

ATELIER METHODE PORTEE B

Lundi 9 avril 2018

9h30-12h30

Compléter les 2 dossiers de vérification de méthode en répondant aux différents items

- 1- Remplir le tableau des paramètres à vérifier à la lecture des 3 premières pages
- 2- Donner les paragraphes manquants
- 3- Définir vos critères d'acceptations (CV et Biais)
- 4- Compléter les conclusions d'évaluation des performances de la méthode
- 5- Etant donné les paramètres connus quelle formule pouvez-vous utiliser pour calculer les incertitudes de mesure.
- 6- Compléter le reste du SH-FORM43
- 7- Commenter les intervalles de références choisis



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Dosage de bilirubine non liée à l'albumine
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation ¹ : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

SOUS-PROCESSUS 1 : Dosage Bilirubine non liée à l'albumine

Portée A ; Portée B (à justifier)

Le dosage de la bilirubine non liée à l'albumine (BNL) fait partie du bilan biologique réalisé au CNRHP pour affiner l'évaluation du risque d'encéphalopathie hyperbilirubinémique (ictère nucléaire) chez le nouveau-né ictérique.

1989 : Réalisation au CNRHP de la mesure de la BNL sur un instrument dédié à la mesure de la BNL, l'UB Analyser (Arrows, Co, Ltd. Osaka, Japan, FDA approved) par une méthode de peroxydation (Jacobsen et al, *Determination of Unbound Bilirubin in the serum of Newborns, Clinical Chemistry Vol. 20 N°7 1974*).

2006 : **Adaptation du dosage de la BNL sur le CX4-CE Beckman-Coulter** en réduisant les différents volumes réactionnels (6 µl de prélèvement au lieu de 25 µl), en adaptant la fenêtre de lecture (mesure de l'absorbance à 470 nm) de la réaction de manière à calculer la vitesse initiale de la cinétique de la réaction, et en adaptant une calibration en deux points.

2007 : **Adaptation du dosage de la BNL sur DXc800 Beckman-Coulter**

MAILLOUX A, CRAYON B, CORTEY A, LARSEN M, BROSSARD Y - *Unbound Bilirubin determination in newborns: development of an automated assay on the DXc 800 of Beckman-Coulter. American Association of Clinical Chemistry, Washington, Juillet 2008.*

2013 : **Adaptation du dosage de la BNL sur INDIKO Thermo Scientific**

HUGUET-JACQUOT S, HERDA A, TOLY-NDOUR C, RENAUDEAU C, SAURE C, CORTEY A, CARBONNE B, VAUBOURDOLLE M, MAILLOUX A - *Unbound Bilirubin determination in newborns: development of an automated assay on the Indiko Thermo Scientific. Euromedlab, Paris, France, Juin 2015*

Depuis 2013, le dosage de BNL est réalisé au CNRHP sur l'analyseur INDIKO Scientific (numéro de série 863000000064 : date d'installation octobre 2012), le Backup et les dosages durant la garde étant réalisés sur un DxC-800 Beckman Coulter au LBU (numéro de série 6757 : date d'installation janvier 2016)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande	Bilirubine non liée à l'albumine - BNL
Principe de la Méthode	Le principe de ce dosage est une dégradation rapide de la BNL en un leuco-dérivé par l'action d'une peroxydase en présence d'eau oxygénée, source de radicaux peroxydes. L'étude de la cinétique de la réaction de peroxydation permet, connaissant la constante d'activité de la peroxydase, de calculer la concentration en BNL.
Type d'échantillon primaire	Plasma
Type de récipient, additifs	Héparinate de lithium
Prétraitement de l'échantillon	Centrifugation 10 min à 2000-2200g
Unités	µg/dl ou nmol/l
Critères d'interprétation ²	Seuil d'exsanguinotransfusion Supérieur à 0,8 µg/dl si nouveau-né prématuré Supérieur à 1,2 µg/dl si nouveau-né à terme
Marquage CE (Oui/Non)	Pas de Marquage CE
Codage C.N.Q. (s'il existe)	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.)	INDIKO Thermo Scientific (numéro de série 863000000064)
Référence du réactif	Réactifs « maison » selon EP-SA-CN-IMMU-ANA-MT-018
Matériau d'étalonnage (références)	Etalon BNL CNRHP (valeur de bilirubine raccordée à la méthode de référence) : certificat LNE du 18/12/2014 EP-SA-CN-PM-ANA-DX-001
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	Etalonnage en 2 points : (linéaire) point 0 et point avec rapport Bilirubine/albumine = 0,75

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode	Techniciens référents habilités : Catherine Renaudeau-Catherine Sauré
Procédure de validation/mode opératoire	EP-HUEP-PLUS-ANA-PT-002 version 5
Procédure de gestion de la portée flexible	EP-HUEP-QUAL-SMQ-PG-007 version 4
Période d'étude	Du 05/12/12 au 30/06/2016
Date de 1 ^{ère} utilisation	22/01/2013 (mise en route de l'automate Indiko)

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

UTILISATION DU LOGICIEL PC-VALTEC (version 1997)

Echantillons de contrôles utilisés

Liquichek™ Pediatric control Level 2 control BIORAD (réf 691) = **BNLC (niveau élevé)**

Précibil ROCHE (réf 158046) = **PBIL (niveau moyen)**

REPETABILITE INDIKO								
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV limite	Limite au risque de 5 %	Limite au risque de 1 %	Conclusion ³
PBIL (lot 16248802)	30	0,671	0,014	2,1	3,8	4,6	5,0	
BNLC (lot 19342)	34	1,257	0,0135	1,1	3,8	4,5	4,8	

REPETABILITE DxC-800								
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV limite	Limite au risque de 5 %	Limite au risque de 1 %	Conclusion ⁴
PBIL (lot 77367)	20	0,665	0,0069	1	3,8	4,8	5,2	
BNLC (lot 21622)	20	1,281	0,0309	2,4	3,8	4,8	5,2	

Conclusion :

FIDELITE INTERMEDIAIRE INDIKO								
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV limite	Limite au risque de 5 %	Limite au risque de 1 %	Conclusion ³
PBIL (lot 16248802)	20	0,798	0,0301	3,8	5,0	6,3	6,9	
BNLC (lot 19342)	20	1,288	0,0511	4,0	5,0	6,3	6,9	

³ Conforme/non conforme

⁴ Conforme/non conforme



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

FIDELITE INTERMEDIAIRE DxC Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV limite	Limite au risque de 5 %	Limite au risque de 1 %	Conclusion ³
PBIL (lot 77367)	36	0,725	0,0415	5,8	5,0	5,9	6,3	
BNLC (lot 21622)	36	1,445	0,0481	3,3	5,0	5,9	6,3	

Conclusion :

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire :

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite ⁴	Conclusion ⁵
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire :

EXACTITUDE

L'exactitude a été calculée à partir d'un l'étalon BNL de fabrication maison (lot BE1449, fabrication décembre 2014) pour une concentration théorique en bilirubine à 298,4 $\mu\text{mol/L}$ (valeur de BNL à 0,75 $\mu\text{g/dL}$). La valeur assignée de cet étalon a été trouvée à 287,4 $\mu\text{mol/L}$ avec la méthode de référence (certificat LNE : **EP-SA-CN-PM-ANA-DX-001**)

L'incertitude de mesure pour cet étalon a été trouvée à 6,3 $\mu\text{mol/L}$ (2,2%).

Une étude de commutabilité intra-GH a été réalisée avec le LNE sur 7 techniques différentes de dosage de bilirubine (4 laboratoires) **EP-SA-CN-PM-ANA-DX-002** (rapport LNE étude de commutabilité bilirubine).

Cette étude a conclu que l'étalon BNL était commutable sur pratiquement l'ensemble des techniques du GH et la valeur de référence de l'étalon a donc été utilisée pour calculer l'exactitude.



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>						
Echantillons	Valeur Labo	Valeur de référence	Biais µg/dL	Biais (%)	Biais (%) limite	Conclusion
Etalon BNL BE1449	0,750	0,722	0,028	3,9		

Conclusion

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire :

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	

Argumentaire :

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	
Limite de quantification :	
Limite supérieure de linéarité :	



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG, ...):	
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	

Conclusion

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	

Conclusion

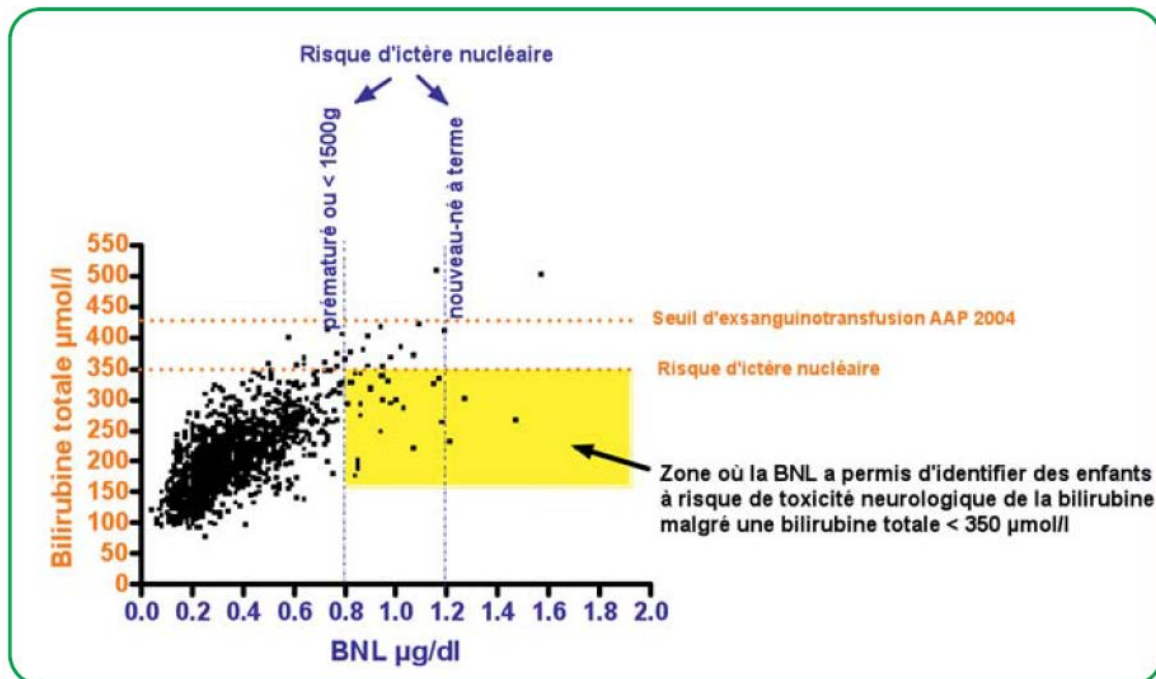
INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Seuil d'exsanguinotransfusion supérieur à 0,8 μ g/dl (nouveau-né prématuré) supérieur à 1,2 μ g/dl (nouveau-né à terme)

Etude CNRHP sur 1424 dosages sur échantillons prélevés chez des nouveau-nés

Dosages Bilirubine totale versus BNL

Paramètres cliniques étudiés: poids, l'âge, déshydratation, prise de paracétamol, déficit en G6PD, contexte d'incompatibilité

Traitement : photothérapie, prise d'albumine, exsanguino-transfusion



Cette figure présente des résultats de bilirubine totale versus ceux de BNL sur 1424 dosages. On observe un indice de dispersion très élevé des résultats de BNL en fonction des concentrations en bilirubine totale. Pour une concentration voisine de 350 $\mu\text{mol/l}$ de bilirubine totale (risque d'ictère nucléaire : APP 2004), les valeurs de BNL s'étendent de 0,4 à 1,2 $\mu\text{g/dl}$. La valeur seuil de BNL à partir de laquelle un risque d'ictère nucléaire est présent est fixé à 0,80 $\mu\text{g/dl}$ pour des nouveau-nés prématurés (ou avec un poids < à 1500 g) et à 1,20 $\mu\text{g/dl}$ pour des nouveau-nés à terme (ces chiffres appliqués au CNRHP sont également ceux retrouvés dans la littérature). Ces valeurs seuils permettent de repérer des enfants à risque de toxicité neurologique malgré une bilirubine totale < 350 $\mu\text{mol/l}$. Après analyse rétrospective, tous les enfants identifiés dans cette zone (définie en jaune sur la figure, n= 24) présentaient des facteurs aggravant de toxicité de bilirubine : prématurité, déshydratation, hypotrophie ce qui illustre bien l'intérêt du dosage de la BNL.

Données bibliographiques :

Bilirubin-albumin binding and neonatal jaundice - Seminars in perinatology, 28: 334-339, 2004

Criteria for exchange transfusion in jaundiced newborns - Pediatrics 1994, 93 498-494

Unbound bilirubin and risk assessment in the jaundiced Newborn - Possibilities and limitations - Hanko, Pediatrics vol 17, February 2006

SUIVI DES PERFORMANCES EN 2015 Fidélité intermédiaire INDIKO

	lot PBIL	n	Moyenne	Ecart-type	CV
Janvier-mars	17341902	106	0,65	0,079	12,10%
Avril-juin	17736701	94	0,72	0,063	8,81%
Juillet-septembre	17736701	111	0,78	0,040	5,1
Octobre-décembre	17736702	120	0,73	0,051	6,89%



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

	lot BNLC	n	Moyenne	Ecart-type	CV
Janvier-mars	19382	99	1,14	0,073	6,45%
Avril-juin	21612	105	1,14	0,135	11,87%
Juillet-septembre	21612	98	1,23	0,015	4,35%
Octobre-décembre	21612	109	1,21	0,051	4,18%

DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion :

Autorisée par :

Signature



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Test de Kleihauer
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation ¹ : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

SOUS-PROCESSUS 1 : Dosage Bilirubine non liée à l'albumine

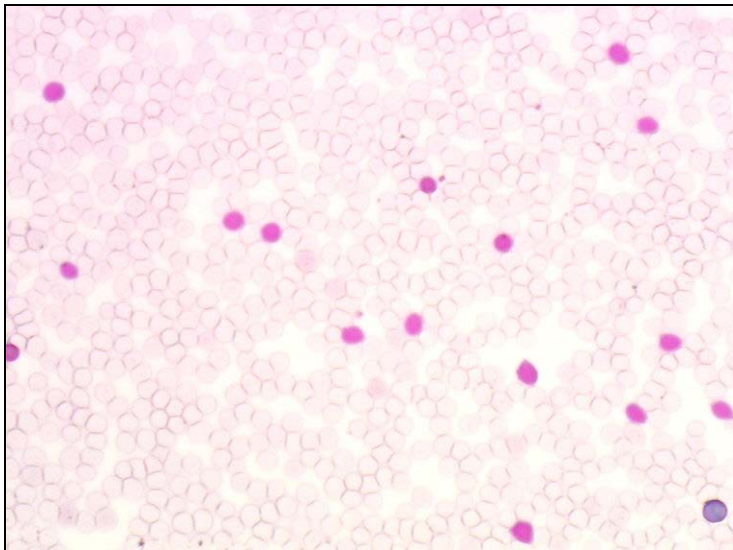
Portée A ; Portée B (à justifier)

Le test de Kleihauer permet de détecter et de quantifier une hémorragie foeto-maternelle (HFM). Cet examen a à la fois un intérêt fœtal, permettant une anticipation de la prise en charge d'une souffrance fœtale et un intérêt maternel, permettant chez la patiente RH1 négatif d'adapter la posologie des IgG anti-RH1 (prophylaxie rhésus).

Ce test est basé sur l'élimination sélective de l'hémoglobine adulte sous l'action d'une solution tampon pH acide, tout en préservant le contenu en hémoglobine fœtale (HbF) des hématies. Les érythrocytes qui ont perdu leur hémoglobine après l'étape de dénaturation apparaissent comme des formes cellulaires fantomatiques, sphériques, incolores alors qu'au contraire les érythrocytes contenant de l'hémoglobine fœtale fixent la phloxine et apparaissent rose vif et réfringentes. Les petits Lymphocytes ont un cytoplasme visible ou pas et un noyau bleu-violet.

Le CNRHP utilise la méthode de référence avec des réactifs préparés au laboratoire.

Kleihauer E, Braun H, Betke B. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. KlinWochenschr 1957; 35: 637-638.



Test de Kleihauer positif



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande	Hématies fœtales
Principe de la Méthode	Identification morphologique après coloration et numération en cellule par microscopie optique
Type d'échantillon primaire	Sang total
Type de récipient, additifs	Tube citraté ou EDTA
Prétraitement de l'échantillon	Pas de prétraitement
Unités	- Hématies fœtales / 10000 hématies adultes (HF/10000HA) (1HF/10000HA=0.5ml de sang fœtal) - pourcentage de sang fœtal.
Critères d'interprétation ²	Intérêt fœtal : évaluation du risque fœtal en fonction du volume de l'hémorragie foeto-maternelle et du terme de la grossesse : masse sanguine du fœtus 80ml/kg et 1HF/10000HA=0.5ml de sang fœtal. Intérêt maternel : adaptation de la posologie en IgRh (prophylaxie rhésus de la patiente RH1 négatif) 20µg d'IgG anti-D/ml de sang fœtal Cortey A, Brossard Y. <i>Prevention of fetomaternal rhesus-D allo-immunisation. Practical aspects. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2006 ; 35 : 1S123-1S130.</i>
Marquage CE (Oui/Non)	Pas de Marquage CE
Codage C.N.Q. (s'il existe)	Non applicable
Equipement (instrument, analyseur, etc.)	Technique manuelle + microscope OLYMPUS Réf : BX41TF Bain marie Réf ISOTEMP
Référence du réactif	Réactifs préparés au laboratoire selon EP-SA-CN-IMMU-ANA-MT-030, EP-SA-CN-IMMU-ANA-MT-029, EP-SA-CN-IMMU-ANA-MT-004
Matériau d'étalonnage (références)	Non applicable
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	Non applicable

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode	Techniciens habilités : Olivier Oudin, Véronique Zerr, Marie Chantal Boque Biologiste référent habilité : Stéphanie Huguet-Jacquot
Procédure de validation/mode opératoire	EP-HUEP-PLUS-ANA-PT-002 version 5
Procédure de gestion de la portée flexible	EP-HUEP-QUAL-SMQ-PG-007 version 4
Période d'étude	Du 23/06/2014 au 31/03/2017
Date de 1 ^{ère} utilisation	1960

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

UTILISATION DU LOGICIEL GraphPad PrismC (version 6.01)

En 2014, il n'existait pas de contrôle de qualité interne disponible sur le marché. Le CNRHP a donc préparé ses propres contrôles à partir de mélanges calibrés sang fœtal/sang adulte. 3 niveaux de mélanges ont été préparés

Préparation des 3 niveaux de contrôle :

- Prendre 5 ml de sang total adulte RH1 négatif, RAI négative, collecté sur citrate ou EDTA avec image de Kleihauer négatif.
- Faire numération des GR = N
- Sang total de nouveau-né non transfusé de groupe O RH1 positif avec image de Kleihauer > 90 % de GR fœtaux (sang de cordon), faire numération des GR = n

Enrichissement du sang adulte en GR fœtaux :

Faire 2 dilutions (au 1/10 et au 1/100) de l'échantillon de sang fœtal en saline albumine bovine 1 %.
Pour 500 µl de sang total adulte ajouter X µl de sang fœtal (pur ou d'une des deux dilutions) selon l'enrichissement désiré

Enrichissement	Sang total adulte	Sang fœtal
5 HF/10000	500 µl	25 x N/n de sang dilué au 1/100
25 HF/10000	500 µl	12.5 x N/n de sang dilué au 1/10
200 HF/10000	500 µl	10 x N/n de sang au pur

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	REPETABILITE		Conclusion ³
					CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	
5 HF/10000HA	18	5.722	1.274	22.26	/	30 (calcul CNRHP -sources entre 10 et 40%*)	
25 HF/10000HA	18	29.444	3.417	11.61	/	30 (sources entre 10 et 40%*)	
200 HF/10000HA	18	222.500	33.103	14.88	/	10 (sources entre 10 et 40%*)	

Conclusion



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion ³
5 HF/10000HA	28	5.607	1.499	26.73	/	30 (sources entre 10 et 40%*)	
25 HF/10000HA	28	25.964	3.024	11.65	/	30 (sources entre 10 et 40%*)	
200 HF/10000HA	28	211.929	12.967	6.119	/	10 (sources entre 10 et 40%*)	

Conclusion

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire :

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>						
Echantillons	Valeur Labo	Valeur de référence	Biais HF/10000HA	Biais (%)	Biais (%) limite	Conclusion
Mai 2015 1505 ^E 1 (Eurocell)	0	0				
Mai 2015 1505E2 (Eurocell)	208	242	-34	14.050	40.000	
Juillet 2015 KHL1501 (Asqualab)	195	192	3	2.000	40.000	
Juillet 2015 KHS1501 (Asqualab)	30	32	-2	6.000	40.000	
Avril 2016 KHL1601 (Asqualab)	16	22	-6	18.000	40.000	
Avril 2016 KHS1601 (Asqualab)	0	0			40.000	
Décembre 2016 KHL1602 (Asqualab)	94	104	-10	10.000	40.000	
Décembre 2016 KHS1602 (Asqualab)	99	104	-5	5.000	40.000	

Conclusion



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
(étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire :

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable

Limite de détection basse :

OHF/10000HA

30 lames de Kleihauer ont été faites et lu à partir d'un sang d'un adulte de sexe masculin.

Lames	Résultats Kleihauer
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
13	0
14	0
15	0
17	0
18	0
19	0
20	0
21	0
22	0
23	0
24	0
25	0
26	0
27	0
28	0
29	0
30	0



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
Limite de détection :	Cf limite de détection plus haut	Etude de 30 patients homme
Limite de quantification :	<1 HF/10000HA	
Parcourir toute la lame pour vérifier l'uniformité du frottis.		
<i>Lorsque sur la lame on rencontre</i>		
aucune HF		<i>on rend :</i> 0 HF/ 10 000 HA
1 à 10 HF		<1 HF / 10 000 HA
≈ 10 HF		1 HF / 10 000 HA
Au-delà de 10 HF rencontrées en parcourant toute la lame, il faut procéder à un comptage plus précis.		
Limite supérieure de linéarité :	100% de sang foetal	

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG, ...) :	20 étalements ont été réalisés en changeant la lame permettant l'étalement (selon procédure) en alternant un sang de bébé (100% sang foetal) et un sang adulte (patient homme). Les lames ont été colorées dans le même bac de la même série. Aucune contamination n'a été détectée. Trouvé à 0,0 % pour le Kleihauer 20 étalements ont également été fait en alternant ces 2 spécimens sans changer de lame d'étalement (hors procédure). On observe sur quelques étalements de sang adulte, de rares îlots de cellules fœtales au niveau des franges. Cette présentation doit faire suspecter une contamination car lors d'un vrai passage d'hématies fœtales, celles-ci se retrouvent sur tout le frottis et pas seulement dans les franges, ni sous formes d'îlots. Dans tous les cas la présence de cellules fœtales doit entraîner un nouvel étalement dans une autre série, ce qui permettra de confirmer le Kleihauer négatif en cas de contamination
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA



Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Étalement avec changement de lames

10 étalements lame bébé - lame papa
en % cellules fœtales

lames	kleihauer bébé		kleihauer papa
1	100		0
2	100		0
3	100		0
4	100		0
5	100		0
6	100		0
7	100		0
8	100		0
9	100		0
10	100		0

Étalement sans changement de lames

10 étalements lame bb - lame papa
en % cellules fœtales

lames	kleihauer bb		kleihauer papa	
1	100		0	
2	100		0	
3	100		0	
4	100	lame étalement sale		quelques îlots de cellules fœtales dans les franges
5	100	lame étalement sale		très rares cellules fœtales dans les franges
6	100	chgmt lame étalement	0	
7	100		0	
8	100		0	
9	100		0	
10	100		0	

Conclusion

Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	

Conclusion

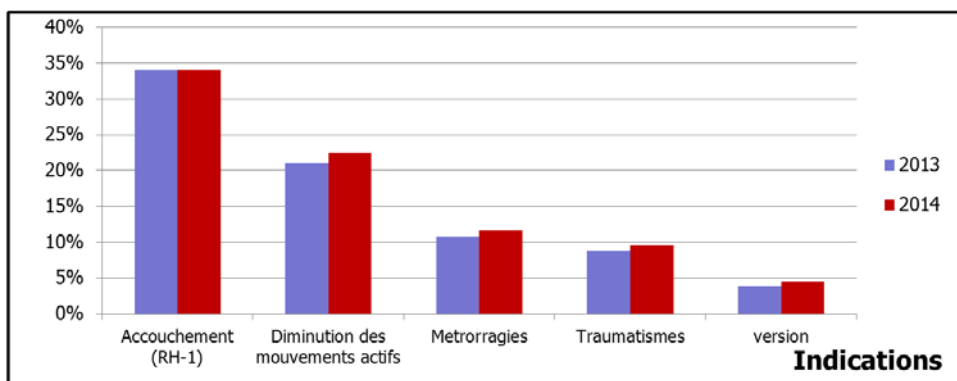
INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>
--

En 2015 nous avons analysé rétrospectivement sur 2 ans les Tests de Kleihauer envoyés au CNRHP afin d'avoir une vision globale des pratiques de prescription du Test de Kleihauer en Ile de France.

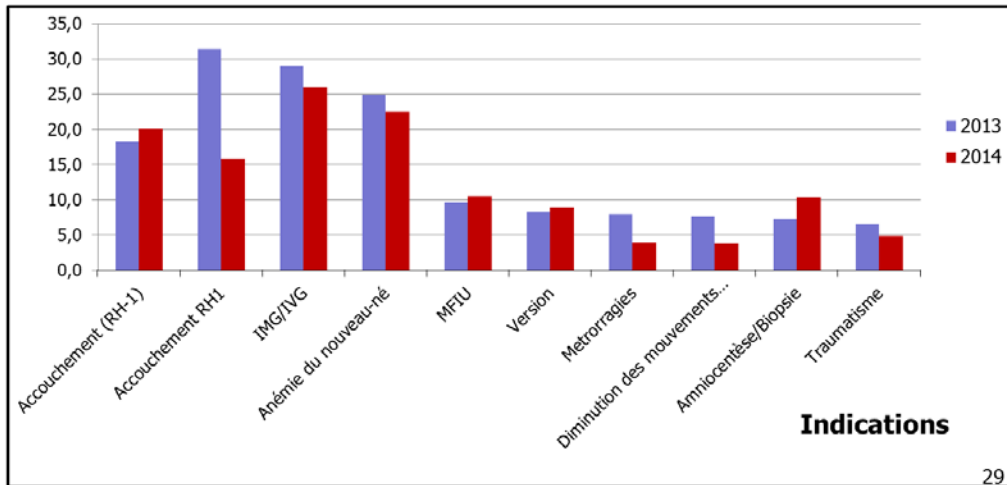
Tests de Kleihauer adressés au CNRHP : analyse rétrospective des pratiques en Île-de-France. S. Huguet-Jacquot, C. Toly-Ndour, J.-M. Jouannic, A. Cortey, B. Carbonne, A. Mailloux. Transfusion Clinique et Biologique. Volume 22, Issue 4, September 2015, Pages 209.

Sur les 37736 tests de Kleihauer reçus il y avait 82% de négatifs, 12% de positifs (dont 7,5% ≥ 25 hématies fœtales/10000 hématies adultes) et 6% de résultats ininterprétables (présence d'hématies adultes contenant de l'hémoglobine fœtale). L'indication principale était la prophylaxie Rh du post-partum (34%) puis les diminutions des mouvements actifs fœtaux 22%, les métrorragies 11%, les traumatismes 9% et les versions 4%.

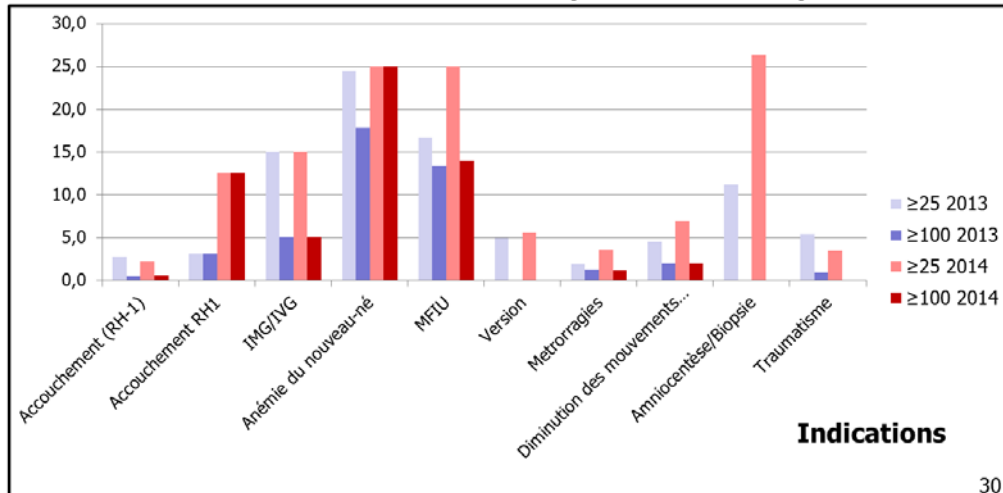
Proportion de demande de Kleihauer par indication en 2013-2014



% de KH \geq 1HF/10000HA par indication



% de KH \geq 25 et 100 HF/10000HA parmi les KH \geq 1 par indication



Les résultats positifs du test de Kleihauer ont été trouvés plus fréquemment pour les indications : signes d'anémie foetale ou néonatale, accouchement et interruptions de grossesse.

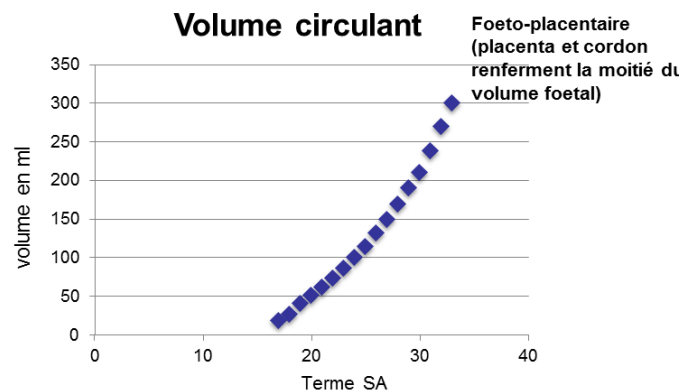
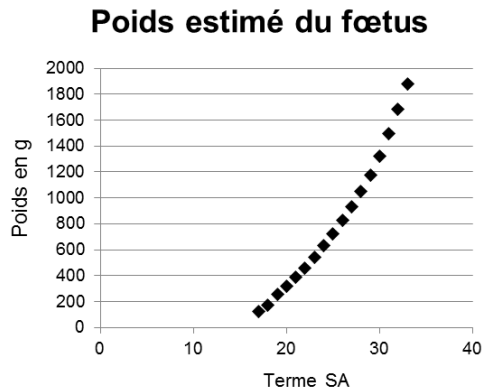
Le Kleihauer dont l'indication la plus fréquente est la prévention rhésus est largement prescrit en Ile de France en urgence devant tout signe évocateur d'une souffrance foetale ou devant tout contexte à risque élevé d'HFM permettant ainsi d'optimiser la prise en charge des patientes et de leurs nouveau-nés.

TEST DE KLEIHAEUER POSITIF : INTERPRETATION ET CONSEILS DE PRISE EN CHARGE

Actualités sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte. Cécile Toly-Ndour, Stéphanie Huguet-Jacquot, Nelly Da Silva, Ludmia Taibi, Emmeline Maisonneuve, Anne Cortey, Jean-Marie Jouannic, M. Vaubourdolle, Agnès Mailloux
60èmes journées Internationales de biologie médicale, juin 2016

Evaluation du risque d'anémie foetale ou néonatal :

Ce risque est fonction du terme et du volume sanguin foetal



1 HF /10 000 HA (= 0,5 ml de sang fœtal)

À terme : masse sanguine d'un nouveau-né 80 ml/kg

Grand maximum HFM de 700 HF/10000 HA = perte de 350 ml de sang fœtal (mais possibilité de régénération).

Un test de Kleihauer >1000HF/10000HA est donc incompatible avec une Hémorragie fœto-maternelle et doit faire évoquer la présence de Fcells considérées à tort comme positifs.

Interprétation dans un contexte anténatal

Compte tenu de ces paramètres il convient de se demander si le volume est suffisamment important pour provoquer une anémie fœtale sévère (<7g/100ml). Une HFM massive est à transmettre en urgence à l'obstétricien pour une prise en charge clinique rapide (échographie doppler avec mesure du pic systolique de vélocité au niveau de l'artère cérébrale moyenne à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale).

De plus il faut se demander si cette HFM est une séquelle d'un saignement passé ou témoigne d'une hémorragie toujours active. Il est donc nécessaire de demander un prélèvement pour contrôle du Kleihauer à 24h puis à 48h afin de voir si cette HFM est stable (séquelle) ou continue de progresser (HFM toujours active).

Suite à un événement pouvant entraîner une HFM (ex : amniocentèse) il convient donc de demander un contrôle à 24h.

Si Femme est RH1 négatif, est-ce que les hématies fœtales sont RH1+? Un marquage anti-D en cytométrie de flux ou un génotypage RHD fœtal (sauf MFIU, car dès qu'il y a expulsion, plus de possibilité de faire le génotypage RHD fœtal) permettent de répondre à cette question et donc d'adapter la prophylaxie rhésus. Par ailleurs, il convient de tenir compte de la coexistence d'une immunisation et ou d'une incompatibilité ABO (Possibilité d'accélération de l'élimination des hématies fœtales).

Risque d'allo-immunisation anti-D chez la patiente RH1 négatif

Patiente à l'accouchement (MFI et IMG)

- Adaptation posologique à partir de 25HF/ 10000 HA si le nouveau-né est RH1 positif
- KLEIHAUER à contrôler avant l'injection et 24 h après l'injection (48h si supérieur à 100 HF/ 10000 HA)
- RAI à contrôler 6 mois après injection

Patiente non accouchée

- Adaptation posologique à partir de 25HF/ 10000 HA (Statut du RH1 du fœtus inconnu)
- KLEIHAUER à contrôler avant l'injection et 24 h après l'injection (48h si supérieur à 100 HF/ 10000 HA) si Kleihauer persiste positif hypothèse de fœtus RH1 négatif (intérêt test complémentaire cytométrique)

Extrait du manuel des prélèvements :

Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Immuno-prophylaxie rhésus : calcul de doses d'IgRh Modalités pratiques en cas d'hémorragie foeto-maternelle dépassant 40 hématies fœtales pour 10 000 hématies maternelles :

Le calcul des doses s'effectue selon les modalités générales suivantes. (tableau)
La première fraction de 100 µg d'Ig anti-D est censée couvrir une HFM jusqu'à 4 HF/10 000 car il est d'usage en France de se donner une marge de sécurité pour pallier l'imprécision des tests dans l'estimation des faibles volumes d'HFM. A partir de 5 HF/10 000, le complément est calculé sur la base de 20 µg d'IgG anti-D par ml d'hématies fœtales (soit 20 µg par tranche de 4 HF/10 000 supplémentaires).

KLEIHAUER (HF/10.000HA)	Dose de 200µg		Dose de 300µg		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	
0-54	1	200µg	1	300	IV Directe
5-24	1	200µg	1	300	
25-44	2	400µg	1	300	
45-64	2	400µg	2	600	PERFUSION LENTE Dans NaCl à 9 pour mille
65-84	3	600µg	2	600	
85-104	3	600µg	2	600	
105-124	4	800µg	3	900	
125-144	4	800µg	3	900	
145-164	5	1000µg	3	900	
165-184	5	1000µg	4	1200	
185-204	6	1200µg	4	1200	
205-224	6	1200µg	4	1200	
225-244	7	1400µg	5	1500	
245-264	7	1400µg	5	1500	
265-284	8	1600µg	5	1500	
285-304	8	1600µg	6	1800	

Cas particulier des HFM dépassant 40HF/10 000.

- Il n'y a pas de limite supérieure de doses à administrer.
- Plus l'hémorragie foeto-maternelle est importante plus le délai entre le diagnostic d'HFM et l'administration de la prophylaxie doit être court (72h étant un délai maximal pour l'efficacité optimale de la prophylaxie)
- La lyse rapide des GR fœtaux RhD positif, cible des IgRh injectées, peut induire une **réaction de type frissons, hyperthermie** et ce d'autant que le volume de sang fœtal (HFM) est important et aussi que l'administration est rapide (pour mémoire un Kleihauer à 40HF pour 10 000 correspond à 20 ml de sang fœtal d'hématocrite 50%). Cette réaction n'est pas une réaction allergique.
- Aussi l'administration de plus de 400 µg d'IgRh doit se faire en perfusion lente de 4h au minimum. Cette durée de perfusion peut être allongée à 8h en cas d'hémorragie foeto-maternelle dépassant 100 HF/10 000. L'équipe soignante et particulièrement l'anesthésiste doivent être informés de cette possible réaction.
- Le contrôle d'efficacité thérapeutique de la prophylaxie se fait sur une négativation du Kleihauer à 48 ou 72h de la fin de l'administration des IgRh et il est recommandé de contrôler la négativité des RAI à 6 mois de l'évènement sensibilisant.

Un avis médical peut être demandé à tout moment à la permanence médicale du CNRHP au 01 71 97 03 01.

DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion :

Autorisée par :
Signature