

Contrôle et maintenance des micropipettes et des dispensers

M.F. NAJJAR*

* Laboratoire de Biochimie- Toxicologie. CHU Fattouma Bourguiba Monastir

Résumé : Les micropipettes constituent des instruments de transfert d'une quantité de volume préfixée d'un récipient à un autre. Elles font partie intégrante de la chaîne analytique dans un laboratoire de biologie clinique et sont en tête de liste des instruments volumétriques à piston et / ou à plongeur (IVAP) avec les dispensers, les diluteurs et les burettes à déplacement.

Leur intégration dans le programme d'assurance qualité globale contribue à une meilleure précision et exactitude des résultats. De simples gestes périodiques et continus de calibration et de maintenance de ces instruments apportent de meilleures performances des tolérances et augmentent leur longévité. L'automatisation, de plus en plus fréquente des laboratoires, ne doit en aucun cas négliger les différents contrôles et la maintenance préventive et corrective des micropipettes.

Mots-clés : *Micropipettes, IVAP, contrôle, maintenance.*

Les systèmes de pipetage constituent un maillon important de la chaîne analytique, au même titre que les autres instruments de mesure au laboratoire.

Les instruments volumétriques à piston et/ou à plongeur (IVAP) sont omniprésents dans tous les laboratoires et comportent principalement les micropipettes, les dispensers, les diluteurs et les burettes à déplacement.

Ces petits instruments de précision sont à l'origine de la plupart des résultats et concourent à l'intégrité de la chaîne analytique, donc à la fiabilité et à la justesse des résultats.

Leur intégration au sein des procédures d'assurance qualité témoigne de l'importance de leurs performances sur tous les plans : justesse, répétabilité, fiabilité et longévité. Pour être pratique, nous prenons comme exemple les micropipettes dans la suite du texte en sachant que toutes les procédures de contrôle sont identiques pour les autres IVAP.

Rappels sur le fonctionnement

- Le fonctionnement des micropipettes peut être manuel ou mécanique (électrique ou pneumatique)
- Le déplacement du liquide peut être fait :

a) Par une interface d'air → micropipettes à déplacement d'air (Figure 1). Elles sont utilisées surtout pour les solutions aqueuses. Le liquide à prélever est en contact avec l'air.

b) Par contact avec le piston → micropipettes à déplacement positif (Figure 2). Elles sont utilisées pour les liquides visqueux, volatils, denses ou présentant un risque de contamination. Le liquide à prélever est en contact avec le bout du piston.

La procédure de pipetage peut être réalisée de deux façons :

- En mode direct : Forward mode (figure 3). C'est le

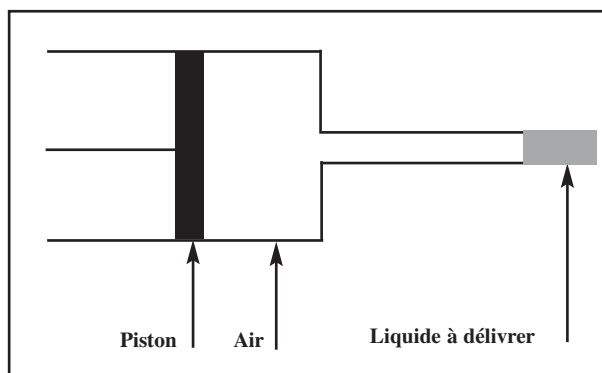


Figure 1. Schéma du piston dans une micropipette à déplacement d'air

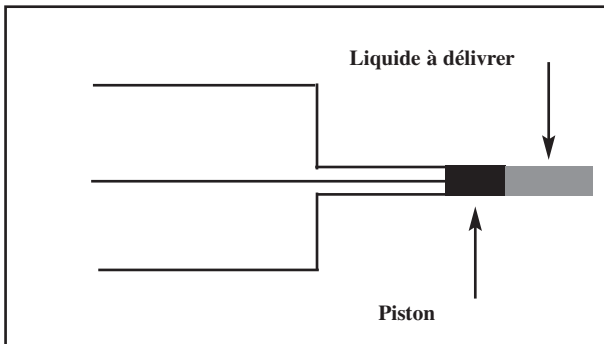


Figure 2. Schéma du piston dans une micropipette à déplacement positif

mode universel de base pour les solutions aqueuses.

- En mode inversé : Réverse mode (figure 4). Ce mode n'est possible qu'avec une pipette à déplacement d'air, et il est préconisé pour les solutions visqueuses

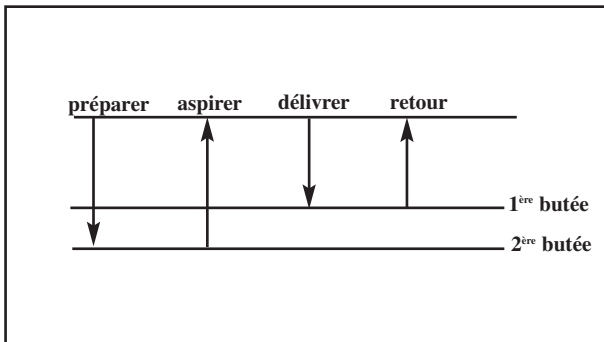


Figure 4. Schéma d'un cycle du mode reverse de pipetage

et/ou moussantes.

- La profondeur de l'immersion du cône bien vertical, dans le liquide à prélever dépend du volume et ne doit dépasser en aucun cas 6 mm au maximum (tableau I).
- La délivrance du liquide : le cône doit former un angle

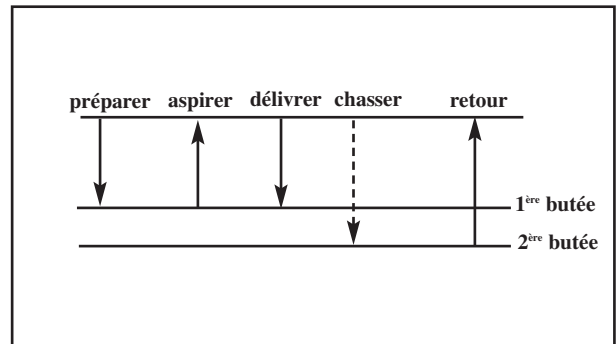


Figure 3. Schéma d'un cycle du mode direct de pipetage

de 10° à 45° avec la paroi du tube récepteur.

Maintenance préventive et performances

Le but de la norme ISO 8655 est de fournir des procédures de référence standardisées et uniformes permettant l'évaluation des instruments de pipetage quelque soit le manipulateur.

La fréquence des tests est variable selon la finalité et les conditions de travail. Cette maintenance préventive, par la mise en place d'opérations d'entretien simples et périodiques, consiste en une vérification du bon fonctionnement de l'instrument, qui sera complétée par le remplacement des pièces d'usure et par le contrôle des performances. (Tableau II).

N.B. :

- * Il faut éviter le réchauffement du corps de la micropipette lors de la vérification des spécifications.
- * Il faut utiliser toujours des cônes d'origine (mouillabilité, régularité de la géométrie, état de surface, étanchéité de la matière, prérinçage, etc.)

Tableau I. Profondeur d'immersion du cône selon le volume à prélever

Volume à prélever	Profondeur d'immersion
1 - 100 μ l	1 - 3 mm
101 - 1000 μ l	2 - 4 mm
1,001 - 10 ml	3 - 6 mm

Tableau II. Maintenance préventive et périodicité des opérations

Périodicité	Actions à entreprendre
Quotidienne	C'est la veille fonctionnelle : elle consiste à contrôler le bon fonctionnement mécanique et l'étanchéité pipette /cône. C'est un geste extrêmement simple qui permet d'éliminer les micropipettes non valables et les erreurs grossières.
Mensuelle	Ce contrôle mensuel consiste à faire un nettoyage interne adéquat (corps, piston, ressort) et à réaliser ensuite un test gravimétrique rapide sur 4 échantillons pour l'évaluation de la justesse et de la répétabilité.
Trimestrielle	C'est un contrôle des spécifications qui sera réalisé sur 10 échantillons, avec le volume minimum et maximum de l'instrument, pour l'évaluation de la justesse et de la répétabilité.
Ponctuelle	Ces contrôles seront faits obligatoirement après démontage et/ou après remplacements de pièces (piston, joint, embase porte cône, ressort, etc.): un contrôle de la justesse et un contrôle de la répétabilité sur 30 échantillons avec édition d'un certificat de conformité sont ainsi réalisés.

* Il faut calibrer en mode direct universel.

Le test gravimétrique de contrôle

C'est le test le plus répandu et le plus fiable actuellement. Il est simple à mettre en place, mais son environnement est particulièrement complexe et implique de ce fait la maîtrise de très nombreux paramètres liés à l'homogénéité et à l'intégrité du système de pipetage, à la technique de manipulation, aux conditions opératoires et aux équipements de mesure.

Le test consiste à déterminer le volume moyen (V_t) à partir d'une série de pesée d'échantillons d'eau (W_i) délivrée par la pipette. Les valeurs trouvées sont corrigées en fonction de l'évaporation (e_i) et de l'application d'un facteur Z (coefficient de fottabilité de l'eau dans l'air) tenant compte de la densité de l'eau à une température donnée, à une pression atmosphérique donnée (annexe 1).

Les tolérances admissibles pour le test

Les déviations maximales admises sur les paramètres environnementaux lors de la calibration vis-à-vis du

volume moyen sont données dans le tableau III.

L'équipement minimum pour la réalisation du test

L'équipement minimum requis pour pouvoir réaliser le test gravimétrique est le suivant :

- * Un thermomètre étalonné, avec lecture à $0,1^\circ\text{C}$, selon les normes ISO 653 ou ISO 655 et régulièrement entretenu (étalonnage à intervalles réguliers par le Bureau National de Métrologie).
- * Un récipient pour la pesée, en matériau non poreux et ayant une capacité de 10 à 50 fois le volume du test. Pour les volumes $< 100 \mu\text{l}$, un couvercle libre, n'entrant pas en contact avec le liquide et en matériau non poreux est utilisé.
- * De l'eau distillée dépourvue d'air dissous.
- * Une balance de précision, étalonnée et calibrée régulièrement, placée loin de toutes vibrations, isolée des courants d'air et qui répond à des caractéristiques spécifiques (tableau IV).

Tableau III : Limites admissibles des paramètres de l'environnement pour la calibration

Paramètre	Valeur de référence	Déviations maximale	Déviations maximale du volume
Température de l'eau	21,5°C	± 0,25°C	0,005 %
Pression atmosphérique	1013 mbar	± 27 mbar	0,003 %
Température ambiante	21,5°C	± 2,5°C	0,001 %
Humidité relative	60 %	± 15	0,0003%
Total arrondi			0,010 %
Erreur indépendante aléatoire			0,005 %
Erreur analytique totale			0,015 %

Tableau IV. Caractéristiques des balances utilisées pour le contrôle volumétrique spécifique des micropipettes.

Volume testé (µl)	Sensibilité (mg)	Imprécision (mg)	Classe de poids (OIML)*
≥ 1	≤ 0,001	≤ 0,002	E2
≥ 11	≤ 0,01	≤ 0,02	E2
≥ 101	≤ 0,1	≤ 0,01	E2
≥ 1000	≤ 0,1	≤ 0,2	F1

* OIML : Organisation Internationale de Métrologie Légale.

Le déroulement du test

Avant de démarrer le test, il faut s'assurer que l'équipement et les matériels (cônes suffisants, propres et bien conditionnés) sont prêts. Le test est mené de la façon suivante :

- 1- Choisir les conditions du test (mode de pipetage, prérinçage ou non, cône unique ou plusieurs cônes, le temps du cycle).
- 2- Equiper la pipette de son consommable
- 3- Mesurer la température de l'eau à 0,1°C près et la noter
- 4- Stabiliser l'évaporation en plaçant de l'eau (2 à 30 fois le volume à mesurer ou au minimum 0,5 ml) dans le récipient de pesée.
- 5- Placer le couvercle si nécessaire et mettre le récipient sur la balance
- 6- Prérincer le cône de la pipette et aspirer l'échantillon selon le mode choisi
- 7- Tarer le récipient et noter la valeur au besoin
- 8- Noter l'heure
- 9- Distribuer l'échantillon selon le mode choisi et replacer le couvercle au besoin
- 10- Effectuer le pesage et enregistrer l'heure et le résultat de la pesée
- 11- Répéter les opérations (6) à (10) selon le nombre désiré (4, 10 ou 30 fois)
- 12- Estimer les pertes dues à l'évaporation en répétant les opérations (7) à (10) de façon exacte comme une pesée d'échantillon, mais sans faire aucun ajout de liquide dans le récipient de mesure et noter la pesée. Ce contrôle d'évaporation est réalisé au début et à la fin de chaque série et entre chaque groupe de 10 échantillons dans les grandes séries
- 13- Mesurer la température de l'eau et noter la valeur.

NB : Les étapes (6) à (10) doivent être réalisées le plus rapidement, mais sans compromettre ni la distribution du liquide, ni la précision de la technique de l'opérateur ou l'intervalle de temps.

Le même test est utilisé pour les distributeurs répétitifs et les diluteurs

Calcul des performances

Les différentes formules utilisées pour le calcul des performances sont les suivantes et un exemple détaillé de calcul est donné dans l'annexe 2.

* **L'évaporation moyenne (mg)**
$$\bar{e} = \frac{\sum e_i}{n_e}$$

* **Le poids moyen (mg)**
$$\bar{W} = \frac{\sum W_i}{n}$$

* **La température** c'est la moyenne des deux mesures (autour de 0,5°C). Cette valeur, avec celle de la pression atmosphérique permettent de trouver le facteur Z ($\mu\text{l/mg}$) (annexe 1).

* **Le volume moyen** (\bar{V}_i) est déterminé à partir de \bar{e} , (\bar{W}) selon la formule suivante :

$$\bar{V}_i = (\bar{W} + \bar{e}) \cdot Z$$

* **La justesse ou exactitude** (Et %) est calculée à partir du volume nominal de la pipette et de la moyenne (\bar{V}_i)

$$Et \% = \frac{\bar{V}_i - V_0}{V_0} \cdot 100$$

* **La déviation standard**

$$S = \sqrt{\frac{\sum (W_i - \bar{W})^2}{n-1}}$$

* **La dispersion** (répétabilité) est exprimée par le coefficient de variation (CV%)

$$CV\% = \frac{S}{\bar{W} + \bar{e}} \cdot 100$$

Tolérance des micropipettes

Elle est fournie par le fabricant avec la micropipette. Nous donnons à titre indicatif quelques exemples de tolérance pour la justesse et pour la répétabilité en fonction du volume (Tableau V).

Tableau V. Exemples de tolérance des micropipettes

Pipette	Volume sélectionné (μl)	Tolérance maximale*	
		Et %	CV %
2 à 20 μl	2	$\pm 5 \%$	$\leq 1,5 \%$
	5	$\pm 2 \%$	$\leq 1,0 \%$
	10	$\pm 1 \%$	$\leq 0,5 \%$
	20	$\pm 1 \%$	$\leq 0,5 \%$
20 à 100 μl	20	$\pm 1 \%$	$\leq 0,5 \%$
	50	$\pm 1 \%$	$\leq 0,3 \%$
	100	$\pm 1 \%$	$\leq 0,2 \%$
50 à 200 μl	50	$\pm 1 \%$	$\leq 0,5 \%$
	100	$\pm 1 \%$	$\leq 0,3 \%$
	200	$\pm 1 \%$	$\leq 0,2 \%$
200 à 1000 μl	200	$\pm 2 \%$	$\leq 0,5 \%$
	500	$\pm 1 \%$	$\leq 0,3 \%$
	1000	$\pm 1 \%$	$\leq 0,2 \%$

* Dans tous les cas, il faut se référer aux exigences du fabricant.

Archivage des documents

* L'archivage des documents assure une parfaite traçabilité des tests effectués et rentre dans le cadre de l'assurance qualité.

* Chaque instrument bénéficie d'une fiche d'identification individuelle, simulant une carte d'identité signalétique, sur laquelle est consigné tout l'historique de l'instrument y compris les résultats des contrôles gravimétriques et des recalibrations du constructeur.

Conclusion

Les IVAP et plus particulièrement les micropipettes sont des éléments déterminant dans les laboratoires de biologie clinique du fait de leur utilisation très fréquente dans les prélèvements de divers liquides biologiques, solutions et réactifs.

Le contrôle de leurs qualités et de leurs performances (précision et exactitude) constitue une sécurité pour le biologiste quant aux volumes prélevés.

Des gestes simples et des tests faciles à réaliser sont à la disposition du biologiste pour assurer une maintenance

pratique quotidienne

régulière et conforme de ses instruments (Tableau VI). Ces contrôles font partie intégrante des procédures d'assurance qualité et par conséquent des procédures d'accréditation et de certification.

Nous signalons l'importance des procédures écrites, aussi bien des tests que des résultats sur des fiches spéciales, ce qui permet aux techniciens d'une part de suivre des protocoles clairs et précis et aux biologistes d'autre part de suivre l'histoire de son instrument depuis son acquisition jusqu'à sa sortie en réforme. Enfin, l'automatisation des laboratoires de plus en plus fréquente ne doit en aucun cas négliger le

Tableau VI. Consignes générales d'utilisation des micropipettes

- Choisir la pipette en fonction du besoin
- S'assurer de la compatibilité chimique avec les produits à pipeter
- Nettoyer le corps externe et l'embase porte cône avec de l'éthanol à 70°
- Eviter les grands écarts de température
- Vérifier l'étanchéité pipette/cône
- Utiliser, au besoin, de la graisse siliconée pour le piston et le ressort
- Ranger les pipettes en position verticale
- Eviter, durant son utilisation, de poser la pipette sur la paillasse, prévoir un support au poste de travail.
- Utiliser toujours des cônes d'origine lors de la calibration
- Assurer une maintenance préventive régulière (changement de joints...)
- Assurer un contrôle régulier des performances

Références

- 1- Anonyme
Le guide de Pipetage. Biohit.
- 2- Anonyme
Le guide Gilson du pipetage. Gilson
- 3- Anonyme
Guide du pipetage. Labystems.
- 4- Dhondt. C., Hayte J. M., Dhondt J. L.
GBEA et pipettes
Ann. Biol. Clin. 1997 ; 55 : 252 – 253
- 5- ISO
Instruments volumétriques à piston et/ou à plongeur (IVAP).
ISO/DIS 8655.

Annexe 2. Exemple de calcul des performances

Pipette : 50 – 200µl Identification : G 13214 date : 17/02/2000

Test 10 points

Volume nominal : 200 µl T : 21,5°C Z = 1,0032

W_i (mg) : 199,8 – 200,2 – 199,6 – 199,8 – 199,8
199,8 – 199,9 – 199,7 – 200,3 – 199,7

e_i (mg) : 0,020 – 0,018 – 0,022 – 0,020 – 0,020

$e = 0,020$ mg

$\bar{W} = 199,86$ mg

$\bar{V}_I = (\bar{W} + e)$. $Z = (199,86 + 0,020) \times 1,0032 = 200,52$ mg

$Et\% = \frac{200,52 - 200}{200} \times 100 = \mathbf{0,26\%}$ (tolérance $\pm 1\%$)

$CV\% = \frac{S}{\bar{W} + e} \times 100 = \frac{0,2107}{199,88} = \mathbf{0,10\%}$ (Tolérance $\leq 0,2\%$)

Conclusion : La pipette est juste et reproductible.

Contrôle et maintenance des micropipettes et des dispensers

Annexe 1. Coefficient de flottabilité de l'eau dans l'air Z (m l/mg) en fonction de la température et de la pression atmosphérique

Température	Pression d'air hpa (mbar)					
	800	853	907	960	1013	1067
15	1,0018	1,0018	1,0019	1,0019	1,0020	1,0020
15,5	1,0018	1,0019	1,0019	1,0020	1,0020	1,0021
16	1,0019	1,0020	1,0020	1,0021	1,0021	1,0022
16,5	1,0020	1,0020	1,0021	1,0022	1,0022	1,0023
17	1,0021	1,0021	1,0022	1,0022	1,0023	1,0023
17,5	1,0022	1,0022	1,0023	1,0023	1,0024	1,0024
18	1,0022	1,0023	1,0024	1,0024	1,0025	1,0025
18,5	1,0023	1,0024	1,0025	1,0025	1,0026	1,0026
19	1,0024	1,0025	1,0025	1,0026	1,0027	1,0027
19,5	1,0025	1,0026	1,0026	1,0027	1,0028	1,0028
20	1,0026	1,0027	1,0027	1,0028	1,0029	1,0029
20,5	1,0027	1,0028	1,0028	1,0029	1,0030	1,0030
21	1,0028	1,0029	1,0030	1,0030	1,0031	1,0031
21,5	1,0030	1,0030	1,0031	1,0031	1,0032	1,0032
22	1,0031	1,0031	1,0032	1,0032	1,0033	1,0033
22,5	1,0032	1,0032	1,0033	1,0033	1,0034	1,0035
23	1,0033	1,0033	1,0034	1,0035	1,0035	1,0036
23,5	1,0034	1,0035	1,0035	1,0036	1,0036	1,0037
24	1,0035	1,0036	1,0036	1,0037	1,0038	1,0038
24,5	1,0037	1,0037	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039
25	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039	1,0040	1,0041
25,5	1,0039	1,0040	1,0040	1,0041	1,0041	1,0042
26	1,0040	1,0041	1,0042	1,0042	1,0043	1,0043
26,5	1,0042	1,0042	1,0043	1,0043	1,0044	1,0045
27	1,0043	1,0044	1,0044	1,0045	1,0045	1,0046
27,5	1,0044	1,0045	1,0046	1,0046	1,0047	1,0047
28	1,0046	1,0046	1,0047	1,0048	1,0048	1,0049
28,5	1,0047	1,0048	1,0048	1,0049	1,0050	1,0050
29	1,0049	1,0049	1,0050	1,0050	1,0051	1,0052
29,5	1,0050	1,0051	1,0051	1,0052	1,0052	1,0053
30	1,0052	1,0052	1,0053	1,0053	1,0054	1,0055