limite de détection d'une méthode qualitative alternative est définie comme étant « le plus petit nombre de microorganismes qui peut être détecté dans les conditions analytiques indiquées ». Elle « sert à déterminer la présence/absence de microorganismes dans une quantité définie d'échantillon » et « reflète le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon initial, avant toute dilution ou incubation ». De plus, il est nécessaire de s'appuyer sur plusieurs déterminations indépendantes et sur un nombre de réplicats suffisant (29).

Pour des raisons financières, de disponibilité de l'automate BACT/ALERT®, mais aussi du fait du nombre limité de préparations, nous avons dû trouver un compromis. À l'instar de ce qui a été effectué par É. Quatremare, nous avons choisi de réaliser six séries avec cinq concentrations différentes de *S. epidermidis* (10, 5, 1, 0,75 et 0,5 UFC/mL), soit 30 flacons BACT/ALERT® (avec un témoin négatif pour chaque préparation). La limite de détection correspondait au plus petit inoculum pour lequel un résultat positif était obtenu avec les six séries (43).

Lors de la recherche de la limite de détection, le dénombrement des microorganismes présents dans la suspension utilisée pour l'inoculation a été effectué par ensemencement sur gélose chocolat pour les concentrations cibles de 0,75 et 0,5 UFC/mL de préparation.

- **Exactitude**

L'exactitude de la méthode alternative qualitative a été évaluée par le pourcentage de faux négatifs obtenus pour les deux concentrations (0,75 et 0,5 UFC/mL) immédiatement inférieures à la limite de détection. Elle n'a été estimée que pour *S. epidermidis*.

- **Robustesse**

D'après la Pharmacopée Européenne, « la robustesse d'une méthode qualitative est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de paramètres associés à la méthode. Si l'utilisateur apporte des modifications à certains paramètres critiques, il doit en évaluer l'effet éventuel sur la robustesse » (29). Dans notre cas, le délai de 48 heures entre l'ensemencement des flacons BACT/ALERT® et la mise en incubation dans l'automate ne correspond pas aux paramètres d'utilisation définis par le fabricant. La robustesse a donc été évaluée en faisant varier ce délai pour *P. aeruginosa* qui nous a posé le plus de difficultés en termes de faux négatifs.

## 2. RÉSULTATS

### A. Validation de la méthodologie de l'essai de stérilité

#### a) Test de stérilité

Le certificat de conformité des flacons BACT/ALERT® utilisés atteste de leur stérilité.

#### b) Test de fertilité

Pour chaque souche, un flacon BACT/ALERT® a étéensemencé avec un nombre d'UFC compris entre 59 et 65. Pour une période de stockage de 49 heures et 45 minutes, la croissance de tous les microorganismes testés a été détectée au bout de 4,7 jours post-ensemencement pour *A. Brasiliensis*, entre 2,1 et 2,7 jours post-ensemencement pour *B. subtilis*, *C. albicans* et *S. epidermidis*, au bout de 2,1 jours post-ensemencement pour *P. aeruginosa*. Les germes ont pu être visualisés au microscope après une coloration de Gram, mis à part *A. brasiliensis* (figure 12). Aucune croissance microbiologique n'a été détectée pour le témoin négatif.

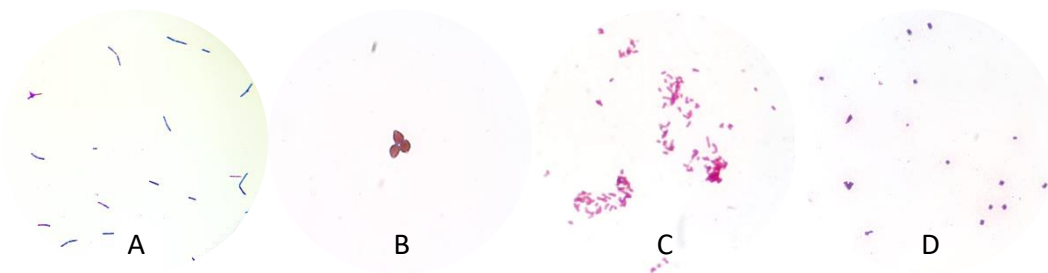


Figure 12 : photos des germes observés au microscope lors du test de fertilité (x 100)  
 A : *Bacillus subtilis*, B : *Candida albicans*, C : *Pseudomonas aeruginosa*, D : *Staphylococcus epidermidis*

Pour *P. aeruginosa*, deux autres tests de fertilité correspondant à des périodes de stockage réduites ont été réalisés car le test d'applicabilité a dû être répété pour cette bactérie en raison de résultats non satisfaisants.

Les résultats du test de fertilité des flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatrique sont récapitulés dans le tableau suivant (tableau 13).

Tableau 13 : résultats du test de fertilité des flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques

Souche	Période de stockage	Nombre de flacons détectés	Délai entre l'ensemencement et la positivité (jours)	Coloration de Gram
<i>A. brasiliensis</i>	49h45	3 sur 3	4,7	Microorganisme non visualisé
<i>B. subtilis</i>	49h45	3 sur 3	2,1	Bacilles Gram +
<i>C. albicans</i>	49h45	3 sur 3	2,3	Levures Gram +
<i>P. aeruginosa</i>	49h45	3 sur 3	2,1	Bacilles Gram -
<i>P. aeruginosa</i>	47h45	3 sur 3	2	Bacilles Gram -
<i>P. aeruginosa</i>	24h15	3 sur 3	1,3	Bacilles Gram -
<i>S. epidermidis</i>	49h45	3 sur 3	2,7	Cocci Gram +

### c) Test d'applicabilité ou recherche d'effet inhibiteur

Pour chaque souche, un flacon BACT/ALERT® a été ensemencé avec 1 mL de préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies et un nombre d'UFC compris entre 59 et 65, en triplicat. La croissance de tous les microorganismes testés a été détectée entre 4,2 et 5,1 jours post-ensemencement pour *A. Brasiliensis*, et entre 2,1 et 2,6 jours post-ensemencement pour *B. subtilis*, *C. albicans* et *S. epidermidis*. Les germes ont pu être visualisés au microscope après une coloration de Gram, mis à part *A. brasiliensis* (figure 13). Aucune croissance microbiologique n'a été détectée pour les témoins négatifs.

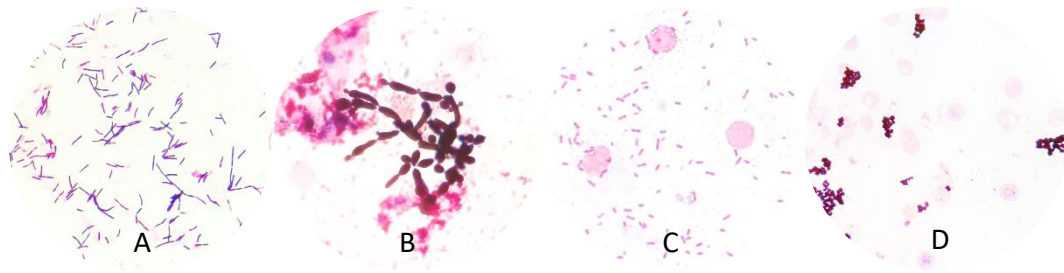


Figure 13 : photos des germes observés au microscope lors du test d'applicabilité (x 100)  
 A : *Bacillus subtilis*, B : *Candida albicans*, C : *Pseudomonas aeruginosa*, D : *Staphylococcus epidermidis*

Dans un flacon sur trois, la croissance de *P. aeruginosa* n'a pas été détectée par l'automate alors qu'après une coloration de Gram, de nombreux bacilles Gram - ont été retrouvés. Le test a donc été répété pour cette souche en réduisant le délai entre l'ensemencement des flacons et la mise en incubation à strictement 48 heures. Malgré cela, un faux négatif sur trois flacons a de nouveau été mis en évidence.

En effet, après vérification des enregistrements de l'automate de détection, une croissance microbiologique était clairement observable sur le graphique obtenu alors que le système ne s'était pas mis en alerte (figure 14). L'évolution de la croissance était comparable à celle d'une des hémocultures détectées. Les ingénieurs de Biomérieux ont été contactés à ce sujet.

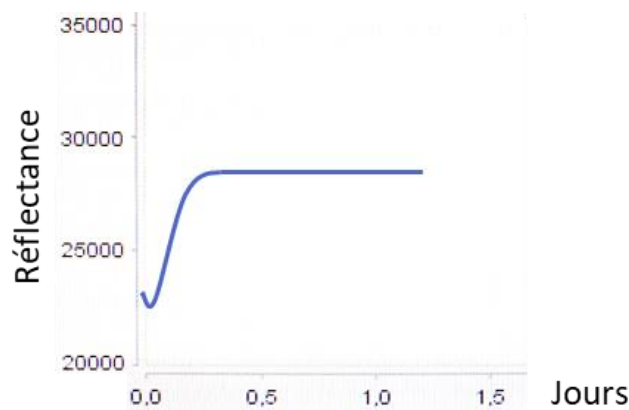


Figure 14 : graphique montrant l'évolution de la croissance microbiologique d'une hémoculture faussement négative

Afin d'éviter ce risque de faux négatif, une diminution du délai entre l'ensemencement des flacons et la mise en incubation dans l'automate nous a semblé indispensable. Nous avons donc réalisé une étude de poste dosimétrique dans le but de nous assurer que l'exposition du personnel non rattaché au service de médecine nucléaire était inférieure aux valeurs limites d'exposition définie pour le public. Cela concernait notamment le personnel enregistrant informatiquement les échantillons avant leur mise en incubation dans l'automate. Pour cela cinq flacons BACT/ALERT®

ensemencés avec 1 mL de préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies ont été mesurés au contact et à 30 cm grâce à un débitmètre, environ 23 heures après leur ensemencement.

Les résultats de l'étude dosimétrique sont récapitulés dans le tableau 14 suivant.

Tableau 14 : résultats de l'étude dosimétrique pour le personnel extérieur au service de médecine nucléaire

	1 flacon	15 flacons	Limite annuelle pour le public (44,45)
Dose efficace en Sievert (organisme entier)	0,03 µSv	0,45 µSv	1 mSv
Dose équivalente en Sievert (extrémités/peau)	0.17 µSv	2,55 µSv	50 mSv

Cette estimation a été réalisée en considérant une manipulation de 10 minutes par flacon.

L'exposition du personnel impliqué dans le projet mais extérieur au service de médecine nucléaire est donc bien inférieure aux valeurs limites définies pour le public.

Le test d'applicabilité a alors pu être répété pour *P. aeruginosa* en réduisant à 24 heures le délai entre l'ensemencement des flacons et leur mise en incubation. Cela a permis de détecter la croissance de *P. aeruginosa* dans les trois nouveaux flacons entre 1,3 et 1,4 jours post-ensemencement et de le visualiser au microscope après coloration de Gram (figure 13). Concernant ce dernier test, le dénombrement sur gélose de la suspension de *P. aeruginosa* utilisée a été effectué et a retrouvé 60 UFC/inoculum.

Les résultats du test d'applicabilité sont rapportés dans le tableau ci-dessous (tableau 15).

Tableau 15 : résultats du test d'applicabilité

Souche	Période de décroissance radioactive	Nombre de flacons détectés	Délai entre l'ensemencement et la positivité (jours)	Coloration de Gram
<i>A. brasiliensis</i>	49 h 45	3 sur 3	4,2 – 5,1	Microorganisme non visualisé
<i>B. subtilis</i>	49 h 45	3 sur 3	2,1	Bacilles Gram +
<i>C. albicans</i>	49 h 45	3 sur 3	2,3	Levures Gram +
<i>P. aeruginosa</i>	49 h 45	2 sur 3	2,1	Bacilles Gram -
<i>P. aeruginosa</i>	47 h 45	2 sur 3	2	Bacilles Gram -
<i>P. aeruginosa</i>	24 h 15	3 sur 3	1,3 – 1,4	Bacilles Gram -
<i>S. epidermidis</i>	49 h 45	3 sur 3	2,6	Cocci Gram +

#### d) Limite de détection

Les résultats de la recherche de la limite de détection sont décrits dans le tableau suivant (tableau 16).

Tableau 16 : résultats de la recherche de la limite de détection

Concentration en <i>S. epidermidis</i> dans la préparation (UFC/mL)	Nombre d'hémocultures positives
10	6
5	6
1	6
0,75	5
0,5	4

La croissance de *S. epidermidis* a été détectée dans les six flacons BACT/ALERT® pour les concentrations calculées de 10 et 5 UFC et 1 UFC/mL dans la préparation. Pour la concentration de 0,75 UFC/mL de préparation, cinq flacons sur six se sont positivés. Et pour la concentration de 0,5 UFC/mL de préparation, quatre flacons sur six se sont positivés. Les concentrations de 0,75 et 0,5 UFC ont été vérifiées grâce au dénombrement sur gélose.

La limite de détection a donc été estimée à 1 UFC/mL de préparation.

#### e) Exactitude

Le tableau 17 ci-dessous regroupe le pourcentage de faux négatifs calculé pour les différentes concentrations testées.

Tableau 17 : résultats de l'estimation de l'exactitude pour *S. epidermidis*

Inoculum (UFC/mL de préparation)	Nombre de tests positifs	Nombre de tests négatifs	Pourcentage de faux négatifs
1	6	0	0
0,75	5	1	16,7
0,5	4	2	33,3

Le pourcentage de faux négatifs était donc de 0 % pour 1 UFC/mL de préparation, de 16,7 % pour 0,75 UFC/mL de préparation, et de 33,3 % pour 0,5 UFC/mL de préparation pour *S. epidermidis*.

#### f) Robustesse

Les données des trois tests d'applicabilité et d'un test supplémentaire avec des flacons BACT/ALERT® ensemencés avec 1 mL de préparation et environ 60 UFC de *P. aeruginosa* ont été utilisées pour évaluer la robustesse de notre méthode. Les résultats sont présentés dans le tableau 18 ci-dessous.

Tableau 18 : résultats de l'évaluation de la robustesse

Durée de décroissance radioactive	Pourcentage de faux négatifs
52 h 10	100 %
49 h 45	33 %
47 h 45	33 %
24 h 15	0 %

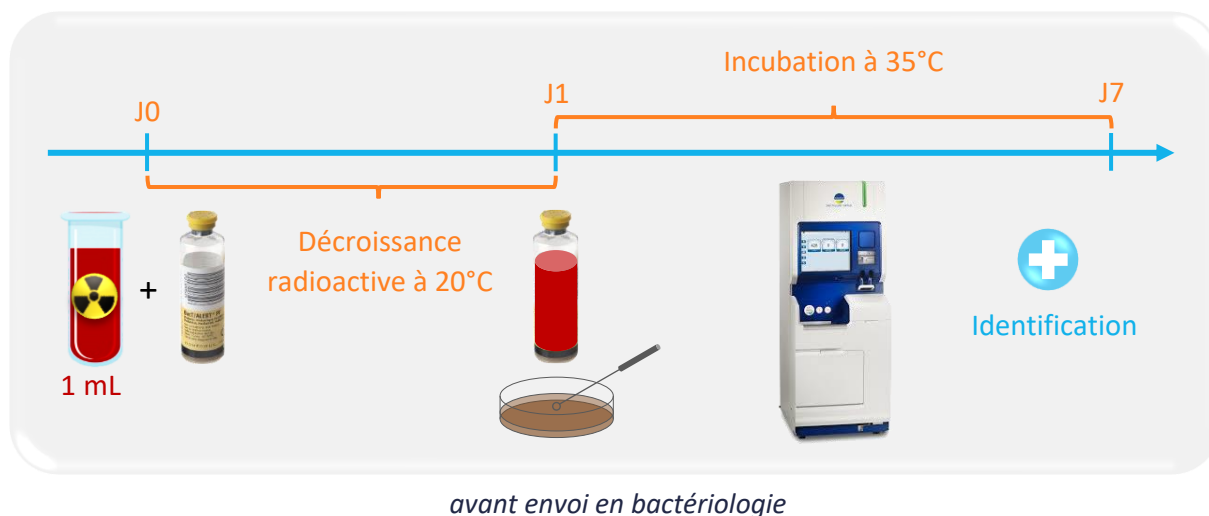
### B. Ajustement du protocole de l'essai de stérilité

Les résultats des tests d'applicabilité et de l'évaluation de la robustesse ont permis d'adapter le protocole établi pour l'essai de stérilité.

La période de décroissance radioactive a ainsi été ajustée à 24 heures et la durée d'incubation dans l'automate a été fixée à six jours.

Afin de pallier au risque de faux négatifs induit par ce délai de décroissance radioactive, une gélose chocolat a été ensemencée à J1 avec un échantillon de l'hémoculture contenant la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies, en parallèle de chaque essai de stérilité (figure 15). Elle a ensuite été mise à incuber à 37°C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> pendant six jours, en médecine nucléaire.

Figure 15 : schéma de la gestion modifiée de la radioactivité des échantillons des essais de stérilité





Dans le cas où une croissance microbienne était observée sur la gélose, il était prévu qu'elle soit envoyée dans le service de bactériologie pour identification du microorganisme et que le statut de l'hémoculture correspondante soit contrôlé.

Si l'hémoculture était positive, une identification du microorganisme et une comparaison à celui identifié sur la gélose étaient prévues.

Si l'hémoculture était négative, l'évolution de la croissance microbiologique devait être contrôlée informatiquement avec les enregistrements de l'automate. Dans le cas où une croissance microbiologique non détectée pouvait être observée sur les enregistrements de l'automate, une recherche de microorganismes et une comparaison à celui identifié sur la gélose étaient prévues. Dans le cas où aucune croissance n'était observée sur les enregistrements de l'automate, une recherche de microorganisme dans l'hémoculture était prévue après les six jours d'incubation (figure 16).

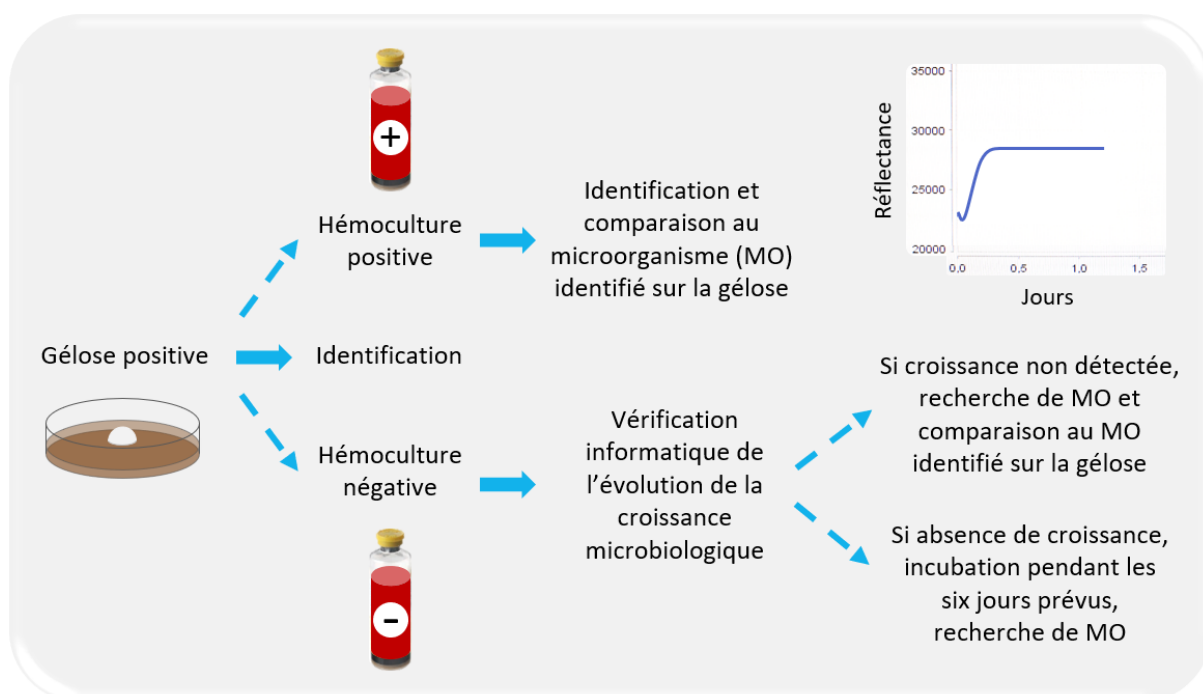


Figure 16 : schéma de la gestion de la positivité d'une gélose lors d'un essai de stérilité

### III. VALIDATION DE L'ASEPSIE DES PROCÉDÉS DE PRÉPARATION REQUIS POUR LA MESURE DES VOLUMES SANGUINS

#### 1. MÉTHODE

Afin de compléter la validation de l'asepsie de notre procédé de préparation d'hématies radiomarquées, trois essais de stérilité ont été réalisés sur des préparations d'<sup>99m</sup>Tc-hématies différentes.

Ils ont été effectués selon le protocole ajusté. En effet, pour chaque essai, 1 mL de préparation restante a été ajouté à un flacon BACT/ALERT®. Après une période de décroissance radioactive à température ambiante de 24 heures au sein du service de médecine nucléaire, une gélose chocolat a étéensemencée avec un échantillon de l'hémoculture contenant la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies. Le flacon d'hémoculture a ensuite été envoyé en bactériologie pour être incubé à 35°C dans l'automate BACT/ALERT® pendant six jours (figure 14).

## 2. RÉSULTATS

Aucune croissance microbiologique n'a été détectée dans les échantillons (hémocultures et géloses) issus des trois tests de stérilité, après un jour de décroissance radioactive et six jours d'incubation.

## IV. HABILITATION DES OPÉRATEURS

---

### 1. MÉTHODE

Dans le cadre de l'habilitation des opérateurs, l'essai de stérilité précédemment développé a été mis en œuvre. Pour chaque opérateur, l'habilitation pratique à la réalisation de la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies a été complétée en effectuant trois essais de stérilité sur des préparations différentes.

Si les trois essais étaient conformes, cette partie de l'habilitation était validée.

En revanche, si l'un des trois essais de stérilité n'était pas conforme, l'opérateur pouvait poursuivre ses activités concernant la mesure des volumes sanguins uniquement sous la supervision d'un radiopharmacien. Le nombre d'essais de stérilité manquants pour arriver à un total de trois essais consécutifs conformes était de nouveau effectué. Suite à cette deuxième tentative, si trois essais consécutifs conformes étaient obtenus, cette partie de l'habilitation était validée. Mais si ce n'était pas le cas, il a été décidé que l'opérateur soit non habilité (annexe 7).

### 2. RÉSULTATS

Pour trois opérateurs (n°1, 2 et 3), trois essais de stérilité ont pu être réalisés sur leurs préparations d'<sup>99m</sup>Tc-hématies.

Aucune croissance microbiologique n'a été détectée dans les échantillons (hémocultures et géloses) issus des neuf tests de stérilité.

## V. DISCUSSION

---

Le test de fertilité des flacons BACT/ALERT® s'est avéré conforme selon les critères du chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne, puisqu'une croissance microbiologique a été détectée au cours des sept jours post-ensemencement pour chaque microorganisme. Il a montré que les flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques permettaient bien la croissance d'un large panel de microorganismes.

Le test d'applicabilité a été réussi pour *A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans* et *S. epidermidis* puisqu'une croissance microbiologique a été détectée pour chaque microorganisme en présence de la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies.

Cependant, il est important de souligner que le nombre d'UFC inoculées lors des tests de fertilité et d'applicabilité a été obtenu par calcul et que le dénombrement exact des microorganismes dans les suspensions utilisées n'a pas été effectué, mis à part pour la suspension de *P. aeruginosa* qui a dû être testée à nouveau. Néanmoins, les flacons BACT/ALERT® ont été ensemencés avec une quantité de germes suffisamment basse (environ 60 UFC) pour ne pas dépasser la limite des 100 UFC recommandée par la Pharmacopée Européenne.

Lors des tests de fertilité et d'applicabilité, l'absence de visualisation d'*A. brasiliensis* au microscope, alors qu'une croissance a été détectée par l'automate, a sûrement été due à la forte sensibilité du système BACT/ALERT®. En effet, une faible croissance a été détectée et la probabilité de retrouver le microorganisme au microscope était donc assez faible. Le résultat a tout de même été accepté car aucun autre microorganisme n'a été retrouvé au microscope, ce qui exclut la contamination de l'échantillon par un autre microorganisme, et le témoin négatif est bien resté négatif.

L'applicabilité de notre méthode a été plus compliquée à valider pour *P. aeruginosa* puisque nous avons obtenu deux faux négatifs sur six flacons lors des deux séries réalisées.

Dans le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne, il est précisé que si les flacons ensemencés sont conservés pendant plus de 12 heures avant d'être placés dans le système automatisé, il y a un risque de faux négatif (40). La croissance non détectée de *P. aeruginosa* peut être expliquée par le délai de 48 heures de décroissance radioactive initialement prévu avant mise en place dans l'automate. Le cas peut se présenter quand des microorganismes à croissance rapide se trouvent dans des conditions optimales et commencent à proliférer pendant la période de conservation. L'indicateur colorimétrique du flacon BACT/ALERT® peut alors déjà avoir viré avant la mise en incubation dans l'automate, entraînant la non mise en alerte du système.

Nous avons alors décidé de répéter le test d'applicabilité pour *P. aeruginosa* en réduisant le délai de décroissance radioactive à 24 heures. Ces conditions ont finalement permis de valider le test d'applicabilité pour *P. aeruginosa*.

Les tests d'applicabilité ont donc mis en évidence l'absence d'effet inhibiteur de la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies sur la croissance des germes testés.

De plus, les résultats des tests d'applicabilité ont permis d'adapter le protocole établi pour l'essai de stérilité. La période de décroissance radioactive a ainsi été ajustée à 24 heures et la durée totale du test (période de décroissance radioactive + incubation dans l'automate) a été fixée à sept jours, comme recommandé dans le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne (40).

La méthode utilisée pour l'essai de stérilité répond aux critères de validation que sont la spécificité, la sensibilité, l'applicabilité, la limite de détection et la reproductibilité.

Pour un délai de 48 heures entre l'ensemencement des flacons BACT/ALERT® et la mise en incubation, nous pouvons dire que notre méthode manque de robustesse puisqu'il existe un risque de résultat faussement négatif. La robustesse s'améliore en réduisant ce délai à 24 heures. Par ailleurs, la Pharmacopée Européenne recommande de réaliser une subculture de chaque flacon ensemencé afin de détecter les faux négatifs (40). En parallèle de chaque essai de stérilité, il a donc été prévu qu'un double contrôle soit réalisé en ensemençant une gélose chocolat à J1 avec un échantillon de l'hémoculture ensemencée.

L'équivalence n'a pas pu être évaluée puisque nous ne disposons pas d'une méthode de référence à laquelle comparer notre méthode.

La méthode de l'essai de stérilité a donc été validée.

D'autre part, la limite de détection du système n'a été recherchée pour une seule souche microbienne. Elle a été estimée à 1 UFC/mL (et donc par flacon BACT/ALERT®) pour *S. epidermidis*, ce qui est légèrement inférieur aux valeurs retrouvées dans la littérature pour d'autres germes (46–48).

Il est important de rappeler que les flacons BACT/ALERT® PF Plus pédiatriques permettent uniquement la croissance des microorganismes aérobies ou anaérobies/aérobies facultatifs. La présence de microorganismes anaérobies stricts ne pourra donc pas être mise en évidence avec cet essai de stérilité. Ce choix a été fait en raison du faible volume de notre préparation. En concertation avec le service de bactériologie, nous avons préféré favoriser la sensibilité de la méthode.

Nous aurions souhaité pouvoir qualifier la matière première (sang du patient) grâce à un prélèvement initial sur hémoculture. En effet, si le patient présente une septicémie à son arrivée dans le service pour la mesure de ses volumes sanguins, cela peut entraîner un biais au niveau des résultats de l'essai de stérilité de la préparation finale d'<sup>99m</sup>Tc-hématies. Du fait de la loi Jardé, cela n'a pas pu être réalisé. Le prélèvement sanguin supplémentaire entre dans la catégorie n°2 des « recherches interventionnelles à risques et contraintes minimales » et l'appartenance à cette catégorie impose d'obtenir l'avis favorable d'un Comité de Protection des Personnes (49). Néanmoins, il est prévu qu'un entretien avec les patients soit réalisé au début de l'examen pour identifier des potentiels signes d'infection.

La stérilité de trois préparations d'<sup>99m</sup>Tc-hématies a pu être démontrée puisque tous les échantillons testés sont revenus négatifs. Cela nous a permis de compléter la validation de l'asepsie de notre méthode de marquage des hématies au <sup>99m</sup>Tc.

Trois opérateurs (n°1, 2 et 3) ont pu valider une partie de leur habilitation pour la mesure isotopique des volumes sanguins puisque pour chacun, la stérilité de trois préparations d'<sup>99m</sup>Tc-hématies a été démontrée. À l'avenir, l'essai de stérilité sera répété tous les ans dans le cadre de l'habilitation périodique des opérateurs.

## QUATRIÈME PARTIE

### DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION D'UNE ÉVALUATION DES CONNAISSANCES ET DES PRATIQUES



## I. ÉVALUATION DES CONNAISSANCES

---

### 1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Des formations théoriques et une évaluation des connaissances ont été intégrées au programme d'habilitation des opérateurs. Des supports de formation ont tout d'abord été créés ou adaptés, notamment aux nouvelles techniques de mesure des volumes sanguins, suite à l'arrêt de commercialisation du  $^{51}\text{Cr}$ . Ils portaient sur différents thèmes :

- L'hygiène en radiopharmacie, avec un focus sur les marquages cellulaires radioisotopiques
- La mesure des volumes sanguins
- La polyglobulie de Vaquez
- Les bonnes pratiques de pipetage.

Concernant les bonnes pratiques de pipetage, cette formation intervient dans le cadre d'une modification de la méthode de pipetage. En effet, suite à la mise en place de la mesure du volume plasmatique, des aliquots de 1 mL de plasma sont maintenant réalisés, après centrifugation des prélèvements sanguins. Dans ce cas, l'étape de prérinçage de la pointe utilisée ne peut pas être appliquée puisque cela entraînerait la remise en suspension du culot. Cependant, l'absence de prérinçage de la pointe peut induire un biais au niveau du volume prélevé et donc au niveau des résultats. Nous avons alors remplacé la méthode de pipetage directe par la méthode inverse, pour laquelle un prérinçage de la pointe n'est pas nécessaire.

Pour chaque opérateur et chaque sujet, l'habilitation théorique se déroulait en trois temps :

- Une évaluation initiale orale (pré-formation) permettant de faire un état des lieux des connaissances de base,
- Une formation sur le sujet,
- Puis une évaluation finale écrite (post-formation) comparée à l'évaluation initiale.

Ces évaluations avaient une visée formative. Un seuil de réussite a été fixé à 75 %, cependant, il n'était pas limitatif. En cas de résultat inférieur à 75 %, la formation était simplement renouvelée jusqu'à réussite. Ces évaluations n'étaient donc pas pénalisantes vis-à-vis de l'habilitation des opérateurs.

Il est à noter que trois de nos quatre opérateurs (n°2, 3 et 4) sont en poste depuis plusieurs années et ont donc acquis de l'expérience ainsi que de nombreuses connaissances en travaillant avec l'ancienne méthode au  $^{51}\text{Cr}$  mais aussi avec la nouvelle méthode en double isotope. Ceci est à opposer à l'opératrice n°1, qui a récemment rejoint l'équipe de l'unité de marquage cellulaire.



## 2. RÉSULTATS

### A. Thème « hygiène en radiopharmacie avec un focus sur les marquages cellulaires radioisotopiques »

Les quatre opérateurs ont pu être formés et évalués sur le thème de l'hygiène en radiopharmacie. Les résultats de l'évaluation finale sont regroupés dans le graphique ci-dessous (figure 17).

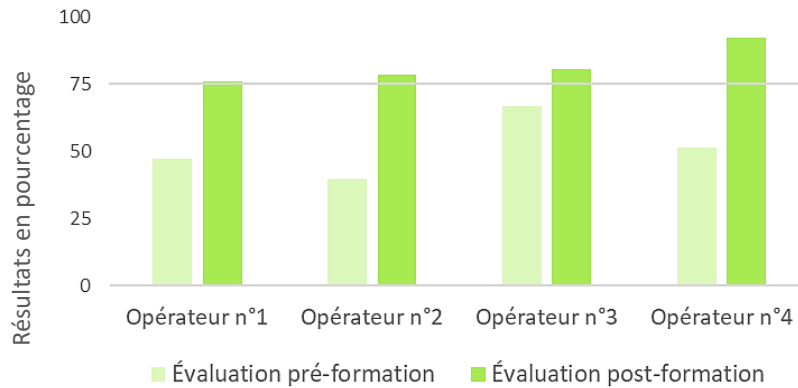


Figure 17 : évolution des connaissances sur l'hygiène en radiopharmacie

Pour tous les opérateurs, le résultat de l'évaluation post-formation était supérieur à 75 %, avec une progression moyenne de 30,8 % entre l'évaluation initiale et l'évaluation finale.

### B. Thème « mesure des volumes sanguins »

Trois opérateurs ont pu être formés et évalués sur le thème de l'étude des volumes sanguins. Les résultats de l'évaluation finale sont regroupés dans le graphique ci-dessous (figure 18).

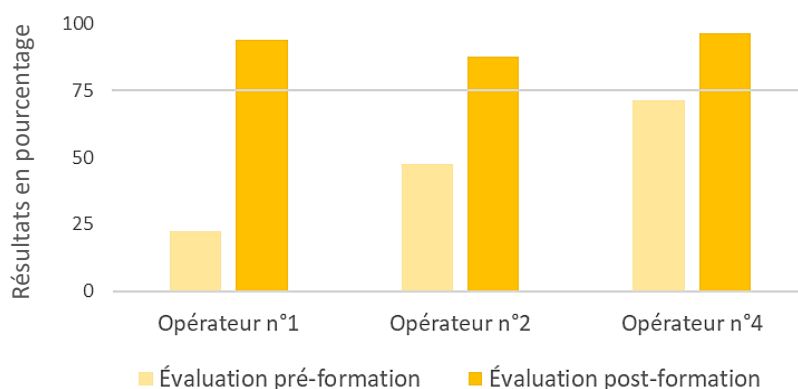


Figure 18 : évolution des connaissances sur l'étude des volumes sanguins

Pour tous les opérateurs, le résultat de l'évaluation post-formation était supérieur à 75 %, avec une progression moyenne de 45,4 % entre l'évaluation initiale et l'évaluation finale.

### C. Thème « maladie de Vaquez »

Trois opérateurs ont pu être formés et évalués sur le thème de la maladie de Vaquez.

Lors de l'évaluation finale, l'opérateur n°1 a obtenu un résultat de 67,5 % et l'opérateur 4 a obtenu un résultat de 56,3 %. Ces résultats étant inférieurs au seuil défini, la formation et l'évaluation finale ont alors été renouvelées en insistant sur les points non assimilés.

Les résultats de l'évaluation finale sont regroupés dans le graphique ci-dessous (figure 19).

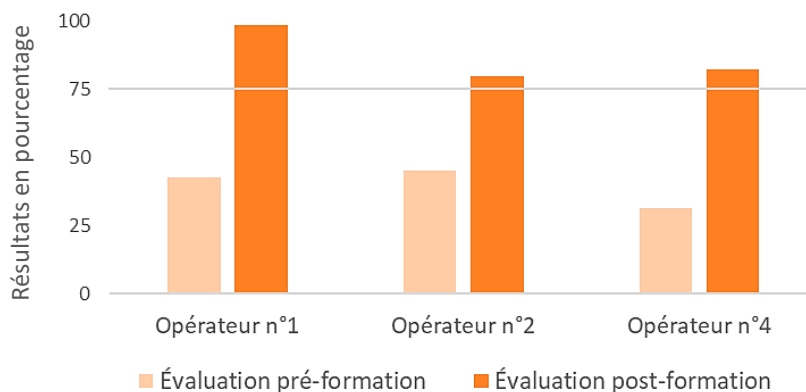


Figure 19 : évolution des connaissances sur la maladie de Vaquez

Finalement, le résultat de l'évaluation post-formation des trois opérateurs était supérieur à 75 %, avec une progression moyenne de 47,5 % entre l'évaluation initiale et l'évaluation finale.

#### D. Thème « bonnes pratiques de pipetage »

Trois opérateurs ont pu être formés et évalués sur le thème des bonnes pratiques de pipetage.

Les résultats de l'évaluation finale sont regroupés dans le graphique ci-dessous (figure 20).

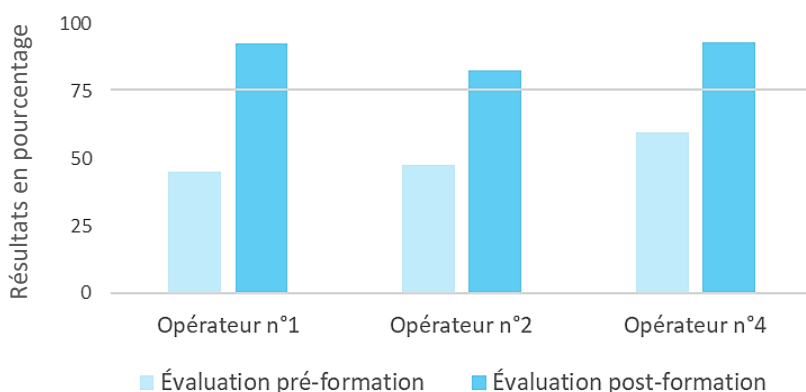


Figure 20 : évolution des connaissances sur les bonnes pratiques de pipetage

Pour tous les opérateurs, le résultat de l'évaluation post-formation était supérieur à 75 %, avec une progression moyenne de 38,6 % entre l'évaluation initiale et l'évaluation finale.

## II. ÉVALUATION DES PRATIQUES

---

## 1. INTRODUCTION

L'habilitation au poste de préparation des MRP a été étudiée par J. Potdevin-Verdier au cours de ses travaux de thèse, qui ont été publiés par la SoFRa à travers une grille d'évaluation des pratiques professionnelles (3).

Nous nous sommes donc inspirés de ces travaux afin d'élaborer un support d'évaluation pour l'habilitation des MERM concernant l'étude des volumes sanguins.

L'objectif principal de cette évaluation des pratiques est d'habiliter nos opérateurs sur le poste concernant la mesure des volumes sanguins. Cela permettra au pharmacien de s'assurer de la compétence des opérateurs impliqués, dans un but de sécurisation du circuit.

L'objectif secondaire est de mettre en évidence les points à améliorer et les points forts du fonctionnement de l'unité de marquage cellulaire.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Après avoir observé et décrit la totalité des étapes impliquées dans la mesure des volumes sanguins et réalisées par les MERM, nous avons adapté la grille de la SoFRa à notre service et à nos pratiques (annexe 6).

Nous avons donc défini 11 catégories d'activités :

- Modalités d'entrée dans le service de médecine nucléaire et dans le local des marquages cellulaires radioisotopiques
- Prise de rendez-vous
- Réception et stockage
- Modalités générales de manipulation aseptique en système ouvert
- Fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®
- Modalités générales de prélèvement et d'injection
- Étude du volume globulaire
- Étude du volume plasmatique
- Bionettoyage
- Gestion des déchets
- Modalités de sortie du local des marquages cellulaires radioisotopiques et du service de médecine nucléaire.

Les activités ont été détaillées sous forme de fiches d'évaluation. Chaque fiche a été décomposée en plusieurs sous-parties, puis en plusieurs critères. L'ensemble des 11 fiches constitue un total de 353 critères.

De plus, dans chaque catégorie d'activité, différents thèmes transversaux sont abordés. Ainsi, 14 thèmes transversaux ont été définis :

- Administratif
- Analytique
- Circuit des produits
- Contrôles
- Déchets
- Hygiène
- Injection
- Matériel et équipement
- Mise en seringue
- Organisation
- Prélèvement
- Préparation
- Radioprotection
- Traçabilité.

Un ou plusieurs thèmes ont ensuite été attribués à chaque critère.

Par exemple, pour l'activité « Réception et stockage », les thèmes « Contrôle » et « Radioprotection » ont été associés au critère n°30 « Contrôler le débit de dose à un mètre et au contact du colis ». Ou encore, pour l'activité « Manipulation aseptique », les thèmes « Hygiène », « Matériel et équipement » et « Préparation » ont été attribués au critère n°50 « Désinfecter le matériel non stérile avec des compresses imprégnées d'alcool isopropylique 70 % avant de l'introduire dans la HFL ».

Afin de permettre une analyse et une gestion optimale des résultats des fiches d'audit, un tableur Excel® a été élaboré sur la base de celui de la SoFRa pour l'habilitation au poste de préparation des MRP. Les activités liées à la mesure des volumes sanguins et les critères correspondants ont été intégrés, ainsi que les différents thèmes.

Le tableur est principalement constitué de trois onglets.

L'onglet « Résultats » permet de compiler tous les résultats obtenus suite à l'audit d'un opérateur, en indiquant la réponse « Oui », « Intermédiaire », « Non » ou « Non applicable » en face de chaque critère.

L'onglet « Analyse » permet d'obtenir une synthèse des résultats de chaque opérateur. Il permet aussi d'obtenir une synthèse des résultats moyens du groupe d'opérateurs évalués. Cette synthèse est présentée sous forme de graphiques en araignée et de tableaux, en fonction des activités et/ou des thèmes évalués. Pour plus de lisibilité, les résultats supérieurs au seuil d'alerte sont automatiquement affichés en vert, les résultats compris entre le seuil d'alerte et le seuil critique sont affichés en orange, et les résultats inférieurs au seuil critique sont affichés en rouge.

Enfin, il existe un onglet « Amélioration » qui répertorie tous les critères dont le score est inférieur à un seuil de conformité modifiable (75 % dans notre cas). Il permet de générer des fiches d'audit spécifiques à chaque thème, à partir des non-conformités relevées.

Grâce à cette grille d'évaluation et à ce tableur, un audit des pratiques a été mis en œuvre pour chaque MERM en charge de la mesure des volumes sanguins, à partir des 11 fiches d'évaluation. Celui-ci s'est déroulé sur plusieurs jours puisque toutes les activités évaluées ne sont pas effectuées le même jour. Les résultats des audits ont ensuite été compilés dans le tableur Excel®, puis ils ont été analysés.

Un seuil critique a été fixé à 75 %. Si le score global était inférieur à ce seuil, il était prévu que l'opérateur ne soit pas habilité. Son activité était alors suspendue, il devait être reformé et l'audit des pratiques devait être de nouveau réalisé.

Si le score global était supérieur ou égal à 75 % mais que le score de certains thèmes ou activités était inférieur à 75 %, il était prévu que l'opérateur ne soit pas habilité. Il pouvait poursuivre les activités maîtrisées tout en étant accompagné par un radiopharmacien sur les activités et/ou thèmes non maîtrisés. L'audit des pratiques devait être de nouveau réalisé.

De plus, un seuil d'alerte a été instauré. Il a été fixé à 85 %. Si le score global était supérieur ou égal à 75 % mais que le score de certains thèmes ou activités était compris entre 75 et 85 %, il était prévu que l'opérateur soit habilité mais que des formations spécifiques aux activités ou thèmes concernés soient effectuées.

Finalement, si le score global était supérieur ou égal à 75 % et que le score de tous les thèmes et activités était supérieur ou égal à 85 %, l'opérateur était habilité (annexe 7).

### 3. RÉSULTATS

L'évaluation des pratiques a été réalisée pour trois opérateurs.

Le taux de conformité moyen s'élève à 95 %, tous critères confondus.

Concernant les résultats par activité, ils sont tous supérieurs aux seuils critique et d'alerte (figure 21). Les activités les mieux réalisées sont celles qui correspondent :

- Aux modalités générales de prélèvement et d'injection (97 % de conformité), qui inclut par exemple la définition d'un bras destiné aux prélèvements et d'un bras destiné aux injections, la traçabilité informatique des injections, la pose des cathéters, ou encore le rinçage des cathéters pour éviter qu'ils ne s'obstruent ;

- À la mesure des volumes globulaire et plasmatique (96 %), qui reprend les étapes de préparation des <sup>99m</sup>Tc-hématies, de mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et des <sup>99m</sup>Tc-hématies, d'injections et de prélèvements aux différents temps, de pesées des seringues, de pipetages des échantillons et de  $\gamma$ -comptages ;
- À la gestion des déchets (96 %), qui regroupe les items de tri des déchets piquants/tranchants et/ou radioactifs, le comptage et la gestion de la décroissance radioactive des déchets générés, ainsi que la traçabilité informatique de la mise en décroissance ou de l'élimination des déchets radioactifs.

Les activités qui pourraient être améliorées sont :

- La réception et le stockage des produits radioactifs (87 %), en particulier les différents contrôles effectués à réception des colis (destinataire, concordance entre les différents documents, absence de contamination) ;
- Le bionettoyage (91 %), notamment celui du local en début et fin d'activité.

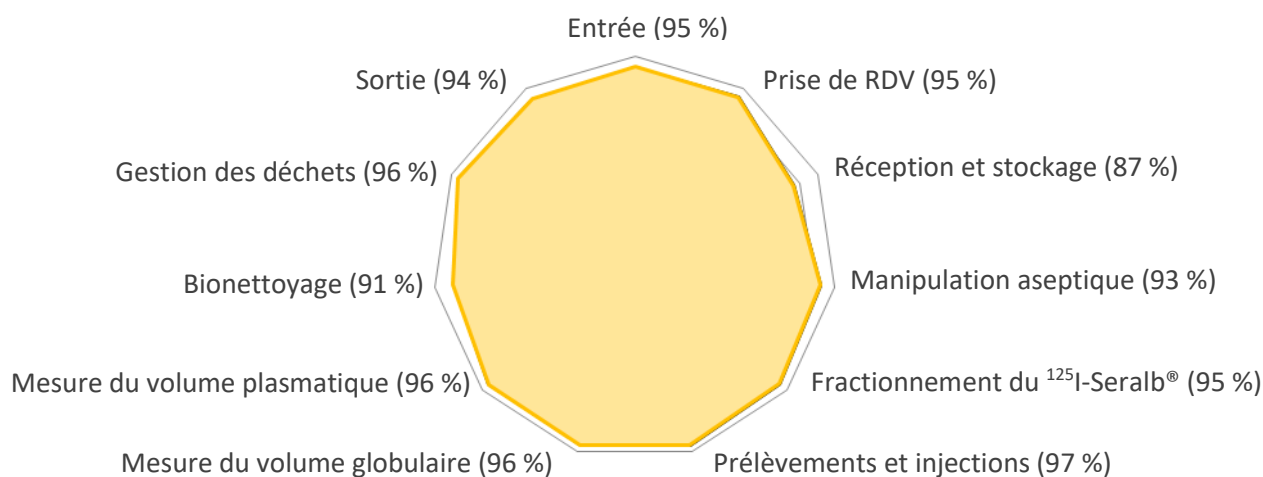


Figure 21 : taux de conformité moyen par activité

En ce qui concerne les résultats par thème, ils sont aussi supérieurs au seuil critique (figure 22).

Les thèmes les mieux maîtrisés sont ceux qui correspondent :

- Au circuit des produits (100 % de conformité), qui comprend notamment le stockage au réfrigérateur du <sup>125</sup>I-Seralb® et du tube de prélèvement destiné au dosage de l'EPO, le stockage du matériel selon la règle du « premier à périmer, premier à être utilisé » ;
- Au matériel et aux équipements (99 %), qui comporte par exemple le relevé quotidien de la température du réfrigérateur, le réapprovisionnement des consommables, la disposition ordonnée du matériel dans la HFL, la répartition du poids dans la centrifugeuse, le contrôle qualité hebdomadaire du  $\gamma$ -compteur ;

- Aux injections (99 %), qui englobent notamment l'injection au patient du <sup>125</sup>I-Seralb® et des <sup>99m</sup>Tc-hématies, le rinçage des seringues avec le sang du patient et le rinçage des cathéters avec du NaCl 0,9% pour ne pas perdre de radioactivité, la conservation des seringues, aiguilles et capuchons suite à l'injection des produits radioactifs pour la mesure des restes.

Les thèmes présentant le plus de non-conformités sont les contrôles (83 %), ainsi que mise en seringue (92 %) et la radioprotection (92 %). Le thème concernant les contrôles est donc inférieur au seuil d'alerte.

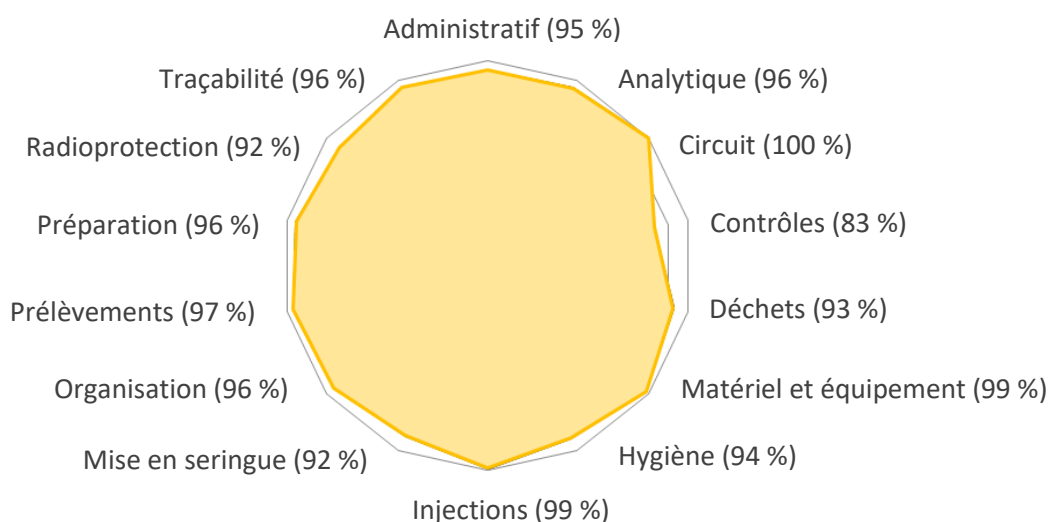


Figure 22 : taux de conformité moyen par thème

Les critères pour lesquels le taux de conformité était inférieur à 75 %, et donc à améliorer sont répertoriés dans le tableau 19 :

Tableau 19 : extrait de l'onglet « Amélioration » du tableur Excel®

**EPP de CHU de Bordeaux - HL (tour 1)**

**75%** de conformité pour retenir un item

Liste des 23 items ayant moins de 75 % de conformité

Critère	Thèmes	Item
13	H	Ne pas porter de maquillage/vernis
23	C F O	Une fois le résultat de la recherche de mutation JAK2 obtenu, appeler le patient pour lui proposer un rendez-vous et lui donner les consignes à respecter en vue de l'examen (à jeun sauf DID, NFS < 1 mois, pas de saignée < 1 mois, βHCG ou contraception si femme en âge de procréer, pas d'examen scintigraphique la semaine précédente, examen allongé) et lui demander s'il a une splénomégalie
28	C	Vérifier le destinataire du colis
30	C R	Contrôler le débit de dose à un mètre et au contact du colis
36	C R	Contrôler l'absence de contamination surfacique grâce au contaminamètre LB124 (canal I131, < 4 Bq/cm <sup>2</sup> )
37	T	Enregistrer la réception et les contrôles sur Venus grâce aux données du fournisseur
61	H P R	Ne pas recapuchonner à deux mains une aiguille avant de la jeter
63	H P	Ne rien positionner entre le flux d'air laminaire et les zones critiques
93	A	Rincer la seringue-témoin (reste) avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) en mettant l'eau de rinçage dans la fiole
95	A	Homogénéiser la fiole
98	L M O	Préparer les différents tubes Vacutainer® (jaune = purge, violet = P0, vert = T15 et T30) pour les différents temps de prélèvement en les identifiant avec une étiquette-patient et en marquant les temps et l'isotope en noir pour le <sup>99m</sup> Tc et en rouge pour l' <sup>125</sup> I
136	S	Préparer une seringue de 10 mL avec 0,2 mL d'héparine et rincer tout le corps de la seringue
138	C O	Vérifier que le patient est à jeun et qu'il n'a pas eu de saignée au cours du mois précédent
139	H L R	Mettre des gants stériles pour réaliser le prélèvement
224	A	Rincer la seringue-témoin <sup>99m</sup> Tc avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) en mettant l'eau de rinçage dans la fiole correspondante
256	C	Vérifier que le patient a reçu les informations spécifiques aux MDS et que les deux comprimés d'iodure de potassium lui ont été administrés
278	A	Rincer la seringue-patient <sup>125</sup> I (reste) avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) en mettant l'eau de rinçage dans une fiole de 20 mL
287	A C	Contrôler le volume réglé sur la pipette
294	H	Faire couler l'eau du robinet des éviers froids (sas et laboratoire) pendant 2 minutes
297	H	Avec des chiffons à UU imprégnés de DD essuyer les paillasses, le sas transmurale, l'évier et les robinetteries, l'étuve, les centrifugeuses
299	H	Avec des chiffons à usage unique imprégnés de DDD puis DD, essuyer les paillasses, le bac de désinfection du matériel, les centrifugeuses, l'étuve, les poubelles plombées, l'écran et la tour de l'ordinateur, le clavier, les câbles, le téléphone, le bureau, les chaises, le marchepied, le sas transmurale
316	D H	Jeter les compresses et chiffons utilisés dans la poubelle adaptée
343	D H R	Jeter les gants dans la poubelle adaptée



Des résultats commentés par thème sont ensuite présentés.

- Analytique

- Critères n°93, 224 et 278 : lors du rinçage des seringues-témoins et patients, en vue de préparer les solutions-témoins et de restes, toute l'eau qui est en contact avec l'aiguille doit être incorporée à la solution. Ceci n'a pas toujours été appliqué et peut conduire à la perte de la radioactivité, entraînant ainsi un biais lors de l'examen.
- Critère n°95 : suite à la préparation des solutions-témoins et des solutions de restes, ainsi qu'avant tout pipetage, les fioles doivent être homogénéisées pour éviter la sédimentation des hématies et l'adsorption de l'albumine sur les parois ou l'agrégation de l'albumine. Cela n'a pas été systématiquement réalisé.

- Contrôles

- Critère n°23 : lors de la prise de rendez-vous avec le patient, il est nécessaire de vérifier s'il a une splénomégalie afin de prévoir le prélèvement supplémentaire, et s'il a eu une scintigraphie au cours de la semaine précédente qui pourrait gêner la réalisation de l'examen. Ces contrôles ont parfois été omis.
- Critère n°28 : lors de la réception de colis, la vérification du destinataire évitant les erreurs d'adressage n'a pas été réalisée.
- Critère n°30 : les contrôles de débit de dose à un mètre et au contact du colis, ainsi que le contrôle d'absence de contamination n'étaient pas maîtrisés et pas toujours effectués.
- Critère n°138 : à l'arrivée du patient, il est nécessaire de vérifier s'il est bien à jeun. Si ce n'est pas le cas, les temps d'agitation devront être allongés pendant les étapes de prétraitement des hématies au pyrophosphate d'étain et de marquage au  $^{99m}\text{Tc}$ . Il est également important de contrôler que le patient n'a pas eu de saignée au cours du mois précédent l'examen, ce qui pourrait fausser les résultats.
- Critère n°256 : si la mesure du volume plasmatique est indiquée, il est impératif de vérifier que le patient a reçu les informations spécifiques aux médicaments dérivés du sang et que les comprimés d'iodure de potassium lui ont été administrés, ce qui n'a pas toujours été réalisé.
- Critère n°287 : le réglage du volume de la pipette n'est pas systématiquement contrôlé, ce qui peut conduire au pipetage d'un volume inexact.

- Déchets

- Critère n°316 : lors du bionettoyage de fin d'activité, les compresses et chiffonnettes à usage unique utilisées avec du détergeant-désinfectant-décontaminant (DDD) doivent être jetées dans la poubelle plombée adaptée. Il a été observé qu'elles étaient souvent jetées dans la poubelle à ordures ménagères.
- Critère n°343 : tout au long de la préparation, les gants potentiellement en contact avec de la radioactivité doivent être jetés dans la poubelle plombée adaptée, ce qui n'a pas toujours été le cas.

- Hygiène

- Critère n°13 : le maquillage est proscrit du local des marquages cellulaires pour limiter la production de particules. Cela n'a pas toujours été respecté.
- Critère n°63 : lors de manipulation dans la hotte à flux laminaire, il est important de ne rien positionner entre le flux d'air laminaire et les zones critiques. Cependant, dans la hotte à flux laminaire, l'opérateur se retrouve parfois à manipuler au-dessus de zones critiques, empêchant ainsi l'action protectrice du flux d'air.
- Critère n°139 : pour réaliser le prélèvement sanguin qui servira à la préparation d'hématies radiomarquées, des gants stériles doivent être portés. Dans la majorité des cas, il a été observé que des gants non stériles étaient portés.
- Critères n°294 : à l'arrivée dans le local de marquage cellulaire, il est important de laisser l'eau des éviers froids s'écouler pendant deux minutes afin d'éviter la formation d'un biofilm. Ceci a parfois été oublié, notamment au niveau de l'évier du sas d'habillage.
- Critères n°297 et 299 : que ce soit au début ou en fin d'activité, lors du bionettoyage du local, les robinetteries, les poubelles plombées et le marchepied n'ont pas toujours été nettoyés.

- Mise en seringue

- Critère n°136 : lors de la préparation de la seringue de prélèvement, 0,2 mL d'héparine doit être ajouté. Or il a été observé que 0,4 mL est parfois ajouté, ce qui peut conduire à un mauvais rendement de marquage des hématies.

- Organisation

- Critère n°98 : les tubes Vacutainer® utilisés pour les différents temps de prélèvement doivent être préalablement identifiés avec une étiquette-patient sur laquelle sont marqués les temps et l'isotope. Le code couleur établi pour différencier le  $^{99m}\text{Tc}$  (en noir) et l' $^{125}\text{I}$  (rouge) n'a pas toujours été respecté.
- Préparation
  - Critère n°161 : après manipulation, des aiguilles ont parfois été recapuchonnées avant de les jeter. Ceci est inutile mais aussi dangereux puisqu'il y a un risque de piqûre et donc de contamination avec le sang du patient et/ou avec des produits radioactifs.
- Tracabilité
  - Critère n°37 : l'enregistrement informatique de la réception du Seralb® et de son fractionnement sur le logiciel Venus® de radiopharmacie n'a pas toujours été réalisé selon le mode opératoire, ce qui peut conduire à des problèmes lors des prochaines utilisations de ces préparations.

### III. DISCUSSION

---

De manière générale, les résultats obtenus lors de l'évaluation des connaissances mettent en évidence une bonne assimilation de la théorie suite aux formations dispensées.

Concernant le thème « mesure des volumes sanguins », une différence peut être observée entre les trois opérateurs en poste depuis plusieurs années (n°2 et 4) et l'opératrice nouvellement intégrée à l'équipe (n°1). En effet, l'expérience déjà acquise impacte fortement les résultats de l'évaluation initiale. Pour cette même raison, une progression bien plus importante a pu être constatée pour l'opératrice n°1 entre l'évaluation initiale et l'évaluation finale.

Par ailleurs, la formation aux bonnes pratiques de pipetage a permis d'étendre les compétences des opérateurs. Les résultats corrects de l'évaluation finale théorique, ainsi qu'un accompagnement et des ateliers d'entraînement ont donc permis à deux opérateurs de basculer sur la méthode de pipetage en mode inverse. Cette formation sera par la suite formalisée par une habilitation au pipetage. Pour cela, il leur sera demandé de réaliser dix aliquots d'une solution contenant un radioisotope, puis ces dix aliquots seront comparés à un témoin de la même solution par pesée et par  $\gamma$ -comptage. La répétabilité et la justesse des pipetages seront alors évaluées.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation des pratiques soulignent le niveau élevé de maîtrise des différentes étapes impliquées lors de la mesure des volumes sanguins par les MERM.

Ils ont aussi fait ressortir les points à améliorer. Une formation spécifique axée sur les différents thèmes et activités ciblés (comme le bionettoyage, les contrôles à réception des produits radioactifs) sera organisée.

D'une manière générale, l'audit des pratiques a été bien accepté par les MERM évalués. Il a été perçu comme un moment privilégié d'échange et a permis de rediscuter de certaines pratiques ou dérives.

Lorsque les quatre opérateurs auront été audités, une réunion sera organisée avec l'ensemble de l'équipe pour présenter et discuter des résultats obtenus. Cela permettra de réfléchir à un plan d'action d'amélioration, tout en impliquant l'ensemble des personnes concernées.

Par ailleurs, en raison de la disparité existante entre les pratiques de chaque centre concernant les MCR, notre grille d'évaluation des pratiques telle qu'elle est présentée est difficilement transposable aux autres centres de médecine nucléaire. En effet, bien que les catégories d'activité puissent correspondre à d'autres centres, les critères sont très détaillés et spécifiques à notre service. Elle pourra donc constituer un support de base qui nécessitera une adaptation à chaque centre avant de pouvoir être utilisée.

À l'avenir, l'évaluation des connaissances et des pratiques sera renouvelée tous les trois ans dans le cadre de l'habilitation périodique des opérateurs.



## CONCLUSION

---

La prise en charge du patient nécessite une amélioration continue de la qualité et de la sécurité des différentes étapes impliquées dans la mesure isotopique des volumes sanguins.

Dans cette optique, plusieurs outils ont été mis au point afin de valider l'asepsie de nos procédés de préparation, de pouvoir contrôler la stérilité de la préparation finale d'<sup>99m</sup>Tc-hématies et enfin, d'habiliter les opérateurs en charge de cette activité.

Deux tests de remplissage aseptique ont tout d'abord été développés. Leur sensibilité a significativement été améliorée en contaminant tous les septums des flacons utilisés avec une suspension de *Staphylococcus epidermidis*. Par ailleurs, l'utilisation de fluorescéine nous a permis de pouvoir observer d'éventuelles contaminations « radioactives ».

Les TRA permettent de valider l'asepsie des procédés de préparation, ainsi que de former et habiliter les opérateurs au poste de marquage cellulaire radioisotopique, tout en s'affranchissant du risque d'irradiation du personnel ou de contamination radioactive de l'environnement. Ils permettent aussi d'avoir une réflexion sur les pratiques du service. En revanche, ils sont extrêmement chronophages et difficiles à mettre en œuvre car ils sont dépendants de la disponibilité des opérateurs, des locaux et des équipements, qui sont souvent occupés par la routine du service de médecine nucléaire.

Un essai de stérilité par méthode alternative rapide a ensuite été développé en s'appuyant sur le chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne. Il a été adapté aux particularités de nos préparations d'hématies radiomarquées, en termes de radioactivité et de composition cellulaire. Son application est beaucoup moins chronophage que le TRA puisque seule une étape d'ensemencement du flacon d'hémoculture et d'une gélose est ajoutée.

Enfin, une évaluation des connaissances et des pratiques a été mise au point. Pour la partie théorique, plusieurs supports de formation et d'évaluation ont été créés.

Concernant la partie pratique, une grille d'audit ainsi qu'un tableur de recueil et d'analyse des résultats ont été adaptés aux différentes étapes de la mesure isotopique des volumes sanguins. Cet outil permet d'évaluer tous les critères impliqués dans cet examen, réalisés par les MERM. Il permet de mettre en évidence les points à améliorer, qui pourront être insérés au sein d'un plan d'actions correctives.

Suite à l'arrêt de commercialisation du  $^{51}\text{Cr}$ , la mise en place de nouvelles méthodes de mesure isotopique des volumes sanguins nécessite la validation de l'asepsie des procédés impliqués. Elle a donc été validée grâce aux TRA et à l'essai de stérilité mis au point, qui ont été réalisés en triplicat. Ces deux outils sont complémentaires. En effet, les TRA permettent de valider *a priori* l'asepsie d'un procédé de préparation, alors que l'essai de stérilité permet une validation *a posteriori* en s'assurant de la stérilité du produit fini.

Finalement, un programme d'habilitation des opérateurs a été mis en place. Une habilitation initiale comporte donc la réalisation en triplicat des deux TRA et de l'essai de stérilité, des formations théoriques et l'évaluation des connaissances sur différents thèmes, ainsi que l'évaluation des pratiques à travers un audit.

L'application des outils développés a permis l'habilitation complète de deux opérateurs sur quatre, suivant l'arbre décisionnel présenté en annexe 7. À l'issue de leur habilitation, les deux opérateurs concernés ont reçu un certificat d'habilitation (annexe 8), qui a aussi été remis à la cadre du service. L'habilitation des deux autres opérateurs a débutée et sera poursuivie au cours des prochains mois.

À l'avenir, les TRA et l'essai de stérilité développés nous permettront de valider à nouveau l'asepsie du procédé de préparation après chaque modification majeure de la méthode.

L'essai de stérilité pourra être mis en place en routine pour assurer un suivi de l'asepsie des préparations d' $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hématies. Ce ne sera cependant pas un contrôle libératoire car, du fait de la décroissance radioactive, il est admis par la Pharmacopée Européenne qu'il puisse être réalisé après injection au patient. En cas de positivité, le microorganisme sera identifié et le médecin prescripteur pourra être rapidement contacté afin de prendre en charge le patient.

D'autre part, les TRA, l'essai de stérilité, ainsi que l'évaluation des connaissances et des pratiques nous permettront d'effectuer l'habilitation périodique des opérateurs.

Ainsi, l'ensemble de ce travail sera valorisé et pérennisé à travers la création d'une évaluation des pratiques professionnelles avec l'aide de la cellule d'appui méthodologique à l'évaluation des pratiques professionnelles et à la pertinence des soins.

Il sera aussi possible d'étendre ces outils aux autres marquages cellulaires radioisotopiques réalisés dans le cadre de scintigraphies aux leucocytes marqués pour la recherche d'infections ou encore, de scintigraphies plaquettaires pour le suivi des purpuras thrombopéniques idiopathiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fraysse M, Galy G. Radiopharmacie et médicaments radiopharmaceutiques. Lavoisier; 466 p.
2. Code de la Santé Publique - Article L5121-1.
3. Potdevin-Verdier J. Évaluation des pratiques professionnelles en radiopharmacie et amélioration de la sécurité du médicament radiopharmaceutique au CHR de Metz-Thionville [Thèse d'exercice : Pharmacie hospitalière]. Lorraine; 2013.
4. AFSSAPS. Bonnes pratiques de préparation. 2007.
5. Poitou J, Rizzo-Padoin N, Trouvin J-H, Matillon Y, Deletraz-Delporte M. La cellule sanguine marquée par un radionucléide : recherche d'une qualification juridique. Ann Pharm Fr. 2020;78(1):49-57.
6. Lopez S. Marquages cellulaires en radiopharmacie – Application pour le marquage de Médicaments de Thérapie Innovante [Thèse d'exercice : Pharmacie hospitalière]. Limoges; 2020.
7. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers. Polyglobulie primitive de Vaquez et autres polyglobulies [Internet]. [cité 29 août 2020]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/93-polyglobulie-primitive-de-vaquez-et-autres-polyglobulies>
8. CHU de Limoges. Maladie de Vaquez. Enseignement de DCEM3 présenté à Limoges.
9. Laboratoire National Henry Becquerel. Nucléide Lara - Library for gamma and alpha emissions [Internet]. Nucléide - Lara. [cité 21 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.nucleide.org/Laraweb/index.php>
10. Najean Y, Ardaillou N, Dresch C. Utilisation des techniques isotopiques en hématologie. J.-B. Baillière et fils; 1969. 419 p.
11. Brossard D, Chedru-Legros V, Crauste-Manciet S, Fleury-Souverain S, Lagarce F, Odou P, et al. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. SFPC, GERPAC; 2013.
12. PIC/S. PIC/S guide to good practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments. 2014.
13. PIC/S. Recommendation on the validation of aseptic processes. 2011.
14. ANSM. Guide des bonnes pratiques de fabrication. 2019.
15. Food and Drug Administration. Guidance for industry: sterile drug products produced by aseptic processing - current Good Manufacturing Practice. 2004;63.
16. US Pharmacopoeia. 797 Pharmaceutical compounding - Sterile preparations. 2019;37.
17. US Pharmacopoeia. 825 Radiopharmaceuticals - Preparation, compounding, dispensing, and repackaging. 2019;30.
18. Todde S, Peitl PK, Elsinga P, Kozirowski J, Ferrari V, Ocak EM, et al. Guidance on validation and qualification of processes and operations involving radiopharmaceuticals. EJNMMI Radiopharm Chem. déc 2017;2(1):8.



19. De Vries EFJ, Roca M, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. avr 2010;37(4):842-8.
20. Serra M, Roseti L, Bassi A. Media Fill for Validation of a Good Manufacturing Practice-Compliant Cell Production Process. *Turksen K, éditeur. Stem Cells Good Manuf Pract*. 2014;1283:161-9.
21. Urbano N, Modoni S, Schillaci O. Media Fill Test for validation of autologous leukocytes separation and labelling by <sup>99m</sup>Tc-HmPAO. *Nucl Med Biol*. janv 2013;40(1):104-8.
22. EANM Radiopharmacy Committee. Guidelines on current good radiopharmacy practice (cGRPP) in the preparation of radiopharmaceuticals. 2007;19.
23. Colombe A. Élaboration d'un programme de formation et d'habilitation destiné aux préparateurs hospitaliers en unité de production de médicaments stériles [Thèse d'exercice : Pharmacie]. Bordeaux; 2016.
24. Berlion C. Validation du procédé aseptique de radiomarquage cellulaire en radiopharmacie : mise en place d'un test de remplissage aseptique [Thèse d'exercice : Pharmacie hospitalière]. Grenoble; 2015.
25. Chantry et al. Un test de remplissage aseptique combiné à la fluorescéine comme outil de validation des bonnes pratiques pour les préparations radiopharmaceutiques. In Presqu'île de Giens, France; 2015 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/a-single-fluorescein-combined-media-fill-test-for-validation-of-good-practices-concerning-both-radiopharmaceutical-preparations-asepsis-and-radioprotection>
26. Moody CA, Eckel SF, Amerine LB. Evaluating the Sensitivity of a Media-Fill Challenge Test Under Various Situations as a Reliable Method for Recommended Aseptic Technique Competency Assessment. *J Pharm Technol*. avr 2016;32(2):47-53.
27. Sigward E, Fourgeaud M, Vazquez R, Guerrault-Moro M-N, Brossard D, Crauste-Manciet S. Aseptic simulation test challenged with microorganisms for validation of pharmacy operators. *Am J Health Syst Pharm*. 15 juill 2012;69(14):1218-24.
28. Pharmacopée Européenne (9.0). 2.6.1 Essai de Stérilité. 2011.
29. Pharmacopée Européenne (9.2). 5.1.6 Méthode alternative pour le contrôle de la qualité microbiologique. 2017.
30. Pharmacopée Européenne (8.7). 5.19 Préparation extemporanée de produits radiopharmaceutiques. 2016.
31. Maia S, Nicol B, Rouleau A, Guilloteau D, Van der Mee-Marquet N. Contamination microbiologique en radiopharmacie : problématiques et mise en œuvre de contrôles dans le cadre d'une démarche qualité. *Pharm Hosp*. mars 2008;43(172):11-7.
32. Plasse M. Mise en place des contrôles qualité pour les essais cliniques en radiopharmacie au centre hospitalier universitaire de Grenoble [Thèse d'exercice : Pharmacie hospitalière]. Grenoble Alpes; 2018.
33. International Atomic Energy Agency. Radiolabelled autologous cells: methods and standardization for clinical use [Internet]. 2015 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1437web-26591607.pdf>
34. Flore cutanée résidente et transitoire [Internet]. [microbiologiemedicale.fr](http://microbiologiemedicale.fr). [cité 22 avr 2020]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/flore-cutanee-residente-transitoire/>

35. Ecologie microbienne de la peau - La flore cutanée et ses caractéristiques [Internet]. [cité 22 avr 2020]. Disponible sur: [http://www.aly-abbara.com/livre\\_gyn\\_obs/termes/hygiene/flore\\_transitoire\\_residente\\_peau\\_mains.html](http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/hygiene/flore_transitoire_residente_peau_mains.html)
36. Amartin E. La flore cutanée normale [Thèse d'exercice : Pharmacie]. Lille; 2016.
37. Favier B, Gilles L, Latour J-F. Mise en place d'un système d'évaluation des manipulateurs dans une unité de reconstitution de cytotoxiques. *J Pharm Clin.* 1 avr 2003;22(2):107-12.
38. Dussart C, Favier B, Gilles L, Camal I, Almeras D, Latour J-F, et al. Formation continue des manipulateurs de cytotoxiques et prévention du risque de contamination. *Bull Cancer (Paris).* 1 sept 2008;95(9):821-2.
39. Lewis SM, Bayly RJ. Radionuclides in Haematology. Churchill Livingstone; 1986. 288 p.
40. Pharmacopée Européenne (9.2). 2.6.27 Contrôle microbiologique des produits cellulaires. 2017.
41. Biomérieux. BACT/ALERT® - Flacons [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/bactalert-flacons>
42. Biomérieux. BACT/ALERT® PF PLUS [Internet]. [cité 21 avr 2020]. Disponible sur: <https://biomerieuxdirect.com/clinical/BacT-Alert-Reagents-Other/BACT-ALERT%C2%AE-PF-PLUS/p/410853>
43. Quatremare É. Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique: validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité des mélanges nutritifs " à la carte " [Thèse d'exercice : Pharmacie hospitalière]. Rouen; 2014.
44. Commission internationale de protection contre les radiations. Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire; 2009.
45. Légifrance. Décret n° 2018-437 du 4 juin 2018 relatif à la protection des travailleurs contre les risques dus aux rayonnements ionisants [Internet]. 2018-437, JORF n°0127 juin 5, 2018. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000036985602&categorieLien=id>
46. Biomérieux. Notice BACT/ALERT® PF Plus. 2017.
47. Parveen S, Kaur S, David SAW, Kenney JL, McCormick WM, Gupta RK. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine.* oct 2011;29(45):8012-23.
48. Kielpinski G, Prinzi S, Duguid J, du Moulin G. Roadmap to approval: use of an automated sterility test method as a lot release test for Carticel®, autologous cultured chondrocytes. *Cytotherapy.* 2005;7(6):531-41.
49. Ministère des Solidarités et de la Santé. Recherches impliquant la personne humaine [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020 [cité 7 août 2020]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/systeme-de-sante-et-medico-social/recherche-et-innovation/recherches-impliquant-la-personne-humaine/>



## ANNEXES

**Annexe 1** : mode opératoire du fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®

### Matériel nécessaire

1 flacon de <sup>125</sup> I-Seralb®	3 ELUMATIC
1 pince cochère	3 pansements
1 aiguille orange pour prise d'air	2 paquets compresses stériles
1 aiguille bleue	3 pots plombés
1 seringue de 1 mL	1 pissette d'alcool isopropylique 70 %
1 PL blanche	1 fiole de 50 mL (paillasse)
1 champ stérile	1 tube Falcon de 15 mL (paillasse)

### Fractionnement des doses de SERALB- 125I (SARI)

#### SUR LA PAILLASSE

Nettoyer la balance et le flacon ELUMATIC avec de l'alcool isopropylique 70 %

S'assurer que la bulle se trouve bien au centre de la cible

Faire la TARE

Peser une seringue vide (seringue de 1 mL + aiguille bleue) qui correspondra à la seringue-témoin

Noter le poids de la seringue-témoin vide dans le tableur Excel mesure VG + VP/onglet fractionnement

Dans la partie violette renseigner le lot en cours : Date, Numéro de lot, Péréemption, Poids vide

Cliquer sur nouveau lot

Cliquer sur la croix pour fermer

Un message apparait pour l'enregistrement, cliquer sur enregistrer.

#### DANS LA HOTTE A FLUX LAMINAIRE

##### ***Préparation des doses patient***

Enlever l'opercule métallique sur le flacon de <sup>125</sup>I-Seralb® à l'aide de la pince cochère

Enlever les flips off rouges des 3 Elumatics

Désinfecter les septums avec de l'alcool isopropylique

Mettre la prise d'air en place (aiguille orange)

Connecter la PL blanche sur la seringue de 1 mL

Mettre l'aiguille bleue sur une compresse stérile

Prélever 0,4 mL de <sup>125</sup>I-Seralb® exactement avec la PL noire

Laisser la PL en place

Déconnecter le corps de la seringue et remettre l'aiguille bleue

Ajouter les 0,4 mL de <sup>125</sup>I-Seralb® dans un flacon ELUMATIC

Nettoyer le septum avec de l'alcool isopropylique

Mettre un pansement sur le septum

Réitérer 2 fois cette opération à savoir prélèvement avec PL blanche et injection dans l'ELUMATIC à l'aide de l'aiguille bleue  
3 doses sont alors disponibles pour la semaine, les mettre dans des protections blindées intitulées  $^{125}\text{I}$  et annoter A, B et C au marqueur sur le bouchon des protections blindées + indiquer sur chaque flacon la date de péremption du flacon de  $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup> correspondant en collant l'étiquette de la préparation dessus.

### **Préparation de la seringue-témoin**

Après avoir fractionné 3 doses, avec la même seringue prélever tout le  $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup> restant du flacon  
Par retournement récupérer tout ce qui était resté dans la PL blanche puis reconnecter l'aiguille bleue avec son capuchon

### **SUR LA PAILLASSE**

Peser la seringue-témoin pleine  
Noter le poids de la seringue-témoin pleine dans le tableur Excel mesure VG+VP/onglet fractionnement

Dans la partie violette renseigner le lot en cours : Poids pleine  
Cliquer sur nouveau lot, cela permet d'avoir une traçabilité de tous les lots et cela génère un enregistrement des poids de la seringue-témoin du  $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup> pour les 3 patients à venir  
Une fenêtre d'enregistrement apparaît pour écraser le lot témoin précédent cliquer sur oui si aucun compte rendu n'est en cours sinon cliquer sur non  
Penser à créer le fichier Excel<sup>®</sup> patient du lot en cours avant d'enregistrer le nouveau fractionnement

Procéder au rinçage de la seringue-témoin dans une fiole de 50 mL  
Compléter jusqu'au trait de jauge  
Conserver la fiole toute la semaine celle-ci servira de témoin pour tous les patients de la semaine

### **DANS VENUS**

#### **Réceptionner le $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup>**

Produits → Commande en attente → sélectionner la ligne de commande correspondant au  $^{125}\text{I}$ -Seralb<sup>®</sup>

### Paramètres de la livraison

DATE DE RECEPTION 30/12/2019  
HEURE DE RECEPTION 11 : 25  
ACTIVITE 0.32 MBq  
DATE 24/01/2020  
HEURE 09 : 30

Catégorie  
 I blanche  
 II jaune  
 III jaune

Débit de dose à 1m < 0 µSv/h  oui  non  
au contact < 5 µSv/h  oui  non

Non contamination Valeur < 4 Bq/cm²  oui  non

Intégrité physique du colis  oui  non  
Vérification documentaire  oui  non

**CALCUL AUTOMATIQUE**

MESURE A L'ACTIVIMETRE  
ACTIVITE MBq  
HEURE DE MESURE 11 : 25

VOLUME 1.7 ml  
NUMERO DE LOT xxxxxxxxxxx-FL1  
DATE DE PÉREMPTION 27/12/2019 - 11 : 25

CREER AUTOMATIQUEMENT UNE PREPARATION  
 ETIQ. PREPARATION  DYMO CARDIO  DYMO HOTTE TC   
DymoDechets  DYMO2

Modifier l'activité de calibration (commande faites à 1,28 MBq soit 0,32 MBq \*4)

Vérifier que le volume est bien de 1,7 mL

Indiquer FL1 au niveau de l'onglet numéro de lot

Décocher CRÉER AUTOMATIQUEMENT UNE PRÉPARATION

→ Remplir les différents champs et valider.

→ Cette fenêtre apparait :

CHU Hôpital de Bordeaux LIVRAISON N°19\_01137

Connecté en tant que

SEMAINE AJOUTER UN ARTICLE - AFFICHER - MODIFIER

AUJOURD'HUI LIVRAISON N°19\_01137  
30/12/2019 11:25  
PRESCRIPTIONS Valerie POTTIER  
RADIOPHARMACIE Fournisseur  
INJECTIONS IBA CISBIO (CURIUM)  
INTERPRETATION SERVICE COMMANDES FRANCE  
RADIOPROTECTION BP 32  
PRODUITS 91192 GIF SUR YVETTE CEDEX  
CONTROLES Tél. : 01.69.85.70.00  
UTILITAIRES Fax : 01 69 85 73 65  
STATISTIQUES Email : commandes@curiumpharma.com

ARTICLES

SERALB-125

MODIFIER - SUPPRIMER - ARTICLE - COMMANDE - SOURCE

ARTICLE SERALB-125  
TYPE RADIO-PHARMACEUTIQUE PRET A L'EMPLOI  
COMMANDE N° 19\_00726  
NUMERO DE LOT xxxxxxxxxxx-FL1  
DATE DE PÉREMPTION 27/12/2019 - 11:25  
SOURCE 19\_00963  
CALIBRATION 0.32 MBq 24/01/2020 09:30  
ACTIVITÉ CALCULÉE A LA LIVRAISON (30/12/2019 11:25) 0.427 MBq  
ACTIVITÉ LIVRÉE (MESURÉE) 0.427 MBq  
VOLUME 1.7 ml  
PREPARATIONS

Pour ajouter les 3 nouvelles commandes correspondant aux 3 autres flacons de <sup>125</sup>I-Seralb® :

Cliquer sur ajouter un article → Puis sur **article non trouvé dans une commande**

CHU Hôpital de Bordeaux AJOUTER UN ARTICLE LIVRAISON N° 19

SEMAINE ARTICLE NON TROUVÉ DANS UNE COMMANDE

AUJOURD'HUI IBA CISBIO (CURIUM)  
PRESCRIPTIONS 30/12/2019 11:25 Valerie POTTIER  
RADIOPHARMACIE SERALB-125 RADIO-PHARMACEUTIQUE PRET A L'EMPLOI  
INJECTIONS Commandes en attente  
INTERPRETATION  
RADIOPROTECTION  
PRODUITS

N° COMMANDE	DATE	ARTICLE	TYPE
10183	09/12/2019	SERALB-125	RADIO-PHA L'EMPLOI

→ Sélectionner <sup>125</sup>I-Seralb® → procéder comme précédemment (0,32 MBq 1,7 mL à date et heure de cal) → décocher CREER AUTOMATIQUEMENT UNE PREPARATION, notifier FL2 puis valider.

Répéter cette démarche pour les flacons FL3 et FL4

### Créer la seringue-témoin correspondant au flacon de fractionnement utilisé

RADIOPHARMACIE → NOUVELLE PREPARATION → AUTRE PREPARATION

CHU Hôpitaux de Bordeaux						
NOUVELLE PREPARATION						
FLACONS DE LA SEMAINE						
SEMAINE						
AUJOURD'HUI	<b>RADIO-PHARMACEUTIQUE PRET A L'EMPLOI</b>					
PRESCRIPTIONS						
RADIOPHARMACIE	SOURCE N°	LIVRAISON	LOT	DATE DE PÉREMPTION	ACTIVITE RESTANTE	
INJECTIONS	SERALB-125	19_00958	26/12/2019 11:16	M013-29 FL1	16/01/2020	0.2 MBq
INTERPRETATION	SERALB-125	19_00959	26/12/2019 11:20	M013-29 FL2	16/01/2020	0.305 MBq
RADIOPROTECTION	SERALB-125	19_00960	26/12/2019 11:21	M013-29 FL3	16/01/2020	0.305 MBq
	SERALB-125	19_00961	26/12/2019 11:22	M013-29 FL4	16/01/2020	0.305 MBq

Cliquer sur SERALB (prendre le numéro de flacon correspondant au fractionnement)

Cette fenêtre apparaît

CHU Hôpitaux de Bordeaux	
NOUVELLE PREPARATION - RADIO-PHARMACEUTIQUE PRET A L'EMPLOI	
SEMAINE	
AUJOURD'HUI	SOURCE N°19_00959 - CALCUL <input type="text"/> MBq => 0 ml
PRESCRIPTIONS	TECHNICIEN <input type="text"/> POTTIEV
RADIOPHARMACIE	ACTIVITE <input type="text"/> MBq
INJECTIONS	VOLUME <input type="text"/> ml
INTERPRETATION	HEURE DE MESURE 11 : 57
RADIOPROTECTION	OBSERVATION <input type="text"/>
PRODUITS	DILUTION <input type="text"/> ml NaCl - - - Reste : 993902
CONTROLES	VOLUME FINAL <input checked="" type="checkbox"/> DECREMENTER LE STOCK
UTILITAIRES	<input type="checkbox"/> ETIQ. PREPARATION <input type="radio"/> DYMO CARDIO <input checked="" type="radio"/> DYMO HOTTE TC <input type="radio"/> DYMO THERAPIE <input type="radio"/> DymoDechets <input type="radio"/> DYMO2
STATISTIQUES	<input type="button" value="VALIDER"/>
RECHERCHER	ARTICLE <b>SERALB-125</b>
PARAMETRAGE	<b>I125 SOURCE N°19_00959</b>
	Fournisseur <b>IBA CISBIO (CURIUM)</b>
	Livraison <b>26/12/2019 11:20</b>
	Lot <b>M013-29 FL2</b>
	Date de péremption <b>16/01/2020</b>
	Reste <b>0.305 MBq 1.7 ml</b>

### **Estimer l'activité correspondant au volume de la seringue-témoin**

Cela crée une préparation avec activité et volume de la seringue-témoin

Puis créer la seringue-témoin via seringue non attribuée (noter dans les commentaires : seringue-témoin)

Imprimer l'étiquette en 4 exemplaires, la coller sur la fiole jaugée de 50 mL et sur les protections blindées A B C afin d'avoir la date de péremption

Mettre la fiole au frigo en attendant son utilisation

Remplir le document de traçabilité du fractionnement de <sup>125</sup>I-Seralb®

**Annexe 2** : mode opératoire de la mesure des volumes globulaires et plasmatiques

**Préparation seringue-patient pour l'injection du <sup>125</sup>I-Seralb® (SARI) pour la mesure du volume plasmatique**

## **SUR LA PAILLASSE**

Nettoyer la balance et le flacon Élumatic avec de l'alcool isopropylique 70%

S'assurer que la bulle se trouve bien au centre de la cible

Faire la TARE

Peler une seringue de 1 mL + aiguille jaune 20 G

Peser la seringue-patient vide dans le flacon Élumatic (aiguille vers le bas)

Noter le poids de la seringue vide sur la check-list mesure du VG + VP, reporter cette valeur sur la fiche traçabilité mesure VG + VP ou sur le fichier Excel au nom du patient

## **DANS LA HOTTE A FLUX LAMINAIRE**

### **Préparation de la seringue-patient du <sup>125</sup>I-Seralb®**

Casser le vide du flacon de fractionnement avec une aiguille orange (prise d'air)

Prélever le volume total du flacon de fractionnement dans la seringue-patient à l'aide d'une aiguille à PL blanche, bien aspirer le volume contenu dans la PL puis remettre l'aiguille jaune.

### **Préparation seringue de prélèvement destinée au marquage des GR au <sup>99m</sup>Tc pour la mesure du volume globulaire**

Préparer une seringue de 10 mL héparinée avec 0,2 mL / la mettre dans un champ stérile identifié. (Rincer préalablement tout le corps de la seringue)

### **Pesée de la seringue-patient du <sup>125</sup>I-Seralb® (SARI)**

## **SUR LA PAILLASSE**

Peser la seringue-patient pleine

Noter le poids sur la check-list mesure du VG + VP, reporter sur la fiche traçabilité mesure VG + VP ou sur le fichier Excel au nom du patient

## **Dans Vénus**

Enregistrer la seringue-patient puis l'étiqueter

RADIOPHARMACIE → NOUVELLE PREPARATION → <sup>125</sup>I-Seralb®

Prendre le flacon concerné et créer une préparation pour le patient (environ 0,4 mL soit environ 0,08 MBq)

## **Prélèvement et injection**



Préparer un plateau avec la seringue de prélèvement mise dans le champ stérile identifié + la seringue de <sup>125</sup>I-Seralb® étiquetée pour injection au patient.

S'assurer que le patient ait bien reçu toutes les informations concernant les MDS

Vérifier qu'il ait bien reçu 130 mg de KI

Poser un cathéter + bouchon percutable à chaque bras

#### Sur l'un des bras

Faire la purge sur un **tube JAUNE** pour avoir l'EPO + un **tube violet** pour avoir le P0 et Ht veineux

Prélever 10 ml de sang du patient sur la seringue héparinée

Procéder à l'injection de la seringue de <sup>125</sup>I-Seralb® et faire des va et vient dans la veine afin de rincer au mieux la seringue

Noter l'heure d'injection sur la fiche de traçabilité

Conserver la seringue-patient pour le rinçage (seringue + aiguille avec capuchon)

Rincer le cathéter avec 2 mL de NaCl 0.9 %

### Traitement des échantillons

Mettre la seringue de prélèvement identifié au nom du patient à l'étuve sous agitation lente.

Incorporer dans une fiole jaugée de 20 mL identifiée au nom du patient les restes de la seringue-patient SERALB (à faire avant le T15)

Procéder au rinçage de la seringue-patient <sup>125</sup>I-Seralb® via un Falcon rempli d'eau

### Guide de prélèvement pour mesure du VP

À partir de là, 2 prélèvements doivent être fait à T15 et T30 sur le cathéter de l'autre bras.

En cas de splénomégalie ou hépatomégalie les prélèvements seront faits à T15, T30 et T60

Faire la purge avant le T15,

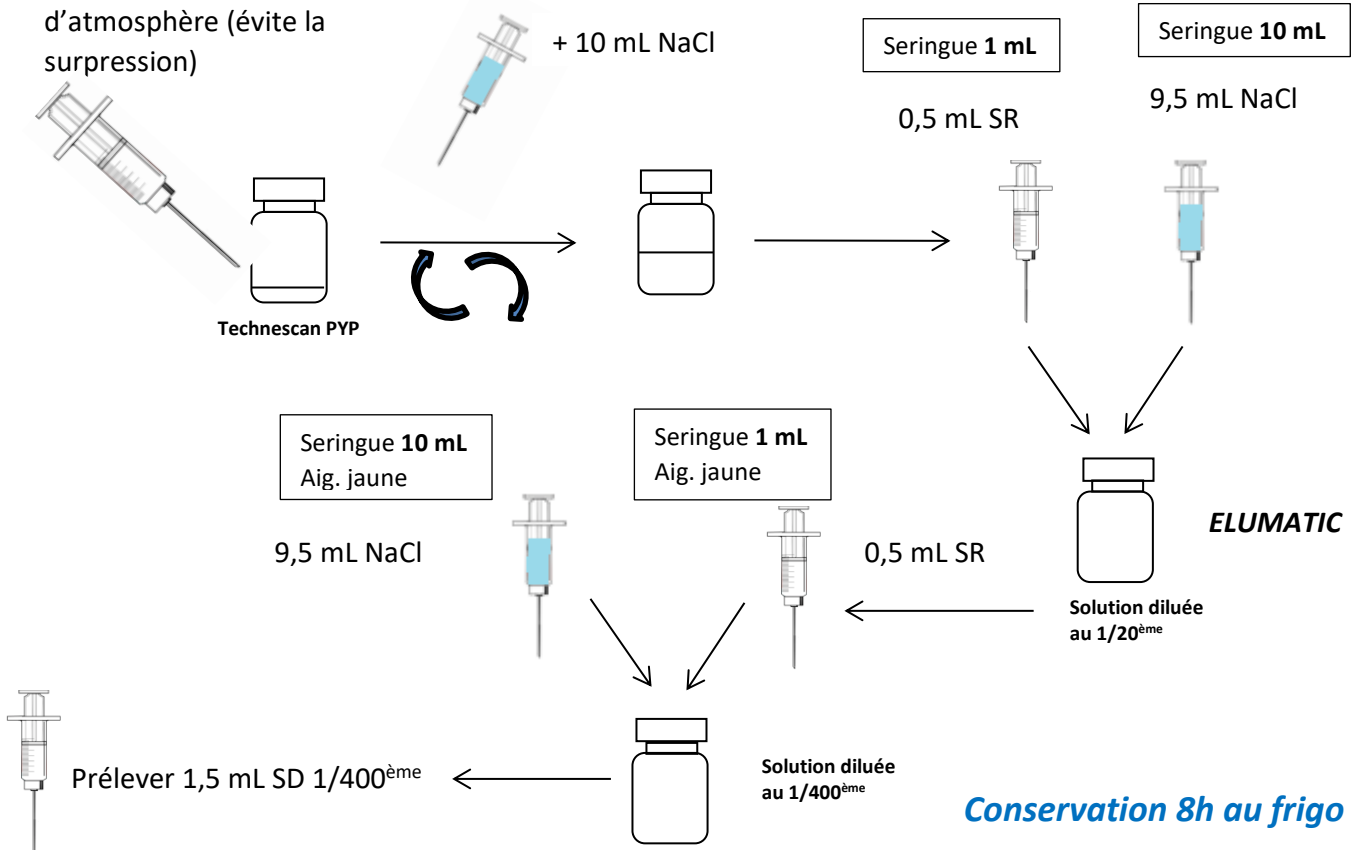
Faire l'Hématocrite sur le P0

Rincer avec 2 mL de NaCl 0.9% après le T30

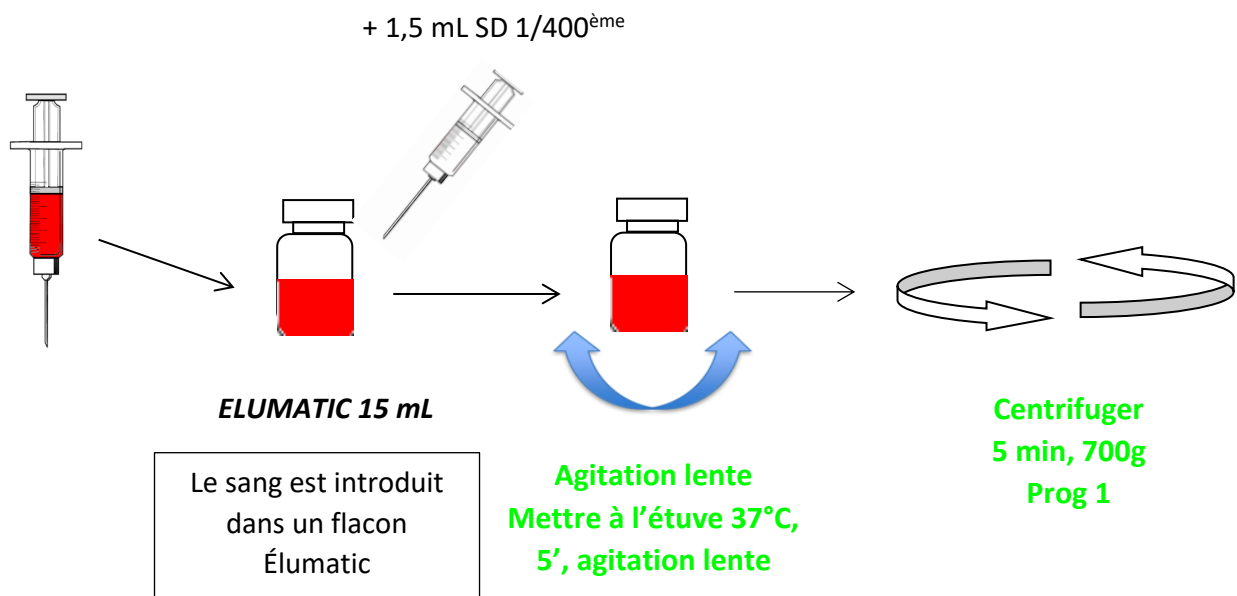
Mettre les 3 tubes de prélèvements SARI à centrifuger programme 9 (P0, T15, T30 +/- T60)

### Préparation solution diluée PYP pour marquage des GR (à faire entre T15 et T30 de la mesure du VP (SARI))

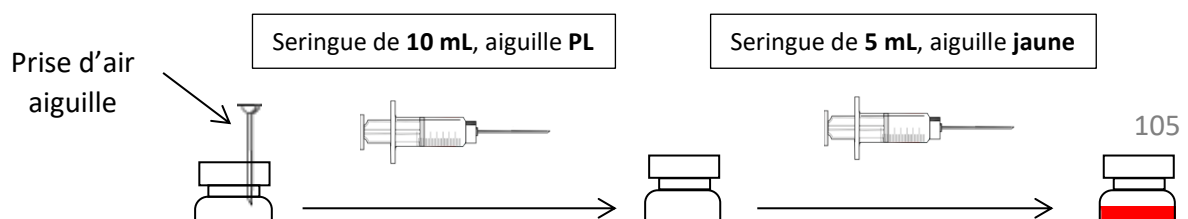
Avec une seringue de 20 mL  
Retirer préalablement 20 mL  
d'atmosphère (évite la surpression)

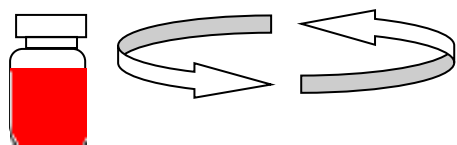


## Pré-traitement des hématies



## Lavage des hématies



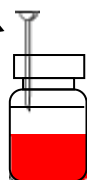


Centrifuger  
5 min, 700g

Pendant la centrifugation,  
préparer la seringue de  $^{99m}\text{TcO}^{4-}$   
en radiopharmacie  
(10 MBq dans 5 mL de NaCl 0,9%)

Remettre les cellules  
en suspension avec  
5 mL de NaCl 0,9%

Prise d'air  
Aiguille orange



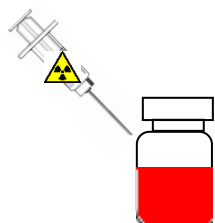
Seringue de 10 mL, aiguille PL



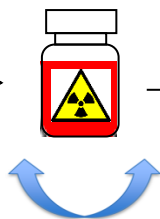
Éliminer le surnageant = excès de  $^{99m}\text{TcO}^{4-}$



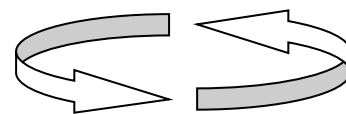
## Radiomarquage des hématies



Ajouter 10 MBq (5 mL)  
de pertechnétate  
fraichement élué



Agitation lente +  
Incubation

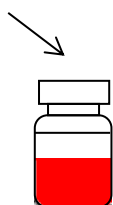


Centrifuger  
5 min, 700g  
Prog 1

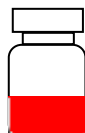
## Lavage des hématies

Pendant la centrifugation,

Peser la seringue-patient vide (seringue 5 mL + aiguille jaune) et la seringue-témoin vide  
(seringue 2 mL + aiguille bleue) et tracer les pesées



Enlever le surnageant,  
le conserver pour  
mesure à l'activimètre  
et calcul du rendement



Seringue de 5 mL, aiguille jaune





Remettre le culot globulaire en suspension avec 5 mL de NaCl 0,9%

## Préparation de la seringue-patient

Agitation lente pour bien homogénéiser le culot  
Prélever avec une aiguille blanche 2 mL pour le patient



Seringue de 5 mL,  
aiguille 20 G (jaune)

Pesée de la seringue-patiente pleine (seringue de 5 mL + aiguille jaune) et tracer la pesée.

*Mesure à l'activimètre et création de la seringue-patient dans VENUS*

*Mesure à l'activimètre du surnageant et calcul du rendement*

## Préparation de la seringue-témoin

Prélever 1 mL pour le témoin, ne pas changer l'**aiguille bleue**



Seringue de 2 mL,  
aiguille 23 G (bleue)

Pesée de la seringue pleine et tracer la pesée

Incorporer dans une fiole jaugée de 100 mL

Faire des rinçages de la seringue-témoin à l'aide du Falcon rempli d'eau

## Injection patient

Injection au patient dans le bras opposé des prélèvements

Conserver la seringue-patient pour le rinçage (seringue + aiguille avec capuchon)

Incorporer dans une fiole jaugée de 100 mL

Procéder au rinçage de la seringue-patient via un Falcon rempli d'eau

## Guide de prélèvement

Purge

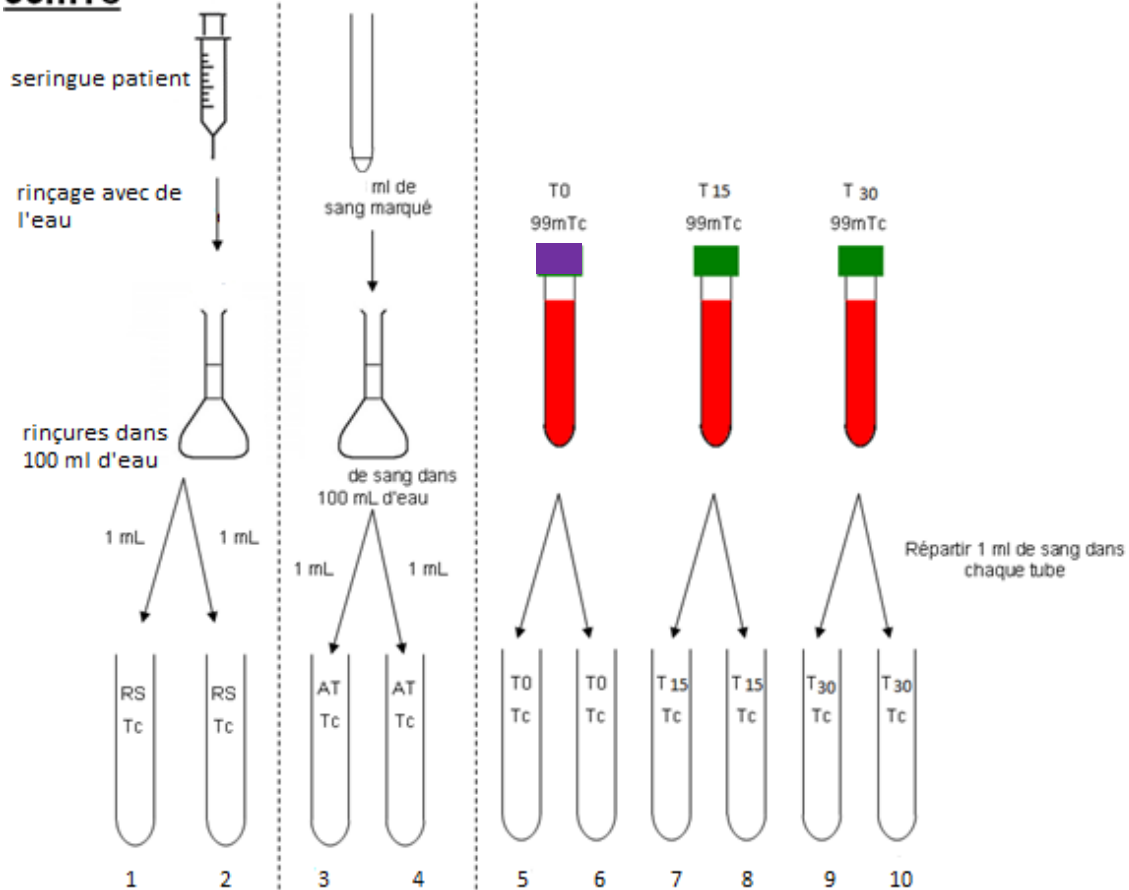
Tube violet pour P0 et Ht,

Faire prélèvement **sur un tube vert** à T15 / T30 +/- T60 en cas de splénomégalie

Entre T15 et T30, faire l'hématocrite sur le P0

## Traitement des échantillons

### 99mTc



Faire l'hématocrite sur le tube violet (P0).

Mettre un ml dans chaque tube à hémolyse, faire des doublons pour chaque prélèvement

Mise en place des tubes sur 3 racks différents

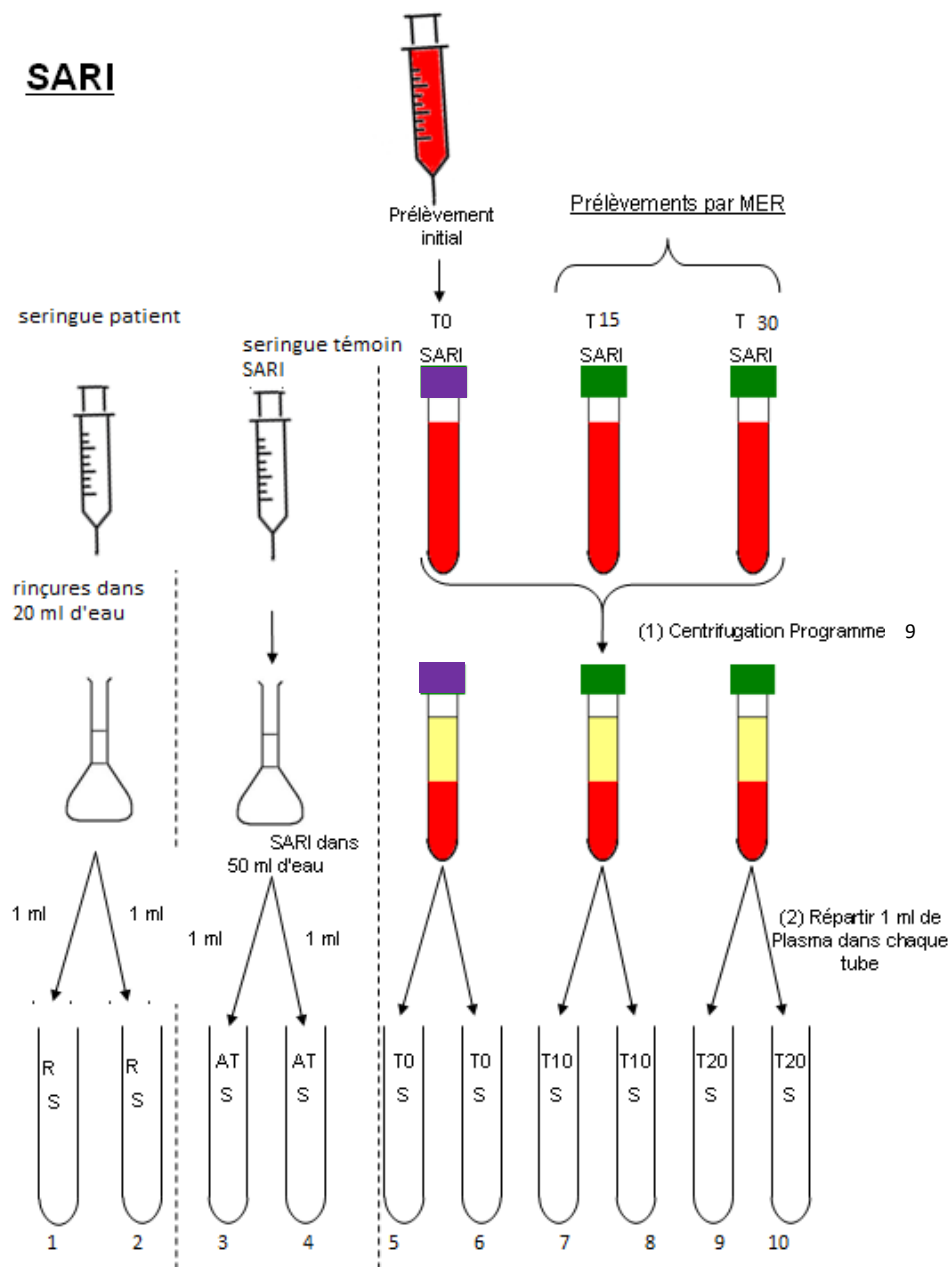
RACK 1 : témoin

RACK 2 : P0

RACK 3 : reste, T15, T30 +/- T60 si splénomégalie

Lancer le programme 1 : Masse Sanguine Tc99m (2 min par tube)

## SARI



Faire l'hématocrite sur le tube violet (P0) en premier.

Mettre les tubes T0 T15 et T30 à centrifuger avec le PROGRAMME 9 : 6 minutes 4500 trs/min 4 degré

Mettre un mL dans chaque tube à hémolyse, faire des doublons pour chaque prélèvement

Mise en place des tubes sur 3 racks différents

RACK 1 : témoin

RACK2 : P0

RACK3 : reste, T15, T30 +/- T60

Lancer le programme 2 (3 min /tube)

**FORMULAIRE DE RÉALISATION DU TRA : FRACTIONNEMENT DU <sup>125</sup>I-SERALB®**

Opérateur :

Observateur :

TRA n°

Date du TRA :

Validation de la méthode de marquage

Habilitation des opérateurs

Respect des règles de manipulation aseptique

Non-respect des règles de manipulation aseptique

I. MATÉRIEL

Matériel	Nombre
Aiguille à PL blanche	1
Aiguille bleue 23G	2
Aiguille orange 25G	1
Champ stérile	2
Compresse	15
Cône	1
Écouvillon	1*
Flacon de 10 mL de TSB = « I125-Seralb »	1
Flacon vide TC-ELU-15	3
Gélose contact	3 (+ 12*)
Gélose sédimentation	4
Marqueur	1
Pansement	3
Petit conteneur DASRI	1
Pince	1
Pipette	1
Plateau (1 grand, 1 petit-poubelle)	2
Pot plombé	3
Seringue de 5 mL	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
Tryptone sel (tube)	1

\*Prélèvements post-bionettoyage

## II. TEST DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

ITEMS		VÉRIFICATION	ÉCHANTILLONS
Laboratoire des marquages cellulaires			
1	Préparer la solution de <i>S. epidermidis</i> de façon à obtenir une concentration proche de 1000 UFC/ 20µL	<input type="checkbox"/>	
2	Nettoyer la HFL, les paillasse et la balance	<input type="checkbox"/>	Gélose contact HFL
3	Réaliser le prélèvement d'hygiène avec la gélose contact pour la HFL avant manipulation et mettre en place les géloses sédimentation pour la HFL et la paillasse pendant manipulation	<input type="checkbox"/>	
4	Désinfecter la HFL les endroits où les prélèvements ont été réalisés avec de l'AIP	<input type="checkbox"/>	
5	S'assurer de l'absence de fluorescéine en passant la HFL à la lumière UV	<input type="checkbox"/>	
6	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillement	<input type="checkbox"/>	
8	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
9	Peser une seringue de <b>5 mL</b> + aiguille bleue 23 G → « Seringue-témoin <sup>125</sup> I » vide	<input type="checkbox"/>	
7	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
10	Préparer le matériel nécessaire en respectant la procédure pour le rentrer sous la HFL	<input type="checkbox"/>	
11	Mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
12	Retirer la compresse du flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® » et les flip-offs des flacons vides	<input type="checkbox"/>	
13	Jeter les gants stériles	<input type="checkbox"/>	
14	Enlever la casaque et le masque, jeter les gants stériles et sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillement	<input type="checkbox"/>	
15	Contaminer le septum du flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® » et celui des 3 flacons vides avec 20 µL de solution de <i>S. epidermidis</i> , puis jeter le cône de prélèvement et désinfecter la pipette	<input type="checkbox"/>	
17	Remettre les flacons dans la HFL après les avoir désinfectés avec une compresse imprégnée d'AIP (sauf le septum)	<input type="checkbox"/>	
18	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillement	<input type="checkbox"/>	
19	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
20	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
21	Mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
22	Désinfecter le septum du flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® » avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
23	Mettre une aiguille orange sur le flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® » et une APL blanche	<input type="checkbox"/>	
24	Désinfecter le septum des flacons 3 vides avec une compresse imprégnée d'AIP		
25	Désadapter l'aiguille bleue ayant servi lors de la pesée de la « seringue-témoin <sup>125</sup> I » avec la pince et la poser sur une compresse (ou la garder entre les doigts)	<input type="checkbox"/>	
26	Prélever 1,5 mL d' <sup>125</sup> I-Seralb® avec la « seringue-témoin <sup>125</sup> I » + APL blanche, puis injecter ce volume dans un flacon TC-ELU-15 avec l'aiguille bleue → flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® fractionné » (x 3)	<input type="checkbox"/>	
27	Désinfecter les septums des flacons de « <sup>125</sup> I-Seralb® fractionné » avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	



28	Recouvrir les septums de ces 3 flacons avec un pansement	<input type="checkbox"/>	
29	Mettre ces 3 flacons dans des pots plombés	<input type="checkbox"/>	3 flacons de « <sup>125</sup> I-Seralb®fractionné » Flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® »
30	Prélever 1,5 mL d' <sup>125</sup> I-Seralb® avec la seringue « témoin <sup>125</sup> I » et l'APL blanche	<input type="checkbox"/>	
31	Réadapter l'aiguille bleue sur la seringue → Seringue « témoin <sup>125</sup> I » pleine	<input type="checkbox"/>	
32	Rechercher des contaminations radioactives à l'aide de la lampe UV	<input type="checkbox"/>	
33	Réaliser les prélèvements d'hygiène avec empreintes des gants stériles droit et gauche	<input type="checkbox"/>	Géloses empreintes
34	Jeter les gants stériles	<input type="checkbox"/>	
35	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
36	Peser la seringue « témoin <sup>125</sup> I » pleine	<input type="checkbox"/>	Seringue « témoin <sup>125</sup> I » pleine
37	Identifier les 3 pots avec les flacons de « <sup>125</sup> I-Seralb® fractionné »	<input type="checkbox"/>	
38	Jeter les gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
39	Sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillage	<input type="checkbox"/>	
40	Récupérer les géloses sédimentation de la HFL et de la paillasse	<input type="checkbox"/>	Géloses sédimentation HFL et paillasse
41	Réaliser le prélèvement d'hygiène avec gélose contact après manipulation dans la HFL	<input type="checkbox"/>	Gélose contact HFL
42	Humidifier l'intérieur de la HFL avec le brumisateur et rechercher des contaminations radioactives à l'aide de la lampe UV	<input type="checkbox"/>	
43	Récupérer et désinfecter tous les échantillons, puis les identifier	<input type="checkbox"/>	
44	Vider la HFL, jeter le matériel jetable, mettre à tremper le matériel réutilisable dans un bain de détergent-désinfectant	<input type="checkbox"/>	
45	Nettoyer la HFL et les paillasses avec du DD	<input type="checkbox"/>	
46	Réaliser des prélèvements d'hygiène après nettoyage et désinfecter l'endroit du prélèvement à l'aide d'AIP	<input type="checkbox"/>	Géloses contact + écouvillons

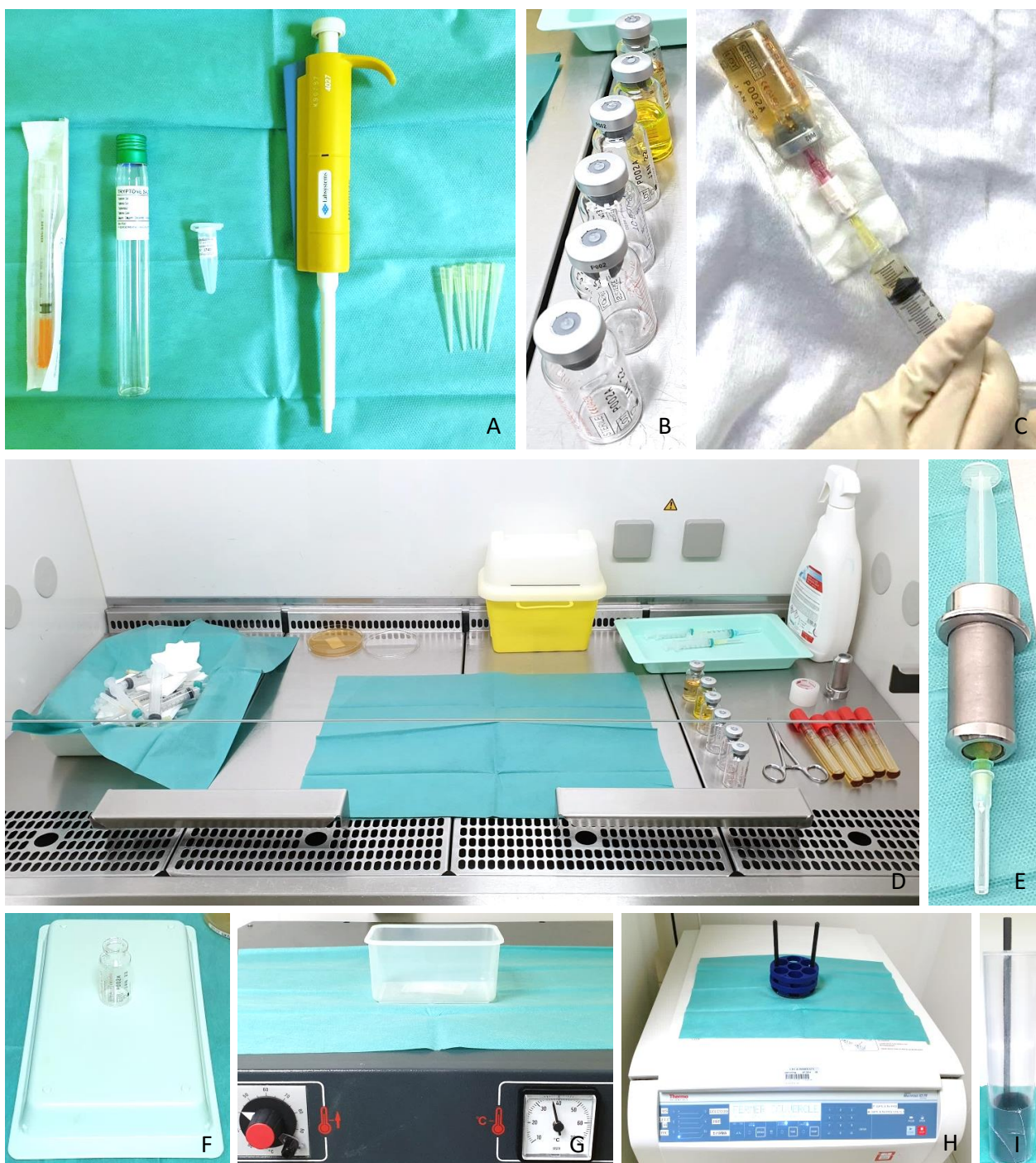
- Étapes limite défavorables
- Étapes critiques
- Étapes réalisées par l'observateur
- Étapes réalisées en présence de *Staphylococcus epidermidis*

### III. REMARQUES

Signature de l'opérateur :

Signature de l'observateur :

**Annexe 4** : photos de l'installation et de la réalisation d'un TRA n°2



A : matériel pour reconstituer et distribuer la suspension de *S. epidermidis*, B : septums des flacons contaminés, C : prélèvement du « sang » du « patient », D : organisation du matériel dans la HFL, E : seringue de fluorescéine, F : simulation de la balance, G : simulation de l'étuve, H : simulation de la centrifugeuse, I : simulation de l'activimètre

**FORMULAIRE DE RÉALISATION DU TRA : VG/VP**

Opérateur :

Observateur :

TRA n°

Date :

Validation de la méthode de marquage

Habilitation des opérateurs

Respect des règles de manipulation aseptique

Non-respect des règles de manipulation aseptique

**IV. MATÉRIEL**

Matériel	Nombre
Aiguille à PL blanche	4
Aiguille à PL noire (fluorescéine)	1
Aiguille bleue 23G (fluorescéine)	2
Aiguille jaune 20G	16
Aiguille orange 25G	4
Aiguille blanche	1
Balance (flacon)	1
Boîte = « activimètre »	1
Brumisateur	1
Champ stérile	7
Compresse	40
Cône	1
Dosette de fluorescéine (2 mg/0,4 mL)	2
Écouvillon	1*
Flacon de 10 mL de TSB + fluorescéine = « <sup>125</sup> I-Seralb® fractionné »	1
Flacon de 10 mL de TSB = « héparine »	1
Flacon de 15 mL de TSB = « patient »	1
Flacon vide TC-ELU-15	3
Flacon vide TC-ELU-5 = « PYP »	1
Gélose contact	3 (12*)
Gélose sédimentation	4
Marqueur	1
Petit conteneur DASRI	1
Pince	1
Pipette	1
Protège-seringue (5 mL)	2
Rouleau adhésif	1
Seringue de 1 mL	2
Seringue de 2 mL	1
Seringue de 5 mL (1 pour fluorescéine)	6
Seringue de 10 mL	6

Seringue de 20 mL	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
Tube de 10 mL de TSB = « NaCl 0,9 % »	6
Tube de tryptone sel	1

\*Prélèvements post-bionettoyage

## V. TEST DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

ITEMS		VÉRIFICATION	ÉCHANTILLONS
Laboratoire des marquages cellulaires			
1	Préparer la solution de <i>S. epidermidis</i> de façon à obtenir une concentration proche de 1000 UFC/ 20µL	<input type="checkbox"/>	Gélose contact HFL
2	Contaminer le septum du flacon « patient »	<input type="checkbox"/>	
3	Nettoyer la HFL, les paillasse et la balance	<input type="checkbox"/>	
4	Réaliser le prélèvement d'hygiène avec la gélose contact pour la HFL avant manipulation et mettre en place les géloses sédimentation pour la HFL et la paillasse pendant manipulation	<input type="checkbox"/>	
5	Désinfecter la HFL les endroits où les prélèvements ont été réalisés avec de l'AIP	<input type="checkbox"/>	
6	S'assurer de l'absence de fluorescéine en passant la HFL à la lumière UV	<input type="checkbox"/>	
7	Dans l'autre hotte, préparer la seringue de « <sup>99m</sup> Tc » avec 2 dosettes de fluorescéine en complétant jusqu'à 5 mL avec du TSB. Mettre un protège-seringue désinfecté	<input type="checkbox"/>	
8	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillement	<input type="checkbox"/>	
9	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
10	Peser une seringue de <b>5 mL</b> + aiguille jaune 20 G → seringue « patient <sup>125</sup> I » vide	<input type="checkbox"/>	
11	Peser une seringue de <b>5 mL</b> + aiguille jaune 20 G → seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » vide	<input type="checkbox"/>	
12	Peser une seringue de <b>5 mL</b> + aiguille bleue 23 G → seringue « témoin <sup>99m</sup> Tc » vide	<input type="checkbox"/>	
13	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
14	Préparer le matériel nécessaire en respectant la procédure pour le rentrer sous la HFL	<input type="checkbox"/>	
15	Mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
16	Retirer les flip-offs/compresses de tous les flacons	<input type="checkbox"/>	
17	Enlever la casaque et le masque, jeter les gants stériles et sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillement	<input type="checkbox"/>	
18	Contaminer le septum des flacons de PYP, d'héparine, de <sup>125</sup> I-Seralb®fractionné, et celui des 3 flacons vides (PYP dilué et préparation d'hématies radiomarquées) avec 20 µL de solution de <i>S. epidermidis</i> , puis jeter le cône de prélèvement et désinfecter la pipette	<input type="checkbox"/>	
19	Remettre les flacons dans la HFL après les avoir désinfectés avec une compresse imprégnée d'AIP (sauf le septum)	<input type="checkbox"/>	
20	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillement	<input type="checkbox"/>	
21	Mettre la casaque, le masque et des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
22	Désinfecter le septum du flacon de « PYP » avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	

23	Retirer <b>15 mL</b> d'air du flacon de « PYP » avec une seringue de 20 mL + aiguille jaune	<input type="checkbox"/>	
24	Ajouter <b>8 mL</b> de « NaCl 0,9 % » prélevé avec la même seringue de 20 mL + autre aiguille jaune et réaspirer 8 mL d'air	<input type="checkbox"/>	Tube de « NaCl 0,9 % » n°1
25	Prélever 0,5 mL de « PYP reconstitué » avec une seringue de 1 mL + aiguille jaune	<input type="checkbox"/>	Flacon de « PYP reconstitué »
26	Désinfecter le septum d'un flacon TC-ELU-15 avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
27	Dans le TC-ELU-15, ajouter les 0,5 mL de « PYP reconstitué » et <b>8 mL</b> de « NaCl 0,9 % » prélevé avec une seringue de 10 mL + aiguille jaune et réaspirer 8 mL d'air	<input type="checkbox"/>	Tube de « NaCl 0,9 % » n°2
28	Prélever 0,5 mL de « PYP dilué au 1/20 <sup>ème</sup> » avec une seringue de 1 mL + aiguille jaune	<input type="checkbox"/>	Flacon de « PYP dilué au 1/20 <sup>ème</sup> »
29	Désinfecter le septum d'un flacon TC-ELU-15 avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
30	Dans le TC-ELU-15, ajouter les 0,5 mL de « PYP dilué au 1/20 <sup>ème</sup> » et <b>8 mL</b> de « NaCl 0,9 % » prélevé avec une seringue de 10 mL + aiguille jaune et réaspirer 8 mL d'air	<input type="checkbox"/>	Tube de « NaCl 0,9 % » n°3
31	Prélever 1,5 mL de « PYP dilué au 1/400 <sup>ème</sup> » avec une seringue de 2 mL + aiguille jaune et purger	<input type="checkbox"/>	Flacon de « PYP dilué au 1/400 <sup>ème</sup> »
32	Désinfecter le septum du flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® » fractionné avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
33	Mettre une aiguille orange sur le flacon de « <sup>125</sup> I-Seralb® » fractionné	<input type="checkbox"/>	
34	Poser l'aiguille jaune ayant servi lors de la pesée de la seringue « patient <sup>125</sup> I » sur une compresse	<input type="checkbox"/>	
35	Prélever 2,5 mL de « <sup>125</sup> I-Seralb® » fractionné avec la seringue « patient <sup>125</sup> I » + APL blanche ( <b>20 secondes</b> )	<input type="checkbox"/>	Flacon <sup>125</sup> I-Seralb®
36	Réadapter l'aiguille jaune sur la seringue → seringue « patient <sup>125</sup> I » pleine à mettre dans le champ stérile plié	<input type="checkbox"/>	
37	Désinfecter le septum du flacon d'« héparine » avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
38	Prélever 0,2 mL d'« héparine » avec une seringue de 10 mL + aiguille jaune et rincer <b>x10</b> le corps de la seringue → seringue « de prélèvement »	<input type="checkbox"/>	Flacon d'« héparine »
39	Rechercher des contaminations radioactives à l'aide de la lampe UV	<input type="checkbox"/>	
40	Mettre la seringue de prélèvement dans le champ stérile plié	<input type="checkbox"/>	
41	Jeter les gants stériles, enlever la casaque et le masque	<input type="checkbox"/>	
42	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
43	Peser la seringue « patient <sup>125</sup> I » pleine	<input type="checkbox"/>	
44	Préparer un plateau avec la seringue « de prélèvement » emballée et la seringue « patient <sup>125</sup> I » pleine	<input type="checkbox"/>	Seringue « patient <sup>125</sup> I » pleine
45	Jeter les gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
46	Sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillage	<input type="checkbox"/>	
Salle de prélèvement			
47	Se frictionner les mains avec de la solution hydroalcoolique	<input type="checkbox"/>	
48	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
49	Faire une désinfection en 4 temps du septum du flacon « patient » (Hibiscrub, NaCl 0,9 %, séchage, chlorexidine alcoolique) et laisser sécher	<input type="checkbox"/>	

50	Poser un cathéter rose (20 G)	<input type="checkbox"/>	Flacon « patient »
51	Mettre une compresse en dessous	<input type="checkbox"/>	
52	Retirer le mandrin	<input type="checkbox"/>	
53	Visser un bouchon et désinfecter le septum avec une compresse imprégnée d'alcool 70 % à laisser en place	<input type="checkbox"/>	
54	Mettre un Tegaderm	<input type="checkbox"/>	
55	Jeter les gants non stériles et mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
56	Prélever 10 mL de « sang » avec la seringue « de prélèvement »	<input type="checkbox"/>	
57	Changer d'aiguille jaune	<input type="checkbox"/>	
58	Agiter doucement la seringue	<input type="checkbox"/>	
59	Jeter les gants stériles	<input type="checkbox"/>	
Laboratoire des marquages cellulaires			
60	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillage	<input type="checkbox"/>	
61	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
62	Désinfecter la seringue « de prélèvement » avec de l'AIP	<input type="checkbox"/>	
63	Mettre la seringue « de prélèvement » dans « l'étuve » pendant 1 minute	<input type="checkbox"/>	
64	Jeter les gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
65	Sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillage	<input type="checkbox"/>	
66	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillage	<input type="checkbox"/>	
67	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
68	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
69	Récupérer la seringue « de prélèvement » et la désinfecter à l'AIP	<input type="checkbox"/>	
70	Mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
71	Désinfecter le septum du flacon TC-ELU-15 avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
72	Injecter les 10 mL de « sang » dans le flacon	<input type="checkbox"/>	
73	Ajouter les 1,5 mL de « PYP dilué » dans le flacon	<input type="checkbox"/>	
74	Agiter le flacon	<input type="checkbox"/>	
75	Recouvrir le septum du flacon avec une compresse imprégnée d'AIP + adhésif	<input type="checkbox"/>	
76	Marquer le nom du « patient » sur l'adhésif	<input type="checkbox"/>	
77	Jeter les gants stériles, enlever la casaque et le masque	<input type="checkbox"/>	
78	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
79	Mettre le flacon dans « l'étuve » pendant 1 minute	<input type="checkbox"/>	
80	Mettre le flacon dans la « centrifugeuse » et le laisser pendant 1 minute	<input type="checkbox"/>	
81	Jeter les gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
82	Sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillage	<input type="checkbox"/>	
83	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillage	<input type="checkbox"/>	
84	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
85	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
86	Récupérer le flacon et le désinfecter avec une compresse imprégnée d'AIP avant de le rentrer dans la HFL	<input type="checkbox"/>	
87	Mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
88	Ouvrir la porte du laboratoire des marquages cellulaires pendant 5 minutes	<input type="checkbox"/>	

89	Retirer la compresse + adhésif du flacon	<input type="checkbox"/>	
90	Désinfecter le septum du flacon avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
91	Mettre une aiguille orange sur le flacon	<input type="checkbox"/>	
92	Aspirer 5 mL de « surnageant » avec une seringue de 10 mL + APL blanche <b>en regardant sous la vitre</b> (1 minutes)	<input type="checkbox"/>	Seringue de « surnageant » n°1
93	Retirer l'aiguille orange	<input type="checkbox"/>	
94	Prélever 5 mL de « NaCl 0,9 % » avec une seringue de 5 mL + aiguille jaune, purger et injecter dans le flacon	<input type="checkbox"/>	Tube de « NaCl 0,9 % » n°4
95	Agiter le flacon	<input type="checkbox"/>	
96	Recouvrir le septum du flacon avec la compresse + adhésif	<input type="checkbox"/>	
97	Fermer la porte du laboratoire	<input type="checkbox"/>	
98	Jeter les gants stériles, enlever la casaque et le masque	<input type="checkbox"/>	
99	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
100	Mettre le flacon dans la « centrifugeuse » et le laisser pendant 1 minute	<input type="checkbox"/>	
101	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
102	Récupérer le flacon et le désinfecter avec une compresse imprégnée d'AIP avant de le rentrer dans la HFL	<input type="checkbox"/>	
103	Désinfecter la seringue de « <sup>99m</sup> Tc » à l'AIP avant de la rentrer dans la HFL	<input type="checkbox"/>	
104	Mettre des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
105	Retirer la compresse + adhésif du flacon	<input type="checkbox"/>	
106	Enlever la casaque et le masque, jeter les gants stériles et sortir du laboratoire des marquages cellulaires en respectant la procédure d'habillage	<input type="checkbox"/>	
107	Contaminer le septum du flacon de préparation, puis jeter le cône de prélèvement et désinfecter la pipette	<input type="checkbox"/>	
108	Remettre le flacon dans la HFL après l'avoir désinfecté avec une compresse imprégnée d'AIP (sauf le septum)		
109	Entrer dans le laboratoire des marquages cellulaires en respectant les procédures d'hygiène des mains et d'habillage	<input type="checkbox"/>	
110	Mettre la casaque, le masque et des gants stériles	<input type="checkbox"/>	
111	Désinfecter le septum du flacon avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
112	Mettre une aiguille orange sur le flacon	<input type="checkbox"/>	
113	Aspirer 5 mL de « surnageant » avec une seringue de 10 mL + APL <b>blanche en regardant sous la vitre</b> (1 minute)	<input type="checkbox"/>	Seringue de « surnageant » n°2
114	Ajouter 5 mL de « <sup>99m</sup> Tc » dans le flacon, avec le protège-seringue	<input type="checkbox"/>	
115	Retirer l'aiguille orange	<input type="checkbox"/>	
116	Agiter le flacon	<input type="checkbox"/>	
117	Recouvrir le septum du flacon avec la compresse + adhésif	<input type="checkbox"/>	
118	Rechercher des contaminations radioactives à l'aide de la lampe UV (gants)	<input type="checkbox"/>	
123	Jeter les gants stériles	<input type="checkbox"/>	
124	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
125	Mettre le flacon dans « l'étuve » pendant 1 minute	<input type="checkbox"/>	
126	Mettre le flacon dans la « centrifugeuse » et le laisser pendant 1 minute	<input type="checkbox"/>	
127	Mettre une casaque et un masque	<input type="checkbox"/>	
128	Récupérer le flacon et le désinfecter avec une compresse imprégnée d'AIP avant de le rentrer dans la HFL	<input type="checkbox"/>	
129	Retirer la compresse + adhésif du flacon	<input type="checkbox"/>	

130	Désinfecter le septum du flacon avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
131	Mettre une aiguille orange sur le flacon	<input type="checkbox"/>	
132	Aspirer 5 mL de « surnageant » avec une seringue de 10 mL + APL blanche <b>en regardant sous la vitre</b> (1 minute)	<input type="checkbox"/>	Seringue de « surnageant » n°3
133	Retirer l'aiguille orange	<input type="checkbox"/>	
134	Prélever 5 mL de « NaCl 0,9 % » avec une seringue de 5 mL + aiguille jaune, purger et injecter dans le flacon	<input type="checkbox"/>	Tube de « NaCl 0,9 % » n°5
129	Aspirer autant d'air	<input type="checkbox"/>	
130	Agiter le flacon	<input type="checkbox"/>	
131	Désinfecter le septum du flacon avec une compresse imprégnée d'AIP	<input type="checkbox"/>	
132	Poser l'aiguille jaune ayant servi lors de la pesée de la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » sur une compresse	<input type="checkbox"/>	
133	Prélever <b>2,5 mL</b> de « préparation » dans le flacon par retournement avec la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » + autre aiguille blanche	<input type="checkbox"/>	
134	Réadapter l'aiguille jaune sur la seringue → seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » pleine	<input type="checkbox"/>	
135	Prélever <b>2,5 mL</b> de « préparation » dans le flacon par retournement avec la seringue « témoin <sup>99m</sup> Tc » → seringue « témoin <sup>99m</sup> Tc » pleine ( <b>sans réaspirer d'air avant</b> )	<input type="checkbox"/>	Flacon de « préparation »
136	Rechercher des contaminations radioactives à l'aide de la lampe UV (gants)	<input type="checkbox"/>	
137	Mettre la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » dans un protège-seringue	<input type="checkbox"/>	
138	Sortir les deux seringues dans le plateau du matériel stérile vidé	<input type="checkbox"/>	
139	Récupérer la gélose sédimentation de la HFL	<input type="checkbox"/>	Géloses sédimentation HFL
140	Réaliser les prélèvements d'hygiène avec empreintes des gants stériles droit et gauche	<input type="checkbox"/>	Géloses empreintes
141	Réaliser le prélèvement d'hygiène avec gélose contact après manipulation dans la HFL	<input type="checkbox"/>	Gélose contact HFL
142	Humidifier l'intérieur de la HFL avec le brumisateur hors de la HFL et rechercher des contaminations radioactives à l'aide de la lampe UV	<input type="checkbox"/>	
143	Jeter les gants stériles	<input type="checkbox"/>	
142	Mettre des gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
144	Peser la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc »	<input type="checkbox"/>	
145	Peser la seringue « témoin <sup>99m</sup> Tc »	<input type="checkbox"/>	Seringue « témoin <sup>99m</sup> Tc »
<b>Radiopharmacie</b>			
146	Déposer la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » dans un plateau à mettre dans le sas transmurale	<input type="checkbox"/>	
147	Mettre la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » dans « l'activimètre »	<input type="checkbox"/>	
148	Rapporter la seringue « patient <sup>99m</sup> Tc » dans le laboratoire des marquages	<input type="checkbox"/>	Seringue « patient <sup>99m</sup> Tc »
<b>Laboratoire des marquages cellulaires</b>			
149	Jeter les gants non stériles	<input type="checkbox"/>	
150	Récupérer la gélose sédimentation de la pailasse	<input type="checkbox"/>	Gélose sédimentat° pailasse
151	Vider la HFL, jeter le matériel jetable, mettre à tremper le matériel réutilisable dans un bain de détergent-désinfectant	<input type="checkbox"/>	



152	Nettoyer la HFL et les paillasses	<input type="checkbox"/>	Géloses contact
153	Réaliser des prélèvements d'hygiène après nettoyage et désinfecter l'endroit du prélèvement à l'aide d'AIP	<input type="checkbox"/>	



Étapes limite défavorables



Étapes critiques



Étapes réalisées par l'observateur



Étapes réalisées en présence de *Staphylococcus epidermidis*

VI. REMARQUES

Signature de l'opérateur :

Signature de l'observateur :

**Annexe 6** : grille d'évaluation pour l'audit des pratiques

N° FICHE	Sous partie 1	Sous partie 2	Critère	Item	O	N	I	NA
Fiche n°1 Modalités d'entrée dans le service de médecine nucléaire et dans le local des marquages cellulaires	Entrée dans le service de médecine nucléaire		1	Mettre une tenue de travail adaptée (pyjama propre du jour + chaussures dédiées)				
			2	Porter un dosimètre passif poitrine + bague				
			3	Porter un dosimètre opérationnel poitrine				
			4	Se laver les mains au savon				
	Entrée dans le sas du local des marquages cellulaires		5	Enlever blouse/pull...				
			6	Mettre une surblouse, une charlotte, des surchaussures ou chaussures dédiées à la salle				
			7	Contrôler la conformité de la tenue à l'aide d'un miroir				
			8	Se frictionner les mains au SHA				
			9	Respecter la délimitation zone propre/zone sale				
			10	Respecter l'asservissement des portes du sas				
	Entrée dans le local des marquages cellulaires		11	Ne pas introduire de nourriture, eau, médicament, objet personnel ou tout autre élément non nécessaire à la préparation				
			12	Absence de bijoux, alliance, montre...				
			13	Ne pas porter de maquillage/vernis				
			14	Porter un masque en cas de rhume, prendre des mesures adaptées en cas d'affection trop importante				
			15	Se frictionner les mains au SHA				
			16	Mettre des gants non stériles				
			17	Relever et tracer la température du réfrigérateur tous les matins				
Fiche n°2 Prise de RDV	Prise de RDV		18	Récupérer les demandes d'examen dans la bannette "hématologie"				
			19	Si le résultat de la recherche de mutation JAK2 ne figure pas sur la demande, le rechercher sur DxCare				
			20	Si le résultat du JAK2 n'apparaît pas sur DxCare, appeler le patient				
			21	Si le patient indique que le prélèvement a été fait, vérifier régulièrement sur DxCare				
			22	Si le patient indique que le prélèvement n'a pas été fait, appeler le médecin pour lui demander de prescrire la recherche de mutation JAK2 et lui envoyer la lettre d'information				
			23	Une fois le résultat de la recherche de mutation JAK2 obtenu, appeler le patient pour lui proposer un rdv et lui donner les consignes à respecter en vue de l'examen (à jeun sauf DID, NFS < 1mois, pas de saignée < 1 mois, βHCG ou contraception si femme en âge de procréer, pas d'examen scintigraphique la semaine précédente, examen allongé) et lui demander s'il a une splénomégalie				
			24	Transmettre la feuille de demande de rdv complétée aux secrétaires				
Fiche n°3 Réception et stockage	Réception		25	Mettre une deuxième paire de surchaussures				
			26	Mettre une deuxième surblouse				
			27	Mettre des gants				
			28	Vérifier le destinataire du colis				

			29	Vérifier la correspondance entre le bon de livraison, la liste de colisage et l'étiquette du fournisseur					
			30	Contrôler le débit de dose à un mètre et au contact du colis					
			31	Contrôler l'intégrité du colis et du conditionnement					
			32	Archiver le bon de livraison dans la pochette					
			33	Enlever les trèfles du carton d'emballage et le jeter dans le local de livraison					
			34	Enlever la deuxième paire de surchaussures					
			35	Enlever la deuxième surblouse					
			36	Contrôler l'absence de contamination surfacique grâce au contaminamètre LB124 (canal <sup>131</sup> I, < 4 Bq/cm <sup>2</sup> )					
			37	Enregistrer la réception et les contrôles sur Venus grâce aux données du fournisseur					
			Stockage	38	Jeter l'emballage dans la poubelle plombée <sup>125</sup> I				
				39	Désinfecter les 4 flacons				
				40	Placer les flacons de <sup>125</sup> I-Seralb® dans des pots plombés				
				41	Identifier les pots en les numérotant de 1 à 4				
				42	Mettre le <sup>125</sup> I-Seralb® au réfrigérateur				
				43	Stocker les produits de façon à séparer les lots et à respecter la règle du "1er à périmer, 1er à sortir"				
44	En fin de journée, réapprovisionner les consommables								
45	Contrôler mensuellement la péremption des consommables								
Fiche n°4  Modalités générales de manipulation aseptique en système ouvert	Modalités générales d'une préparation aseptique en système ouvert	46	Vérifier que la HFL est fonctionnelle						
		47	Nettoyer la HFL avant chaque manipulation						
		48	Dédier une hotte à un patient unique						
		49	Mettre une casaque et un masque						
		50	Désinfecter le matériel non stérile avec des compresses imprégnées d'alcool isopropylique 70 % avant de le mettre dans la HFL						
		51	Peler l'emballage du matériel stérile à UU au-dessus de la grille avant de le mettre dans la HFL						
		52	Installer un champ stérile sur le plan de travail						
		53	Se frictionner les mains au SHA avant de mettre des gants stériles						
		54	Mettre des gants stériles sous la HFL						
		55	Disposer de manière ordonnée l'ensemble du matériel et des produits dans la HFL						
		56	Désinfecter le septum de tous les flacons avec une compresse imprégnée d'alcool isopropylique 70% avant chaque prélèvement, injection ou ponction						
57	Ne pas toucher les zones critiques du matériel (embase des aiguilles, extrémités des seringues, septums des flacons)								
58	Ouvrir les ampoules de NaCl 0,9 % avec une compresse stérile imprégnée d'alcool isopropylique 70 %								
59	Jeter les ampoules de NaCl 0,9 % après chaque utilisation								
60	Poser les capuchons face interne vers le haut								

			61	Ne pas recapuchonner à deux mains une aiguille avant de la jeter				
			62	Ne pas désadapter les aiguilles des seringues à la main (pince)				
			63	Ne rien positionner entre le flux d'air laminaire et les zones critiques				
			64	Ne rien positionner sur les grilles d'aspiration				
			65	Seuls les éléments utiles sont présents dans la HFL				
			66	Changer de gants si doute sur une contamination (radiologique ou biologique)				
			67	Identifier les contenants au nom du patient le cas échéant				
			68	Respecter la durée de conservation des préparations				
			69	Respecter les consignes de préparation validées par le radiopharmacien				
			70	A la fin des manipulations sous hotte, enlever les gants en évitant le contact avec la surface externe des gants (pour éviter une contamination)				
Fiche n°5 Fractionnement du <sup>125</sup> I-Seralb®	Fractionnement et mise en seringue du <sup>125</sup> I-Seralb® (seringue-témoin)		71	Ne commencer le fractionnement d'un nouveau lot que lorsque le dernier flacon fractionné a été utilisé				
		72	S'assurer que la bulle est au centre de la cible et faire TARE sur la balance					
		73	Préparer le matériel selon le mode opératoire					
		74	Peser une seringue de 1 mL vide + aiguille bleue = seringue-témoin <sup>125</sup> I vide					
		75	Noter les poids mesurés sur la feuille de traçabilité du fractionnement					
		76	Retirer les flip-off des 3 flacons Elumatic et désinfecter les septums					
		77	Retirer la capsule métallique du flacon de Seralb et désinfecter le septum					
		78	Mettre une prise d'air (aiguille orange) sur le flacon de Seralb					
		79	Retirer l'aiguille bleue de la seringue de 1 mL pesée et la déposer sur une compresse					
		80	Pour les 3 Elumatics : prélever 0,4 mL de Seralb avec la seringue de 1 mL pesée + une APL blanche et introduire les 0,4 mL dans un Elumatic avec une autre aiguille bleue					
		81	Prélever tout le Seralb restant dans le flacon d'origine avec la seringue de 1 mL + APL = seringue-témoin <sup>125</sup> I					
		82	Réadapter l'aiguille bleue déposée sur la compresse sur la seringue de 1 mL					
		83	Désinfecter les septums des flacons fractionnés avec une compresse imbibée d'alcool isopropylique 70%, mettre un pansement et mettre les flacons dans des pots plombés					
		84	Identifier les pots (A, B, C)					
		85	Ranger les 3 pots dans l'espace dédié du réfrigérateur					
		86	Tracer le volume prélevé dans la seringue-témoin sur la feuille de traçabilité du fractionnement					
		87	Peser la seringue-témoin <sup>125</sup> I pleine					
		88	Tracer le poids mesuré sur la feuille de traçabilité du fractionnement					
					89	Créer la préparation de Seralb sur Venus		

			90	Créer la seringue-témoin de Seralb sur Venus, en seringue non attribuée et à partir du flacon utilisé (1, 2, 3, ou 4)				
			91	Enregistrer le fractionnement sur le tableau Excel (Sharepoint)				
			92	Injecter la seringue-témoin de <sup>125</sup> I -Seralb® dans la fiole jaugée correspondante de 50 mL				
			93	Rincer la seringue-témoin (reste) avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) en mettant l'eau de rinçage dans la fiole				
			94	Compléter la fiole au trait de jauge				
			95	Homogénéiser la fiole				
			96	Identifier la fiole avec l'étiquette Venus de la seringue-témoin et en notant dessus témoin <sup>125</sup> I en rouge				
Fiche n°6 Modalités générales de prélèvement et d'injection	Rinçage des seringues et dilution		97	Mettre au réfrigérateur la fiole témoin <sup>125</sup> I				
			98	Préparer les différents tubes Vacutainer (jaune = purge, violet = P0, vert = T15 et T30) pour les différents temps de prélèvement en les identifiant avec une étiquette-patient et en marquant les temps et l'isotope en noir pour le <sup>99m</sup> Tc et en rouge pour l' <sup>125</sup> I				
			99	Se frictionner des mains au SHA				
			100	Mettre des gants non stériles (sauf pour le prélèvement destiné à la préparation d'hématies radiomarquées et l'injection du <sup>125</sup> I-Seralb®)				
			101	Définir un bras "injection" et un bras "prélèvement"				
			102	Adapter le corps de prélèvement Vacutainer + adaptateur + aiguille si besoin				
			103	Décoller adhésif + compresse d'un côté				
			104	Désinfecter le septum du bouchon percutable à l'alcool modifié				
			105	Piquer au niveau du septum du bouchon				
			106	Adapter un tube Vacutainer pour prélever				
			107	Vérifier que le tube Vacutainer est bien rempli				
			108	A la fin du prélèvement ou de l'injection, remettre compresse + adhésif autour du bouchon				
			109	Jeter les aiguilles, adaptateurs et seringues dans le récupérateur d'aiguille (sauf aiguilles, seringues et capuchons pour <sup>99m</sup> Tc-hématies et <sup>125</sup> I -Seralb®)				
			110	Jeter les gants dans une poubelle DASRI souple à la fin du geste				
			111	Nettoyer le charriot				
			112	Sur Venus, tracer informatiquement l'injection des seringues-patients <sup>99m</sup> Tc et <sup>125</sup> I (élimination hématopoubelle externe)				
			113	Mettre le bras du patient sur un coussin bleu (facultatif)				
			114	Mettre un garrot				
			115	Faire une désinfection en 4 temps (Hibiscrub, NaCl 0,9 %, séchage, chlorexidine alcoolique)				
			116	Poser un cathéter bleu (22 G) ou rose (20 G)				
			117	Mettre une compresse en dessous				
			118	Retirer le mandrin				
			119	Visser un bouchon percutable et le désinfecter avec une compresse imbibée d'alcool modifié				

			120	Coller un Tegaderm						
			121	Rincer le cathéter qui ne va pas être utilisé tout de suite avec environ 2 mL de NaCl 0,9 % dans seringue de 2 mL + aiguille jaune (bras prélèvement)						
			122	Mettre une compresse imbibée de chlorexidine repliée autour du bouchon + adhésif						
			123	Nettoyer le coussin bleu s'il a été utilisé						
Fiche n° 7 Étude du volume globulaire	Étapes pré-marquages	Pesées n°1	124	S'assurer que la bulle est au centre de la cible et faire TARE sur la balance						
			125	Peser les seringues témoin et patient <sup>99m</sup> Tc vides						
			126	Noter les poids mesurés sur la check-list et sur la feuille de traçabilité patient						
		Préparation de la solution diluée de PYP	127	Avec une seringue de 20 mL et une aiguille jaune, retirer 20 mL d'air du flacon de PYP						
			128	Ajouter 10 mL de NaCl 0,9 % avec la seringue de 20 mL et une autre aiguille jaune						
			129	Prélever 0,5 mL de solution reconstituée avec une seringue de 1 mL + aiguille jaune						
			130	Dans un Elumatic, ajouter les 0,5 mL de PYP reconstitué et 9,5 mL de NaCl 0,9 % prélevés avec une seringue de 10 mL + aiguille jaune						
			131	Prélever 0,5 mL de solution diluée au 1/20ème avec une seringue de 1 mL + aiguille jaune						
			132	Dans un 2ème Elumatic, ajouter les 0,5 mL de PYP dilué au 1/20ème et 9,5 mL de NaCl 0,9 % prélevés avec une seringue de 10 mL + aiguille jaune → PYP dilué au 1/400ème						
			133	Créer la préparation de PYP sur Venus (scanner)						
			Mise en seringue de la solution diluée de PYP	134	Prélever 1,5 mL de solution diluée de PYP avec une seringue de 1 mL et une aiguille jaune et purger					
				135	Créer la seringue de PYP sur Venus					
	Préparation de la seringue héparinée	136	Préparer une seringue de 10 mL avec 0,2 mL d'héparine et rincer tout le corps de la seringue							
		137	La mettre dans un champ identifié							
	Prélèvement pour la préparation d'hématies radiomarquées au <sup>99m</sup> Tc	138	Vérifier que le patient est à jeun et qu'il n'a pas eu de saignée au cours du mois précédent							
		139	Mettre des gants stériles							
		140	Prélever 10 mL de sang dans une seringue de 10 mL + aiguille jaune au niveau du bras "injection"							
		141	Changer d'aiguille (jaune) et agiter doucement la seringue							
	Marquage in vitro des hématies au <sup>99m</sup> Tc	Prétraitement des hématies au PYP	142	Mettre la seringue de sang prélevé en agitation lente dans l'étuve à 37°C						
			143	Injecter les 10 mL de sang prélevé dans l'Elumatic						
144			Ajouter les 1,5 mL de PYP dilué dans l'Elumatic							
145			Agiter délicatement l'Elumatic							
146			Protéger l'Elumatic avec une compresse imprégnée d'alcool isopropylique 70 % + adhésif							
147			Marquer le nom du patient sur l'adhésif							
148			Mettre l'Elumatic dans l'étuve en agitation lente dans l'étuve pendant 5 minutes (10 minutes si patient non à jeun)							
Séparation des hématies	149	Mettre l'Elumatic (sang + PYP) dans la centrifugeuse								
	150	Équilibrer les poids								

	Lavage des hématies n°1	151	Lancer le programme 1 MS				
		152	Enlever compresse + adhésif de l'Elumatic				
		153	Mettre une prise d'air sur l'Elumatic				
		154	Avec une seringue de 10 mL + APL, aspirer tout le surnageant et le jeter				
		155	Retirer la prise d'air et l'APL				
		156	Avec une seringue de 5 mL + aiguille jaune, prélever 5 mL de NaCl 0,9 %, purger et injecter délicatement dans l'Elumatic				
		157	Agiter délicatement pour remettre le culot en suspension				
		158	Remettre compresse + adhésif				
		159	Mettre l'Elumatic (sang + PYP + NaCl 0,9 %) dans la centrifugeuse				
		160	Équilibrer les poids				
		161	Lancer le programme 1 MS				
	Préparation et mise en seringue de la préparation de $^{99m}\text{Tc}$ (radiopharmacie)	162	Prévenir le MERM de radiopharmacie suffisamment en avance				
		163	Rééluer un générateur pour avoir une élution fraîche (< 2 h)				
		164	Prélever un très petit volume d'éluat avec une seringue de 5 mL (+ APL et robinet 3 voies)				
		165	Mesurer l'activité de la seringue				
		166	Diluer avec du NaCl 0,9 % puis éliminer l'activité en surplus dans un Elumatic avec prise d'air et filtre de manière à obtenir 10 MBq $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , $\text{Na}^+$				
		167	Compléter à 5 mL avec du NaCl 0,9 %				
		168	Enregistrer informatiquement la préparation sur Venus via "Autres préparations" puis "Marquage cellulaire" (scanner)				
		169	Mettre un protège-seringue plombé				
		170	Placer la seringue dans le sas transmurale du local d'hématologie				
	Marquage des hématies au $^{99m}\text{Tc}$	171	Mettre une prise d'air sur l'Elumatic				
		172	Avec une seringue de 10 mL + APL, aspirer tout le surnageant et le jeter				
		173	Retirer la prise d'air et l'APL				
		174	Ajouter délicatement 10 MBq de $^{99m}\text{Tc}$ (5mL) dans l'Elumatic				
		175	Agiter délicatement pour remettre le culot en suspension				
		176	Remettre compresse + adhésif				
		177	Mettre l'Elumatic dans l'étuve à 37°C en agitation lente pendant 5 minutes (10 minutes si patient non à jeun)				
		178	Mettre l'Elumatic (sang + PYP + NaCl 0,9 %) dans la centrifugeuse				
		179	Équilibrer les poids				
		180	Lancer le programme 1 MS				
	Lavage des hématies n°2	181	Enlever compresse + adhésif de l'Elumatic				
		182	Mettre une prise d'air sur l'Elumatic				
183		Avec une seringue de 10 mL + APL, aspirer tout le surnageant et le garder (seringue de surnageant n°3)					
184		Retirer la prise d'air					

	Mise en seringue des hématies marquées au $^{99m}\text{Tc}$ (seringues-patient et témoin)	185	Avec une seringue de 5 mL + aiguille jaune, prélever 5 mL de NaCl 0,9 % et injecter délicatement dans l'Elumatic						
		186	Réaspirer autant d'air si surpression						
		187	Agiter délicatement pour remettre le culot en suspension						
		188	Adapter une aiguille blanche sur la seringue de 5 mL en posant l'aiguille jaune qui a servi lors de la pesée sur une compresse						
		189	Prélever 2 mL de sang dans l'Elumatic par retournement avec la seringue de 5 mL et purger						
		190	Remettre l'aiguille jaune de la pesée et mettre un protège-seringue → Seringue-patient $^{99m}\text{Tc}$						
		191	Prélever 1 mL de sang dans l'Elumatic par retournement avec une seringue de 2 mL + aiguille bleue → Seringue-témoin $^{99m}\text{Tc}$						
		192	Tracer le volume prélevé dans les seringues-témoin et patient sur la feuille de traçabilité patient						
		Étapes post-marquages	Pesées n°2	193	S'assurer que la bulle est au centre de la cible et faire TARE sur la balance				
	194			Peser les seringues-témoin et patient $^{99m}\text{Tc}$ pleines					
	195			Noter les poids mesurés sur la check-list et sur la feuille de traçabilité patient					
	Mesure de l'activité de la préparation d'hématies radiomarquées au $^{99m}\text{Tc}$		196	Sélectionner l'isotope et le conditionnement sur l'écran de l'activimètre					
			197	Mettre les flacons de MRP dans le sas d'entrée de l'enceinte s'il y en a					
			198	Vérifier le bruit de fond					
			199	Mesure de l'activité de la seringue-patient préparée (2 MBq attendus)					
			200	Enregistrer la seringue-patient sur Venus (scanner) et l'étiqueter					
			201	Mesure de l'activité de la seringue de surnageant n°3					
			202	Calcul du rendement de marquage					
	Prélèvement P0	203	Faire la purge sur un tube jaune						
		204	Jeter le tube de purge dans la poubelle $^{125}\text{I}$ du local d'hématologie						
		205	Prélever le tube P0/Ht (violet, bras "injection")						
	Injection	206	Injecter la seringue-patient $^{99m}\text{Tc}$ (bras "injection")						
		207	Rincer la seringue avec le sang du patient en faisant des aller-retours						
		208	Conservier la seringue, l'aiguille et le capuchon						
		209	Rincer le cathéter avec du NaCl 0,9%						
	Mesure de l'hématocrite	210	Passer le tube P0 au vortex						
		211	Prélever le tube P0 avec 2 tubes capillaires						
212		Sceller les 2 capillaires avec de la cire							
213		Mettre les 2 capillaires dans la centrifugeuse avec le couvercle							
214		Centrifuger 3 minutes à 12000 tr/min							
215		Mesurer l'Ht grâce aux abaques							
216		Tracer le résultat sur la feuille de traçabilité patient							
217		Vérifier la cohérence du résultat avec ceux obtenus lors du VP et sur le bilan sanguin du patient							



	Prélèvements T15 et T30		218	S'il y a plus de 2 points d'écart, refaire une mesure de l'Ht					
			219	Prélever le tube T15 (vert, bras "prélèvement")					
			220	Prélever le tube T30 (vert, bras "prélèvement")					
			221	Prélever le tube T60 (vert, bras "prélèvement") si splénomégalie					
			222	Retirer le cathéter "prélèvement"					
	Rinçage des seringues et dilutions			223	Injecter la seringue-témoin <sup>99m</sup> Tc dans la fiole jaugée de 100 mL				
				224	Rincer la seringue-témoin <sup>99m</sup> Tc avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) en mettant l'eau de rinçage dans la fiole correspondante				
				225	Compléter la fiole jusqu'au trait de jauge				
				226	Identifier la fiole avec une étiquette-patient et en notant dessus témoin <sup>99m</sup> Tc en noir				
				227	Rincer la seringue-patient (reste) <sup>99m</sup> Tc avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) en mettant l'eau de rinçage dans une fiole de 100 mL				
				228	Compléter la fiole jusqu'au trait de jauge				
				229	Identifier la fiole avec une étiquette-patient et en notant dessus reste <sup>99m</sup> Tc en noir				
				Pipetages			230	Prendre un portoir par isotope	
	231	Identifier les tubes à hémolyse en marquant dessus T/P0/R/T15/T30 et Tc en noir							
	232	Homogénéiser les fioles et les tubes Vacutainer avant tout prélèvement							
	233	Prendre la pipette 1000 µL et adapter un cône							
	234	Contrôler le volume réglé sur la pipette							
	235	Pour chaque étape, prélever et distribuer 1 mL en mode inverse dans 2 tubes à hémolyse et les boucher							
	236	Jeter le cône dans le collecteur DASRI <sup>125</sup> I à chaque changement de prélèvement							
	γ-comptages			237	Effectuer le contrôle qualité du γ-compteur à l'aide de la source de césium (tous les lundi)				
				238	Mettre les tubes à hémolyses sur le rack correspondant au programme 1 dans l'ordre suivant : Témoin, P0, Reste, T15 et T30				
				239	Positionner le rack sur le γ-compteur				
				240	Mettre le rack STOP				
241				Lancer le comptage					
Fiche n°8 Étude du volume plasmatique	Pesée n°1		242	S'assurer que la bulle est au centre de la cible et faire TARE sur la balance					
			243	Peser la seringue-patient <sup>125</sup> I vide					
			244	Noter le poids mesuré sur la check-list et sur la feuille de traçabilité patient					
	Mise en seringue du Seralb-I125 (seringue- patient)			245	Mettre une prise d'air sur le flacon de fractionnement				
				246	Adapter une APL blanche sur la seringue de 1 mL en posant l'aiguille jaune qui a servi lors de la pesée sur une compresse				
				247	Prélever le volume total du flacon de fractionnement avec la seringue-patient + une APL blanche				
				248	Aspirer le volume contenu dans l'APL puis remettre l'aiguille jaune et purger				

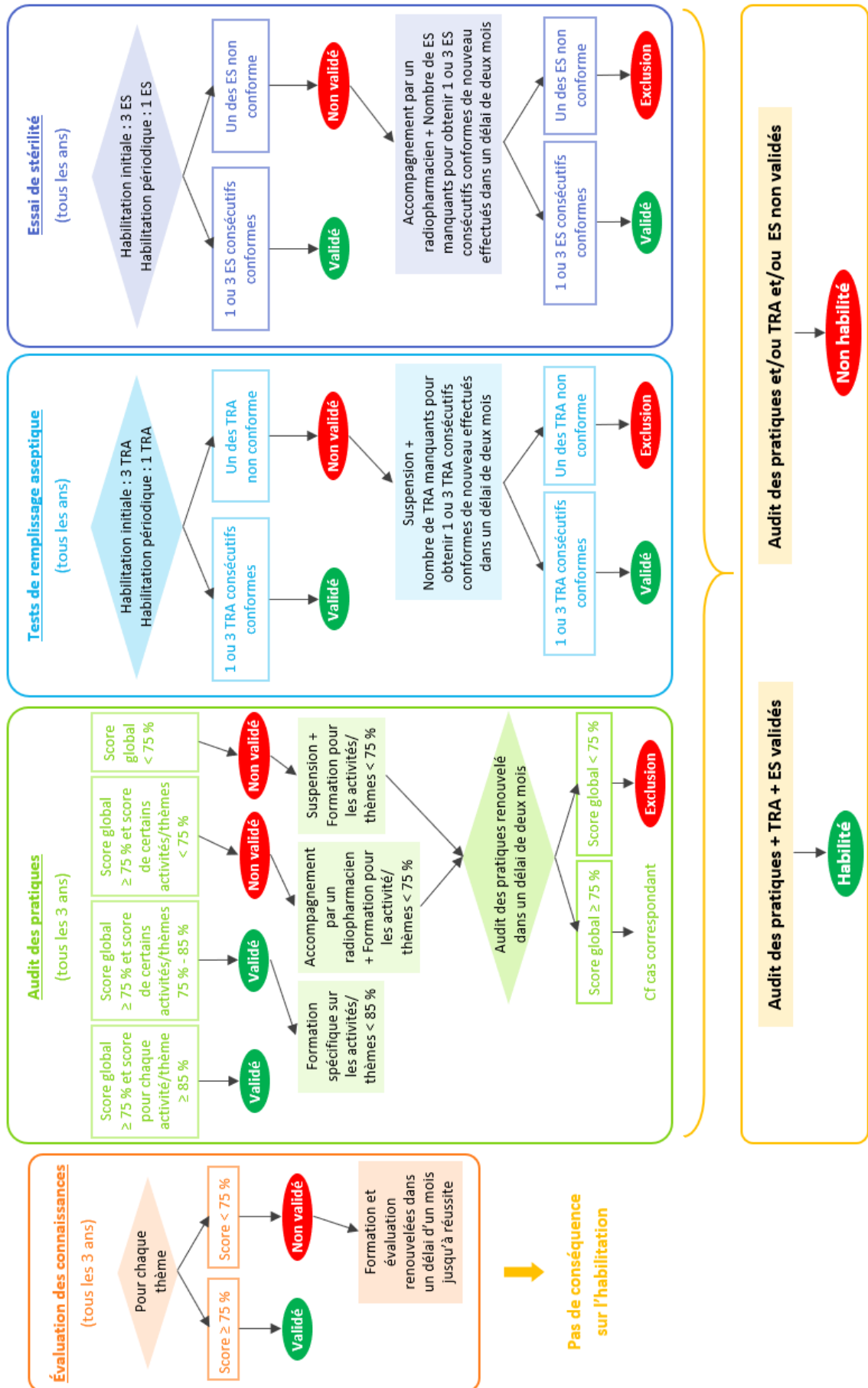
		249	La mettre dans un champ identifié				
		250	Créer la préparation de Seralb				
		251	Créer la seringue-patient de Seralb sur Venus (scanner) et l'étiqueter				
		252	Tracer le volume prélevé dans la seringue-patient sur la feuille de traçabilité patient et sur la check-list				
	Pesée n°2	253	S'assurer que la bulle est au centre de la cible et faire TARE sur la balance				
		254	Peser la seringue-patient <sup>125</sup> I pleine				
		255	Noter le poids mesuré sur la check-list et sur la feuille de traçabilité patient				
	Prélèvement PO	256	Vérifier que le patient a reçu les informations spécifiques aux MDS et que les 2 comprimés de KI lui ont été administrés				
		257	Faire la purge sur un tube jaune				
		258	Conserver le tube jaune au réfrigérateur pour envoi si un dosage de l'EPO est nécessaire				
		259	Prélever le tube PO/Ht (violet, bras "injection")				
	Injection	260	Injecter la seringue-patient <sup>125</sup> I -Seralb® (bras injection)				
		261	Rincer la seringue avec le sang du patient en faisant des aller-retours				
		262	Rincer le cathéter avec 2 mL de NaCl dans seringue de 2 mL + aiguille jaune				
		263	Conserver la seringue, l'aiguille et le capuchon				
		264	Rincer le cathéter avec du NaCl 0,9%				
		265	Retirer le cathéter "injection"				
	Mesure de l'hématocrite	266	Passer le tube PO au vortex				
		267	Prélever le tube PO avec 2 tubes capillaires				
		268	Sceller les 2 capillaires avec de la cire				
		269	Mettre les 2 capillaires dans la centrifugeuse avec le couvercle				
		270	Centrifuger 3 minutes à 12000 tr/min				
		271	Mesurer l'Ht grâce aux abaques				
		272	Tracer le résultat sur la feuille de traçabilité				
		273	Vérifier la cohérence du résultat avec celui figurant sur le bilan sanguin du patient				
		274	S'il y a plus de 2 points d'écart, refaire une mesure de l'Ht				
	Prélèvements T15 et T30	275	Prélever le tube T15 (vert, bras "prélèvement")				
		276	Prélever le tube T30 (vert, bras "prélèvement")				
		277	Prélever le tube T60 (vert, bras "prélèvement") si splénomégalie				
	Rinçage des seringues et dilutions	278	Rincer la seringue-patient <sup>125</sup> I (reste) avec toute l'eau du robinet contenue dans un Falcon (x 3-4) et mettant l'eau de rinçage dans une fiole de 20 mL				
		279	Compléter la fiole jusqu'au trait de jauge				
		280	Identifier la fiole avec une étiquette-patient et en notant dessus reste <sup>125</sup> I en rouge				
	Pipetages	281	Mettre les tubes Vacutainer <sup>125</sup> I (PO, T15, T30) dans la centrifugeuse et équilibrer les poids				
		282	Lancer le programme 9				
		283	Prendre un portoir par isotope				
		284	Identifier les tubes à hémolyse en marquant dessus T/PO/R/T15/T30 et I/Tc en rouge				
		285	Homogénéiser les fioles avant tout prélèvement				
		286	Prendre la pipette 1000 µL et adapter un cône				
		287	Contrôler le volume réglé sur la pipette				
		288	Pour chaque étape, prélever et distribuer 1 mL en mode inverse dans 2 tubes à hémolyse et les boucher				

			289	Jeter le cône dans le collecteur DASRI <sup>125</sup> à chaque changement de prélèvement				
			y-comptages		290	Mettre les tubes à hémolyses sur le rack correspondant au programme 2 dans l'ordre suivant : Témoin, P0, Reste, T15 et T30		
291	Positionner les racks sur le $\gamma$ -compteur							
292	Mettre le rack STOP							
293	Lancer le comptage							
Laboratoire de marquage cellulaire en début de journée	294	Faire couler l'eau du robinet des éviers froids (sas et laboratoire) pendant 2 minutes						
	295	Apporter les flacons de DDD et DD						
	296	Préparer un bain de détergent/désinfectant en début d'activité						
	297	Avec des chiffons à UU imprégnés de DD essuyer les paillasses, le sas transmural, l'évier et les robinetteries, l'étuve, les centrifugeuses						
	298	Nettoyer la balance et le flacon Elumatic avec de l'alcool isopropylique 70 %						
	Laboratoire de marquage cellulaire en fin d'activité	299	Avec des chiffons à UU imprégnés de DDD puis DD, essuyer les paillasses, le bac de désinfection du matériel, les centrifugeuses, l'étuve, les poubelles plombées, l'écran et la tour de l'ordinateur, le clavier, les câbles, le téléphone, le bureau, les chaises, le marchepied, le sas transmural					
		300	Faire tremper le matériel utilisé pendant 15 minutes dans le bain de DD puis rincer					
		301	Compléter la fiche de traçabilité du bionettoyage					
		302	Jeter les chiffons utilisés dans la poubelle adaptée					
		303	Rapporter les flacons de DD et DDD à l'unité de ménage					
		HFL en début de journée	304	Mettre une nouvelle casaque et un nouveau masque				
			305	Mettre des gants stériles				
	306		Essuyer le plan de travail avec des compresses stériles imprégnées de DD					
	HFL en fin d'activité	307	Retirer l'ensemble des éléments présents dans la HFL					
		308	Mettre une nouvelle casaque et un nouveau masque					
309		Mettre des gants stériles						
310		Remonter la vitre frontale au maximum						
311		Essuyer avec des compresses stériles imbibées (DDD puis DD) en partant du haut vers le bas, et de l'arrière vers la façade de la hotte (plaques du plan de travail, parois intérieures, plan horizontal sous les plaques, appui-bras, vitre intérieure)						
312		Essuyer la vitre (intérieur puis extérieur avec des compresses stériles imprégnées d'alcool isopropylique 70%)						
313		Mettre le commutateur en position "veille"						
314		Allumer les UV bactéricides						
315		Essuyer les parois extérieures de la HFL avec un chiffon à UU imprégné (DDD puis DD)						
316		Jeter les compresses et chiffons utilisés dans la poubelle adaptée						
Bionettoyage hebdomadaire	317	Nettoyer la microcentrifugeuse						
	318	Nettoyer les étagères du sas d'habillage						
Bionettoyage mensuel	Laboratoire de marquage cellulaire	319	Nettoyer le réfrigérateur					
		320	Nettoyer l'intérieur des placards avec du DDD					
	Étuve	321	Vider l'étuve					
		322	Mettre l'étuve hors-tension et la débrancher					


			323	Essuyer les surfaces internes puis les parois externes, la porte et la poignée avec des chiffons à UU imprégnés de DDD puis de DD				
			324	Jeter les chiffons utilisés dans la poubelle plombée adaptée				
			325	Laisser sécher l'intérieur de l'étuve avant de refermer la porte				
			326	Rebrancher et remettre sous-tension l'étuve				
			327	Vérifier la température (37°C) à distance				
Fiche n°10 Gestion des déchets	Modalités générales de la gestion des déchets		328	Jeter les matériaux coupants/piquants + seringues dans des collecteurs DASRI				
			329	Jeter le matériel solide ou mou susceptible d'être contaminé dans un sac DASRI				
			330	Ne pas dépasser la capacité maximale de remplissage des différents contenant DASRI				
			331	Fermer définitivement les contenants DASRI avant entreposage				
		332	Réaliser une mesure du bruit de fond avant chaque mesure de la radioactivité					
		333	Trier les déchets non coupants, non susceptibles d'être contaminés et non DASRI et les éliminer par les voies des déchets conventionnels après les avoir comptés					
		334	Tracer le résultat du comptage sur la feuille de traçabilité correspondante					
		Gestion des déchets radioactifs		335	Manipuler les déchets radioactifs avec des gants			
	336		Pour aller au bunker mettre une deuxième paire de surchaussures et une deuxième surblouse					
	337		Après chaque utilisation des collecteurs DASRI ( <sup>99m</sup> Tc ou <sup>125</sup> I), écrire dessus l'isotope et la date de fermeture, et les mettre en décroissance dans les caisses bleues correspondantes du bunker					
	338		Changer et mettre en décroissance les poubelles DASRI ( <sup>99m</sup> Tc ou <sup>125</sup> I) quand elles sont pleines					
	339		Tous les lundis (après un délai correspondant à 10 périodes radioactives), jeter les boîtes DASRI <sup>99m</sup> Tc de la semaine précédente après les avoir comptées					
	340		Si l'activité résiduelle est supérieure au double du bruit de fond, les déchets sont remis en décroissance					
			341	Identifier les déchets radioactifs avec une étiquette Venus (sauf pour les collecteurs DASRI)				
			342	Tracer informatiquement la mise en décroissance et l'élimination des déchets radioactifs sur Vénus (sauf pour les collecteurs DASRI)				
Fiche n°11 Modalités de sortie du local des marquages cellulaires et du service de médecine nucléaire	Sortie temporaire du local de marquage cellulaire		343	Jeter les gants dans la poubelle adaptée				
			344	Dans le sas, enlever surblouse, charlotte, surchaussures				
			345	Réaliser une mesure de la radioactivité au compteur mains-pieds si sortie pour une pause-repas				
	Sortie définitive du local de marquage cellulaire		346	Jeter les gants dans la poubelle adaptée				
			347	Dans le sas, enlever surblouse, charlotte, surchaussures				
			348	Mettre surblouse dans le panier "linge sale"				
		349	Réaliser une mesure de la radioactivité au compteur mains-pieds					
	Sortie du service de médecine nucléaire		350	Reposer le dosimètre opérationnel sur la borne				
		351	Ranger les dosimètres passifs poitrine + bague					
		352	Remettre sa tenue civile					
		353	Mettre sa tenue de travail dans le panier "linge sale"					

**Annexe 7** : arbre décisionnel pour l'habilitation des opérateurs au poste de la mesure isotopique des volumes sanguins

**HABILITATION DES OPÉRATEURS AU POSTE DE LA MESURE ISOTOPIQUE DES VOLUMES SANGUINS**



**Annexe 8** : certificat d'habilitation des opérateurs pour la mesure isotopique des volumes sanguins

	Entité d'application : Service de Médecine Nucléaire Sud et Pellegrin Emetteur : Service de Médecine Nucléaire Sud et Pellegrin	EN-RIS-00X
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Ind : 01 Page : 1/2
<b>Habilitation des opérateurs pour la mesure isotopique des volumes sanguins</b>		

Date :

Prénom, nom de l'opérateur évalué :

Nom du radiopharmacien habilitant :

Nom des tuteurs :

Date d'arrivée dans l'unité d'hématologie isotopique :

Habilitation  Initiale  Périodique

**Résultats de l'évaluation des connaissances :**

Thème	Résultat de l'évaluation initiale	Résultat de l'évaluation finale	Progression
Hygiène en radiopharmacie	47,3 %	76 %	28,8 %
Mesure des volumes sanguins	22,5 %	93,8 %	71,3 %
Maladie de Vaquez	42,5 %	98,8 %	56,3 %
Bonnes pratiques de pipetage	45 %	92,5 %	47,5 %

**Résultats de l'audit des pratiques :**  Validé  Non validé  Non applicable


Résultat global : 93 %

Résultats par activité :

Entrée	97%
Prise de RDV	100%
Réception et stockage	88%
Manipulation aseptique	94%
Fractionnement Seralb	94%
Prélèvement et injection	94%
VG	94%
VP	92%
Bionettoyage	94%
Déchets	92%
Sortie	91%

Résultats par thème :

Administratif	100%
Analytique	95%
Circuit	100%
Contrôles	77%
Déchets	90%
Matériel et équipement	99%
Hygiène	93%
Injection	98%
Mise en seringue	89%
Organisation	93%
Prélèvement	96%
Préparation	94%
Radioprotection	88%
Traçabilité	93%

	Entité d'application : Service de Médecine Nucléaire Sud et Pellegrin Emetteur : Service de Médecine Nucléaire Sud et Pellegrin	EN-RIS-00X
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Ind : 01 Page : 2/2
<b>Habilitation des opérateurs pour la mesure isotopique des volumes sanguins</b>		

**Résultats des tests de remplissage aseptique :**

TRA n°1 (fractionnement du <sup>125</sup>I-Seralb®)     Validé     Non validé  
 TRA n°2 (mise en seringue du <sup>125</sup>I-Seralb® et préparation des <sup>99m</sup>Tc-hématies)     Validé     Non validé

TRA	Résultats		
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
N°1	Conforme	Conforme	Conforme
N°2	Conforme	Conforme	Conforme

**Résultats des essais de stérilité de la préparation d'<sup>99m</sup>Tc-hématies :**     Validé     Non validé

Essai de stérilité	Résultats		
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
Essai de stérilité	Conforme	Conforme	Conforme

**Auto-évaluation**

**Attestation de validation**

**Prénom, nom :**

**Statut :** MERM     CDI     CDD     Intérimaire (durée :    )

Je soussignée, **Valérie POTTIER**, responsable de l'activité de marquage cellulaire radioisotopique, atteste que la personne mentionnée ci-dessus est habilité au poste concernant la mesure des volumes sanguins. Je donne donc mon accord pour son intervention en vue de la réalisation de cet examen.

**Date :**

Signature de l'intéressé	Signature du cadre	Signature du radiopharmacien

## TABLES DES MATIÈRES

Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des acronymes et abréviations .....	13
Introduction.....	15
Première partie : marquages cellulaires radioisotopiques et asepsie des préparations .....	17
I. Préparations réalisées en médecine nucléaire .....	19
1. Médecine nucléaire et radiopharmacie.....	19
2. Préparations radiopharmaceutiques et marquages cellulaires radioisotopiques....	19
A. MRP prêts à l'emploi.....	21
B. MRP réalisés à partir de trousse et de précurseurs .....	21
C. Marquages cellulaires radioisotopiques.....	21
3. Conditions requises pour la préparation de marquages cellulaires radioisotopiques	
.....	23
A. Locaux et équipements.....	23
B. Personnel .....	25
a) Hygiène et sécurité.....	25
b) Formation et habilitation .....	25
II. Mesure isotopique des volumes sanguins .....	26
1. Généralités .....	26
2. Déroulement de l'examen en double isotope au CHU de Bordeaux .....	28
A. Ciblage des patients.....	28
B. Accueil des patients .....	29
C. Mesure du volume plasmatique .....	29
D. Détermination du volume globulaire .....	30
3. Interprétation des résultats de la mesure des volumes sanguins .....	32
A. Mesure du volume sanguin total.....	32
B. Détermination du volume globulaire .....	32
C. Mesure du volume plasmatique .....	33



III. Contrôle de l'asepsie des préparations injectables.....	34
1. Test de remplissage aseptique.....	34
2. Essai de stérilité.....	36
Deuxième partie : développement et application de tests de remplissage aseptique .....	39
I. Enquête nationale .....	41
II. Développement de tests de remplissage aseptique .....	41
1. Matériel et méthode.....	41
A. Matériel .....	41
B. Méthode .....	42
a) Mise au point du protocole de TRA.....	42
• TRA n° 1 : fractionnement du $^{125}\text{I}$ -Seralb® .....	44
• TRA n°2 : mise en seringue du $^{125}\text{I}$ -Seralb® et marquage radioisotopique des hématies au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	45
• Maîtrise de l'environnement .....	46
b) Validation de la méthodologie des TRA .....	48
• Fractionnement du TSB et test de stérilité .....	48
• Test de fertilité du TSB .....	48
• Test de fertilité du TSB + fluorescéine .....	49
2. Résultats.....	50
Validation de la méthodologie des TRA.....	50
a) Reconditionnement du TSB $\pm$ fluorescéine et test de stérilité .....	50
b) Test de fertilité du TSB .....	50
c) Test de fertilité du TSB + fluorescéine.....	50
III. Validation de l'asepsie des procédés de préparation requis pour la mesure des volumes sanguins .....	51
1. Méthode.....	51
2. Résultats.....	51
A. 1 <sup>ère</sup> partie : TRA du procédé de fractionnement du $^{125}\text{I}$ -Seralb® .....	52
B. 2 <sup>ème</sup> partie : TRA du procédé de mise en seringue du $^{125}\text{I}$ -Seralb® et de marquage radioisotopique des hématies au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	52
C. Maîtrise de l'environnement .....	52

IV. Habilitation des opérateurs.....	52
1. Méthode.....	53
2. Résultats.....	53
V. Discussion .....	53
Troisième partie : développement et application d'un essai de stérilité .....	57
I. Enquête nationale .....	59
II. Développement d'un essai de stérilité pour la préparation d' <sup>99m</sup> Tc-hématies.....	59
1. Matériel et méthode.....	59
A. Matériel .....	59
B. Méthode .....	60
a) Mise au point du protocole de l'essai de stérilité .....	60
b) Validation de la méthodologie de l'essai de stérilité .....	63
• Test de stérilité.....	63
• Test de fertilité.....	63
• Test d'applicabilité ou recherche d'effet inhibiteur .....	64
• Limite de détection .....	65
• Exactitude.....	66
• Robustesse .....	66
2. Résultats.....	66
A. Validation de la méthodologie de l'essai de stérilité.....	66
a) Test de stérilité.....	66
b) Test de fertilité .....	66
c) Test d'applicabilité ou recherche d'effet inhibiteur.....	67
d) Limite de détection.....	70
e) Exactitude .....	70
f) Robustesse.....	70
B. Ajustement du protocole de l'essai de stérilité.....	71
III. Validation de l'asepsie des procédés de préparation requis pour la mesure des volumes sanguins.....	72
1. Méthode.....	72
2. Résultats.....	73

IV. Habilitation des opérateurs.....	73
1. Méthode.....	73
2. Résultats.....	73
V. Discussion .....	74
 Quatrième partie : développement et application d'une évaluation des connaissances et des pratiques .....	 77
I. Évaluation des connaissances .....	79
1. Matériel et méthode.....	79
2. Résultats.....	80
A. Thème « hygiène en radiopharmacie avec un focus sur les marquages cellulaires radioisotopiques » .....	80
B. Thème « mesure des volumes sanguins » .....	80
C. Thème « maladie de Vaquez ».....	80
D. Thème « bonnes pratiques de pipetage » .....	81
II. Évaluation des pratiques .....	81
1. Introduction .....	82
2. Matériel et méthode.....	82
3. Résultats.....	84
III. Discussion .....	90
 Conclusion .....	 93
 Références bibliographiques.....	 95
 Annexes .....	 99

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.





## Mesure isotopique des volumes sanguins : validation de l'asepsie des préparations requises et habilitation des opérateurs impliqués

En médecine nucléaire, des marquages cellulaires radioisotopiques sont réalisés pour certains examens comme la mesure isotopique des volumes sanguins.

Au CHU de Bordeaux, suite à l'arrêt de commercialisation du chrome-51, une nouvelle méthode a été mise en place pour cet examen : des hématies autologues radiomarquées au technétium-99 métastable sont maintenant utilisées pour la mesure du volume globulaire et de l'albumine humaine radiomarquée à l'iode-125 est utilisée pour la mesure du volume plasmatique.

Les procédés de préparation aseptique impliqués sont complexes et multi-étapes. Ils sont réalisés en système ouvert et comportent donc un risque élevé de contamination microbiologique.

Dans le cadre d'une démarche d'assurance qualité et de sécurisation de la prise en charge des patients, nous avons souhaité nous assurer de la maîtrise de la contamination microbiologique de nos préparations. Pour cela, nous avons validé l'asepsie de nos procédés de préparation grâce au développement de deux tests de remplissage aseptiques challengés et d'un essai de stérilité par méthode alternative rapide, adapté à la préparation d'hématies radiomarquées au technétium-99 métastable.

Par ailleurs, dans notre service, la mesure isotopique des volumes sanguins est déléguée à des manipulateurs en électroradiologie médicale, sous la responsabilité technique des radiopharmaciens. Nous avons donc créé et appliqué un programme d'habilitation pour les opérateurs. Il comporte des formations théoriques, la mise en œuvre des tests de remplissage aseptique et de l'essai de stérilité développés, ainsi qu'un audit des pratiques s'appuyant sur un support d'évaluation adapté à tout le circuit de la mesure isotopique des volumes sanguins.

**Mots clés :** radiopharmacie, marquages cellulaires radioisotopiques, test de remplissage aseptique, essai de stérilité, habilitation, assurance qualité



## Isotopic measurement of blood volumes: validation of the required preparations' asepsis and qualification of the operators involved

In nuclear medicine, radioisotopic cell labelling is carried out for some examinations such as isotopic measurement of blood volumes.

At the University Hospital of Bordeaux, following the marketing withdrawal of chromium-51, a new method was implemented for this examination: autologous red blood cells radiolabelled with metastable technetium-99 are now used for the measurement of red blood cell volume and human albumin radiolabelled with iodine-125 is used for the measurement of plasma volume.

The aseptic preparation processes involved are complex and multi-step. They are performed in an open system and therefore carry a high risk of microbiological contamination.

As part of a quality assurance approach and securing patient care, we wanted to ensure the control of our preparations' microbiological contamination. To do so, we validated the asepsis of our preparation processes through the development of two challenged aseptic simulation tests and a sterility test with a rapid alternative method adapted to the preparation of red blood cells radiolabelled with metastable technetium-99.

In addition, in our department, isotopic measurement of blood volumes is delegated to nuclear medicine technologists, under the technical responsibility of radiopharmacists. We therefore created and implemented a qualification program for operators. It includes a theoretical training, the execution of the aseptic simulation tests and the sterility test developed, as well as an audit of practices based on an evaluation grid adapted to the entire circuit of blood volumes' isotopic measurement.

**Keywords:** radiopharmacy, radioisotopic cell labelling, aseptic simulation test, sterility test, qualification, quality assurance