

Université Pierre et Marie Curie

Sorbonne Universités

MÉMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE

**« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE
MÉDICALE »**

Vérification initiale de l'hémogramme automatisé sur le
XN-9000 de SYSMEX

BRANGER Marine
Interne biologie médicale
CHU de Nantes
2013-2014

Note au lecteur :

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.

Auteur :

BRANGER Marine

Interne en biologie médicale 4^{ème} année.

Lieu d'exercice :

- Semestre novembre 2013-avril 2014 : laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes : 1 place Alexis-Ricordeau 44093 Nantes.
- Semestre mai 2014-octobre 2014 : laboratoire du centre hospitalier Loire-Vendée-Océan : boulevard Guérin, 85300 Challans.

Remerciements :

Aux responsables du DU « assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » pour m'avoir accueillie au sein de cette promotion 2013/2014, ainsi qu'à l'ensemble des intervenants pour la qualité de leurs enseignements dispensés au cours de cette année.

Au Pr M-C BENE, chef de service du laboratoire d'hématologie et au Dr W.CHELLE chef de service du laboratoire de Challans pour m'avoir permis de m'absenter de leur service afin de suivre l'ensemble des enseignements de ce DU.

A mes co-internes, qui m'ont permis de dégager du « temps qualité » pendant ce semestre.

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé à la réalisation de mon sujet de mémoire et plus particulièrement :

Au Dr Soraya Wuilleme biologiste responsable de la validation de l'hémogramme automatisé pour la confiance qui m'a été accordée,

Aux techniciennes référentes qualité Elodie DUCLOUX et Stéphanie ROCUET pour l'ensemble du travail effectué,

A la cellule qualité du CHU de Nantes d'une aide précieuse pour la finalisation du dossier de validation de méthode,

Ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'hématologie.

Sommaire:

1	Introduction.....	1
1.1	Un travail qui s’inscrit dans un projet hospitalier	1
1.1.1	Présentation du pôle de biologie du CHU de Nantes.....	1
1.1.2	Avancement de l’accréditation.	1
1.1.3	L’organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes.....	2
1.2	Le laboratoire d’hématologie	2
1.2.1	Présentation	2
1.2.2	Le contexte	3
1.2.3	Description de la nouvelle chaîne analytique	4
1.2.4	L’hémogramme : un examen clé	6
1.2.5	Description du processus	8
2	Evaluation des performances initiales de la numération formule sanguine: vérification/validation de méthode :	8
2.1	Méthodologie	8
2.1.1	Plan d’action.....	8
2.1.2	Maîtrise des risques.....	9
2.1.3	Choix des intervalles de référence biologique	10
2.1.4	Description de la méthode	11
2.1.5	Définir les critères de performance à vérifier	11
2.1.6	Choix des limites acceptables.....	13
2.2	Résultats : vérification expérimentales des critères de performance sur le XN-9000 de SYSMEX®.....	15
2.2.1	Fidélité	15
2.2.2	Justesse /exactitude	19
2.2.3	Limite de quantification	21
2.2.4	Contamination inter-échantillons	22
2.2.5	Comparaison.....	23
2.3	Vérification des paramètres calculés	27
2.4	Vérification de la bonne exécution des règles d’expertise.	27
3	Conclusion : Rapport de validation de méthode.....	28
	Bibliographie.....	30
	Annexes.....	31

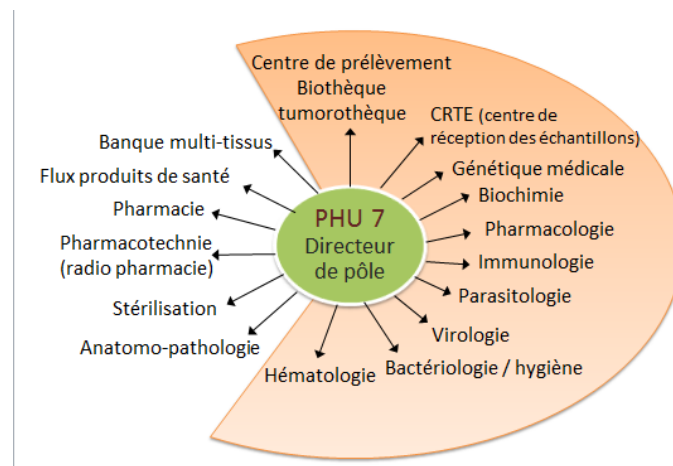
1 Introduction

1.1 Un travail qui s'inscrit dans un projet hospitalier

1.1.1 Présentation du pôle de biologie du CHU de Nantes

Le CHU de Nantes, qui s'est engagé dans une dynamique d'amélioration permanente de la qualité et de la sécurité des soins, a été certifié dès 2001 par la Haute Autorité de Santé (HAS). L'établissement a de plus obtenu en décembre 2010 la certification V2010.

Depuis 2013, le CHU de Nantes s'est réorganisé en 11 pôles hospitalo-universitaires (PHU). Le laboratoire de biologie médicale (LBM) est regroupé au sein du PHU7.



Il est constitué de différents services de biologie médicale qui se situent sur deux plateaux techniques, un principal à l'Hôtel-Dieu (HD) et un autre à l'hôpital Guillaume et René Laennec (HGRL). Le LBM compte environ 110 personnels médicaux et 350 personnels non médicaux, pour une activité d'environ 3000 dossiers/ jour.

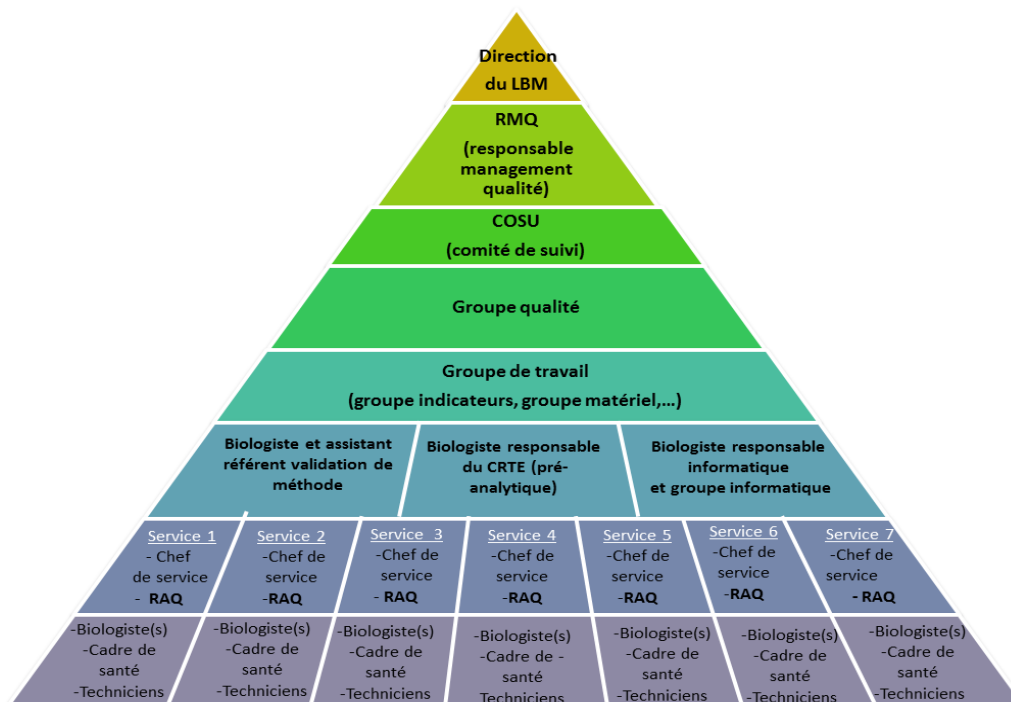
1.1.2 Avancement de l'accréditation.

Fin 2012, le LBM du CHU de Nantes est entré dans la démarche d'accréditation avec le dépôt de son dossier au COFRAC. L'audit initial a eu lieu en octobre 2013 selon le référentiel NF EN ISO 1589 version 2007. L'audit concernait 6 familles réparties entre 4 services du LBM : la biochimie générale et spécialisée (sites HD et HGRL), la pharmacologie, l'immunologie (auto-immunité et allergologie) et enfin la génétique constitutionnelle et somatique, ce qui représentait un total de 157 paramètres. Le COFRAC a relevé 16 écarts dont aucun n'était

critique. Le laboratoire a reçu sa notification d'accréditation en avril pour une prise d'effet au 1^{er} mai 2014.

En 2014, les services engagés poursuivent leur démarche avec des extensions de portée et/ou des ajouts d'analyses et trois nouveaux services les rejoignent : la virologie, la bactériologie et l'hématologie qui présente à l'accréditation l'hémogramme (numération formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés).

1.1.3 L'organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes.

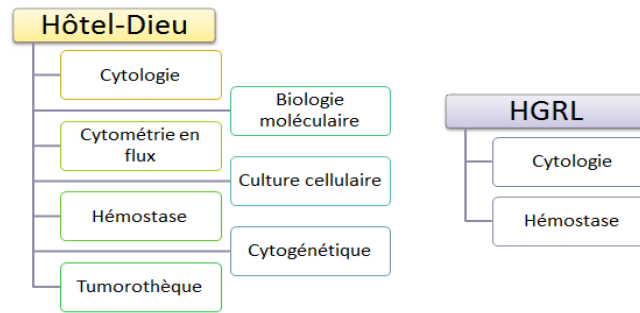


Organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes en 2014

1.2 Le laboratoire d'hématologie

1.2.1 Présentation

Le service est constitué de quatorze biologistes dont quatre hospitalo-universitaires (1 PUPH, 1 MCUPH et 2 AHU), de deux ingénieurs, d'un cadre de santé, de quarante et un techniciens et de 5 internes. Il comporte un responsable qualité et un responsable informatique. Le laboratoire d'hématologie est organisé en plusieurs secteurs, répartis sur deux sites :



Organigramme du laboratoire : cf **annexe I**.

Le secteur d'hématologie cellulaire du laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes a comme activité principale le suivi des paramètres hématologiques des patients hospitalisés et externes ainsi que le dépistage et le diagnostic des anomalies du globule rouge, des plaquettes, et des hémopathies malignes. Le service est ouvert 24h/24. Les analyses sont réalisées sur les mêmes automates en service normal et en service de garde.

En 2012, sur le site de l'Hôtel-Dieu, il a été réalisé environ 120 000 numérations seules et 120 000 numérations formules sanguines, avec environ 200 lames par jour.

Le secteur de cytologie utilise comme SIL le logiciel Dxlab (société Medasys) et comme middleware la solution MPL (société Roche). Ces outils permettent la validation technique des résultats, et affichent les graphes d'analyse cellulaire, les résultats numériques, les antécédents et les alarmes.

1.2.2 Le contexte

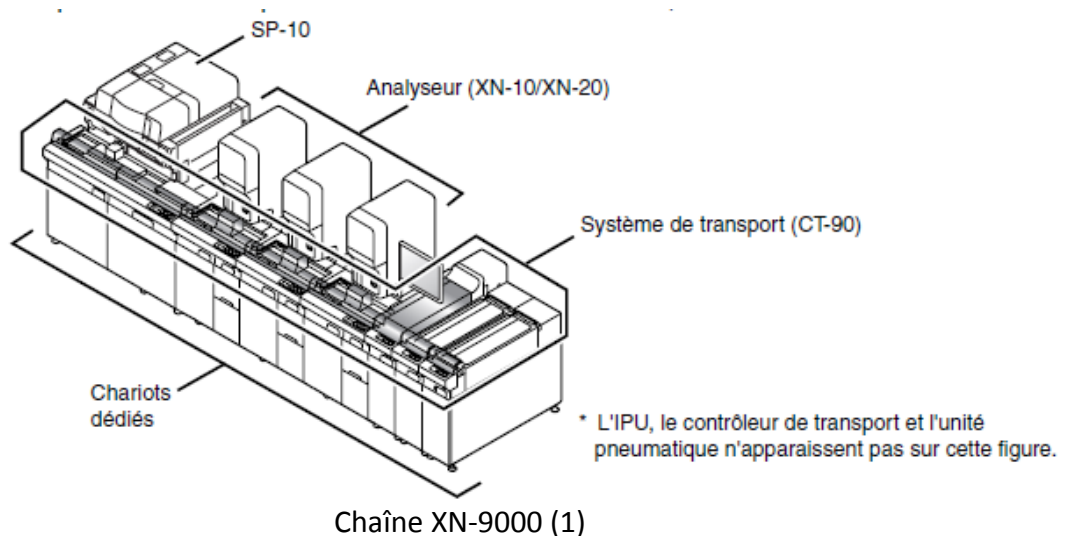
Le laboratoire d'hématologie a souhaité, dans le cadre de l'accréditation et de son rapprochement géographique de la plateforme L2R (laboratoire de réponse rapide), faire évoluer sa chaîne analytique automatisée de numération formule sanguine de marque SYSMEX® datant de 2001 et constituée de deux analyseurs XE2100D, d'un convoyeur et d'un étaleur-colorateur SP-1000i, présente sur le site de l'hôtel-Dieu. Les objectifs principaux étaient :

- de poursuivre les efforts réalisés au laboratoire concernant la standardisation des processus de prise en charge des prélèvements.
- d'augmenter la sécurité et la traçabilité de la gestion des tubes-échantillons et de diminuer le nombre d'erreurs liées au traitement manuel (gestion automatique des repasses).

- d'optimiser le délai de rendu des résultats en particulier durant les phases de pic d'activité afin d'assurer une excellente qualité analytique 24h/24, adaptée à une activité d'urgence en assurant une disponibilité maximale des équipements notamment à l'aide de solutions de backup cohérentes.
- d'optimiser les processus automatisés des analyses des échantillons biologiques.
- d'améliorer les performances analytiques des automates de numération, notamment en termes de détection de cellules anormales circulantes.
- d'améliorer l'hygiène et la sécurité du personnel.
- d'inclure un module capable d'analyser les liquides biologiques pour faire face à l'augmentation croissante des demandes dans ce domaine.

Après appel d'offre, il a été décidé de l'acquisition et l'installation d'une nouvelle chaîne analytique SYSMEX® de dernière génération, la chaîne XN 9000 pour début 2014. L'arrivée d'un nouvel automate imposant une vérification de méthode a participé à la décision de présenter à l'accréditation la numération formule sanguine pour la prochaine visite COFRAC. Etant en stage dans ce laboratoire pour le semestre : novembre 2013 - mai 2014, le choix de mon mémoire pour le DU c'est naturellement orienter vers la validation de ce nouvel automate.

1.2.3 Description de la nouvelle chaîne analytique



Cette chaîne est composée:

- de trois analyseurs XN-10, dont l'un est équipé du module d'analyse des liquides biologiques (Body Fluid), les deux autres disposant des canaux permettant l'identification des réticulocytes (RET) et des plaquettes en fluorescence (PLT-F).
- d'un convoyeur permettant d'amener les racks de tubes vers un automate d'analyse ou de les détourner pour les envoyer sur l'automate suivant.
- d'un serveur E-IPU qui assure l'envoi des demandes sur la chaîne et le retour des résultats sur l'interface de validation.
- du CT-90, ordinateur qui envoie les demandes de l'E-IPU vers les convoyeurs et assure le routage des tubes vers l'une ou l'autre des machines.
- de l'IPU qui pilote les analyseurs d'hématologie XN. Il est relié au CT90 et à l'EPU.
- d'un étaleur-colorateur SP-10 en bout de chaîne.

Cette nouvelle chaîne analytique apporte un certain nombre de nouveautés par rapport à l'ancienne, permettant de répondre aux principaux objectifs fixés. Parmi celles-ci, on peut noter la présence du canal d'analyse des liquides biologiques et des canaux PLT-F qui grâce à un marquage spécifique des plaquettes par un fluorochrome, permettent une meilleure précision de la numération plaquettaire. Les érythroblastes sont désormais décomptés systématiquement, le canal IMI (canal de détection des blastes myéloïdes et des immatures granuleux) disparaît. Les analyseurs XN disposent d'un mode de prélèvement unique, c'est à dire d'une seule aiguille quelque soit le mode utilisé, automatique, manuel ou body fluid. Ils utilisent également un volume d'aspiration réduit (88 µL) et offrent la possibilité de passer des tubes fermés en mode manuel.

La grande nouveauté est le système « Rerun/Reflex » qui permet de réduire les manipulations d'échantillons. En effet, sitôt l'échantillon analysé, l'automate applique les règles :

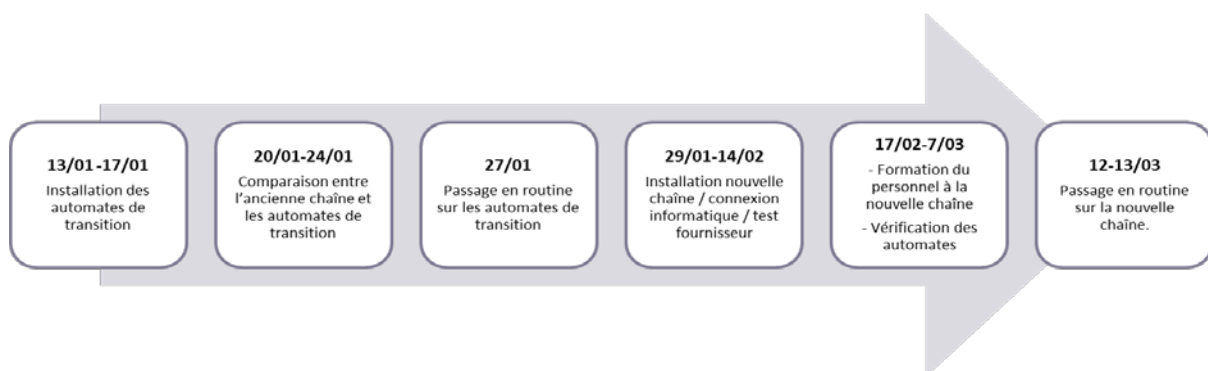
- REFLEX : ces règles sont dictées par l'informatique de l'automate lui-même, imposées par le fournisseur. Il en existe deux : ajout de PLT-F si plaquettes <20G/L ou >1000G/L, ou anomalie de la courbe de répartition des plaquettes et le mode « blanc bas » si globules blancs < 1 G/L. Dans ce dernier cas, l'échantillon est analysé de nouveau en comptant trois fois plus de cellules pour une meilleure précision de la

formule. Il est à noter que cette dernière règle a été désactivée par choix du laboratoire qui n'effectue pas de formule si le taux de globules blancs est inférieur à 1G/L.

- **RERUN** : en fonction des résultats, l'E-IPU interroge le middleware et applique directement les règles d'expertise élaborées par les biologistes comme l'ajout d'une formule ou de la numération des réticulocytes, les repassages, ou la création d'une lame...

Pour une application optimale, il est nécessaire de bien en comprendre ce fonctionnement et d'être particulièrement vigilant lors de la rédaction des règles d'expertise. Ce système nécessite dans le cadre de l'accréditation un gros travail de validation afin de s'assurer de la bonne application des différentes règles élaborées. Il est également nécessaire de s'assurer de leur entière compréhension par le personnel technique. En dehors de ces modifications les principes de mesures des différents paramètres ne diffèrent pas par rapport à l'ancienne chaîne analytique qui était du même fournisseur.

Il faut également noter la présence de deux autres automates de marque SYSMEX® sur le site de l'hôpital HGRL : un XS1000i et un XE2100, qui nécessitent également une vérification de méthode effectuée a posteriori de leur installation. La vérification de méthode de ces automates effectuées pendant la même période ne figure pas dans ce mémoire.



Déroulement de l'installation de la nouvelle chaîne analytique

1.2.4 L'hémogramme : un examen clé

L'hémogramme est l'examen de biologie le plus prescrit et ses indications très nombreuses dépassent le cadre des pathologies hématologiques. De manière non exhaustive, il est indiqué notamment en cas de syndrome anémique, infectieux, hémorragique ou tumoral

mais aussi devant une altération de l'état général, en cas de thrombose, de prurit à l'eau, ou d'érythrose cutanée. Il est également prescrit au cours de la grossesse, dans le cadre de la médecine du travail ou encore dans la surveillance de certains traitements. Par le grand nombre de paramètres qu'il comporte, il apporte en effet de nombreuses informations. Il est réalisé à partir d'un prélèvement de sang veineux périphérique recueilli dans un tube contenant un anticoagulant de type EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique).

Au début du siècle dernier, la numération formule était réalisée entièrement par des méthodes manuelles. Depuis, les analyseurs d'hématologie ont considérablement amélioré la qualité des résultats de l'hémogramme. Ils analysent les échantillons sanguins avec une cadence élevée et fournissent des résultats précis et reproductibles. Ils permettent ainsi de décharger les laboratoires des « formules normales », le temps dégagé permettant de se concentrer sur les dossiers plus complexes.

L'hémogramme apporte des informations quantitatives mais aussi qualitatives sur les 3 lignées de cellules sanguines :

- Les érythrocytes : avec la numération des globules rouges (GR), le taux d'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), l'indice de distribution des globules rouges (IDR) ainsi que les indices érythrocytaires qui comprennent le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) développé par M. Wintrobe pour classer les anomalies des globules rouges. Enfin, la numération des réticulocytes, qui ne fait pas systématiquement partie de l'hémogramme, peut apporter de précieuses informations notamment lors de la découverte d'une anémie normocytaire.
- Les plaquettes : avec leur numération et des informations sur leur taille grâce au volume plaquettaire moyen (VPM).
- Les leucocytes : avec leur numération (GB), et leur répartition entre les 5 populations normales. La formule comprend : les polynucléaires neutrophiles (PN), éosinophiles (PE) et basophiles (PB), les lymphocytes et les monocytes. Eventuellement, la présence d'autres cellules anormales (immature granuleux, blastes...) peut être mise en évidence.

A l'obtention des résultats chiffrés, s'est ajoutée une visualisation au moins partielle des particules énumérées sous la forme de graphes mono, -bi ou multiparamétriques. Divers messages d'alertes ont été mis en place en parallèle pour signaler plus précisément certaines anomalies de mesure ou d'analyse. Ces divers messages et histogrammes complètent aujourd'hui l'interprétation technique et biologique de l'hémogramme.

L'hémogramme automatisé se révèle exact et précis quand il est normal ou quand il met en évidence des variations quantitatives modérées. En revanche dans certaines circonstances, liées à certaines caractéristiques de l'échantillon, à une pathologie particulière, à des modifications induites après le prélèvement, ou intrinsèques à la technologie utilisée pour la mesure, les automates peuvent induire des résultats erronés. Les biologistes et techniciens doivent connaître ces diverses situations ainsi que le principe de fonctionnement de leur automate afin d'éviter de rendre des résultats faux qui pourraient avoir un impact non négligeable pour le patient et sa prise en charge.

1.2.5 Description du processus

Cf logigramme **annexe II**.

2 Evaluation des performances initiales de la numération formule sanguine: vérification/validation de méthode :

2.1 Méthodologie

2.1.1 Plan d'action

La vérification/ validation de méthode s'effectue en deux phases : une phase initiale avant la mise en œuvre en routine et une phase de vérification continue afin de confirmer les performances dans le cadre du fonctionnement quotidien du laboratoire. Nous allons ici nous intéresser à cette première phase. La vérification/validation des méthodes d'analyses est une exigence forte de la norme. L'accréditation d'un laboratoire passe forcément par cette étape qui permet d'avoir une bonne connaissance des méthodes d'analyses, de ses performances et de ses limites.

Elle a pour but d'évaluer dans les conditions opératoire du laboratoire, de manière objective, les méthodes employées et d'apporter les preuves de la validité des résultats rendus, justifiant ainsi son utilisation pour les patients. Selon la norme « le laboratoire doit

documenter la procédure utilisée pour la vérification/validation et enregistrer les résultats obtenus. »

Comme l'exige la norme, le LBM s'est doté d'une procédure « validation de méthode quantitative » (7180-PR-022) dans laquelle est expliqué comment réaliser les différentes étapes du processus. Celle-ci doit être suivie par l'ensemble des services lors de la mise en place d'une nouvelle méthode.

Selon cette procédure, une phase de validation est effectuée sur décision du responsable du laboratoire et un responsable de la vérification est désigné. La première étape, une fois la méthode choisie, est de rédiger le plan expérimental (on peut utiliser les documents 7180-IM-059 ou 7180-IM-062) qui sert à déterminer pour chaque paramètre les critères de performances à vérifier, dans définir les modalités de mise en œuvre, ainsi que de choisir les critères d'acceptabilité. On établit également le planning de réalisation et on définit les responsabilités. Cf. **annexe III**. L'équipe en charge de cette vérification de méthode était constituée d'une biologiste responsable, de deux techniciennes et de moi-même.

A noter que, dans l'appel d'offre de renouvellement de la chaîne d'analyse de l'hémogramme, il a été anticipé que : « les réactifs pour réaliser les vérifications de méthodes devront être fournis gratuitement à la phase initiale, sur chacun des modules analytiques et le fournisseur s'engage à fournir tous les documents nécessaires permettant de respecter la norme ISO 15189. »

Dans un premier temps il est indispensable de définir quels sont les paramètres qui devront faire l'objet d'une vérification de méthode, c'est-à-dire ceux mesurés par l'automate. En effet l'hémogramme est composé de nombreuses analyses dont les modalités de détermination diffèrent suivant l'automate utilisé. Liste des paramètres mesurés et calculé pour les automates SYSMEX : cf. **annexe IV**.

2.1.2 Maîtrise des risques

L'analyse de risque est un élément obligatoire à fournir dans le dossier de validation d'une méthode analytique, son but est de réaliser une identification des points critiques de chaque technique et d'envisager les mesures de maîtrise à adopter.

Cette étude peut être réalisée selon la méthode AMDEC ou selon une méthodologie simplifiée. Le choix a été de réaliser une analyse de risque de type AMDEC sur l'ensemble du processus de réalisation d'une numération formule sanguine : de l'hémogramme automatisé à la réalisation et la lecture d'un frottis sanguin. Pour cela nous avons utilisé le document informatif du pôle de biologie du CHU de Nantes n°7180-DI-035 : « *Méthodologie pour une analyse de risque* » qui a permis de remplir l'imprimé type : 7180-IM-033. La maîtrise des risques concernant l'hémogramme automatisé est présentée en **annexe V**.

2.1.3 Choix des intervalles de référence biologique

Le terme d'intervalle ou de valeurs de référence est à préférer à celui de « valeurs normales » non approprié. Selon la norme ISO NF EN 15189 (chapitre 5.5.2 version 2012) « le laboratoire doit définir les intervalles de référence biologique ou les valeurs de décision clinique, documenter la base des intervalles de référence ou valeur de décision et communiquer ces informations aux utilisateurs. » Dans le cadre de la mise en place de l'accréditation, le laboratoire a revu ces valeurs de référence à l'aide de publications plus ou moins récentes sur le sujet.

Référence bibliographique
ANAES Recommandations (http://www.anaes.fr)
Troussard X et al. Full blood count normal reference values for adults in France, J Clin Pathol, 2013
HAS, Lecture critique de l'hémogramme: valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques, 1997
Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 2008
Christensen RD et al The CBC : References Ranges for Neonates, Seminars in Perinatology, 2009.
Simplkin P Pediatric Hematology, Reference Values p. 792-810, Blackwell Publishing, 2007.
Lainey E et al Hémogramme en Pédiatrie: variations physiologiques », p. 49-59 , RFL n°416 ,2009
Bain BJ Blood Cells Practical Guide, Normal Range p. 198-216, Blackwell Publishing, 2006.
IDR, Sysmex Xtra Online, Mars 2011
Zini et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantification of schizocytes, IJLH, 2011

Cela a également permis d'actualiser et d'harmoniser les valeurs de référence entre les différentes interfaces utilisées : middleware, SIL, et logiciel informatique du personnel

soignant. Les cliniciens ont été tenu informés par courrier de la réactualisation des intervalles de référence. Intervalles de référence des paramètres de la numération formule en fonction de l'âge, cf. **annexe VI**.

2.1.4 Description de la méthode

Selon le SH INF 50 la numération formule sanguine correspond à la portée :

Domaine : Biologie médicale - Sous-domaine : Hématologie – Famille : Hématocytologie (HEMATOBM)

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
HB1	Liquides biologiques d'origine humaine	Hémogramme (Numération-formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés)	Méthode de type qualitatif et quantitatif Principe général des techniques : - Impédancemétrie, - Cytométrie en flux, - Cytochimie, - Spectrophotométrie, - Fluorescence, - Radiofréquence, - Calcul - Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique	Méthodes reconnues (A)	

La première partie du dossier de vérification / validation est consacrée à la description de la méthode. Le laboratoire doit collecter les informations pertinentes à connaître sur le système analytique telles que le principe de mesure de l'analyte, le type d'échantillon primaire et de récipients et additifs, les unités et les intervalles de références mais aussi des informations sur le matériel : le type d'instrument, la référence des réactifs, les matériaux d'étalonnage. L'ensemble de ces informations sont en général disponibles et facilement accessibles dans les documents fournisseur (mode d'emploi, fiche réactifs...) et doivent être consignées dans le rapport de validation. Exemple : Description de la méthode pour la mesure des hématies, de l'hémoglobine et des leucocytes, cf. **annexe VII**.

2.1.5 Définir les critères de performance à vérifier

Pour déterminer quels sont les critères de performance à vérifier il convient de définir pour chaque examen le **type de flexibilité** et le **type de méthode** (quantitative ou qualitative).

Le laboratoire peut demander une accréditation suivant une portée flexible standard (A) ou suivant une portée flexible étendue (B).

La portée flexible standard (A) est défini comme une « portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du Cofrac, d'utiliser sous accréditation les révisions successives des méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées. »(2)

Selon la norme ISO 15189 chapitre 5.5.1 « les procédures d'examens validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une **vérification** indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement », celle-ci doit « doit confirmer, par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les performances annoncées pour la procédure ont été satisfaites »(3) En portée A, la validation des méthodes pour un LBM sera donc réduite à une « **vérification** » sur site. Celle-ci aura pour objectif de montrer que des performances suffisantes sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire. On adopte ainsi des méthodes reconnues (méthode normalisée, méthodes /équipements/ réactifs « fournisseur » correspondant à l'utilisation des DM-DIV marqués CE, ...) qui reposent sur des compétences techniques déjà démontrées. Le laboratoire doit vérifier que la méthode est bien utilisée dans son domaine et doit prouver sa maîtrise dans son environnement.

L'hémogramme automatisé correspond à une portée A et doit donc faire l'objet d'une VERIFICATION de méthode.

En matière de validation/vérification des méthodes, il est également nécessaire de distinguer deux cas : les méthodes de type quantitatif qui « fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule ou organisme,...) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes)» (4) et les méthodes de type qualitatif dont: « Le résultat ... n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée.»(4)

La détermination des paramètres de l'hémogramme automatisé correspond à une méthode quantitative.

Pour la réalisation de la vérification/validation de méthode le LBM peut se reporter au SH GTA 04 "Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / de validation (portée B) des méthodes en biologie médicale". Après une présentation générale du concept de validation de méthode, ce guide présente les critères de performance à vérifier par rapport aux spécifications définies, au type de méthode et donne des exemples pratiques de mise en œuvre. Ainsi pour une méthode quantitative de portée A le SH GTA 04 (4) préconise :

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A
<i>Spécificité analytique</i>	Oui	Non
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>	Oui	Oui
<i>Justesse (approche de la)</i>	Oui	Oui, dès que possible
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</i>	Oui	A vérifier si nécessaire ⁴
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</i>	Oui	Oui
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	Oui	Non
<i>Robustesse</i>	Non	Non
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)</i>	Oui	à vérifier si nécessaire ⁵
<i>Intervalle de référence « ex-valeurs normales »</i>	Oui	à vérifier dès que possible, si justifié
<i>Comparaison avec une méthode de référence</i>	Oui (si existe)	Non
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD)⁶</i>	Oui (si existe)	Oui (si possible)
<i>Analyse des discordances ⁷</i>	Oui	Oui

Donc la fidélité, la justesse, les incertitudes de mesures et la comparaison de méthode avec analyse des discordances doivent obligatoirement être vérifiées.

Pour les critères de performance à vérifier si nécessaire, il a été décidé de réaliser en raison du recrutement du laboratoire qui assure le suivi de nombreux patient en aplasie, une étude de la contamination pour les globules blancs et les plaquettes, ainsi que la détermination des limites de quantification pour ces deux mêmes paramètres.

L'évaluation des critères de performances performance a été réalisée grâce à un logiciel d'aide à la validation de méthode fourni par SYSMEX. Celui-ci a fait l'objet d'une vérification en amont. Ce logiciel permet notamment une extraction simplifiée des données directement à partir de l'automate diminuant ainsi le risque d'erreur lors de l'analyse des résultats.

Les autres critères de performances ont été validés sans vérification expérimentale, par rapport à la bibliographie essentiellement à partir du manuel utilisateur et d'autres documents établis par le fournisseur.

2.1.6 Choix des limites acceptables

L'objectif d'une vérification / validation de méthode est de déclarer l'aptitude du processus analytique par rapport à des limites acceptables ou des spécifications que le laboratoire s'est préalablement fixé. Le choix des limites acceptables doit se faire préalablement à la vérification bibliographique et expérimentale de la méthode.

On peut utiliser les limites acceptables définies par l'état de l'art, comme par exemple les critères publiés par la SFBC pour un certain nombre de paramètres de biochimie. Mais en ce qui concerne les paramètres d'hématologie cytologie, il n'existe à l'heure actuelle aucune publication de limites acceptables basées sur l'état de l'art.

Il existe une autre méthode de détermination des limites acceptables basé sur l'étude des variations biologiques intra et interindividuelles. Différents auteurs, Fraser, Ricos, définissent des spécifications minimales, souhaitables et optimales de fidélité intermédiaire (I), d'erreur de justesse (B : biais) et d'erreur totale (ET) en fonction des variations biologiques intra-individuelles et inter-individuelles de l'analyte considéré.

Niveau de performance	Optimale	Souhaitable	Minimale
Fidélité	$I < 0,25 * CVw$	$I < 0,5 * CVw$	$I < 0,75 * CVw$
Erreur de justesse	$B < 0,125 * (CVw^2 + CVb^2)^{1/2}$	$B < 0,25 * (CVw^2 + CVb^2)^{1/2}$	$B < 0,375 * (CVw^2 + CVb^2)^{1/2}$
Erreur totale	<ul style="list-style-type: none"> • $ET < (1,65 * I) + B$ • $(p < 0,05)$ 	<ul style="list-style-type: none"> • $ET < (1,65 * I) + B$ • $(p < 0,05)$ 	<ul style="list-style-type: none"> • $ET < (1,65 * I) + B$ • $(p < 0,05)$

Objectifs analytiques proposés par Fraser à partir de la variabilité biologique(5)

CVw = coefficient de variation intra individuelle ; CVb = coefficient de variation inter individuelle

Il faut noter que ce référentiel Ricos et al ne donne pas de critères d'acceptabilité pour des niveaux bas ou élevés mais seulement pour des niveaux considérés comme normaux contrairement à celui de la SFBC.

Les critères d'acceptabilité doivent être fixés en fonction des besoins du laboratoire, en tenant compte de l'interprétation clinique et de la particularité de ses patients. Cependant lors de la vérification de méthode initiale d'une méthode de portée A, il convient avant tout de s'assurer que les performances de l'automate répondent aux spécifications annoncées par le fournisseur.

Il a été décidé dans un souci d'uniformisation de choisir comme critères de performance pour l'ensemble des paramètres de l'hémogramme les items indiqués dans le tableau ci-dessous:

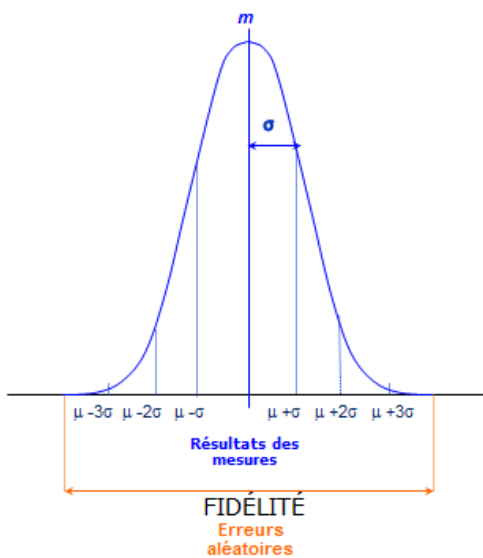
Critère de performance	Choix des limites acceptables
Fidélité intermédiaire	CV Ricos minimal ou CV fournisseur si inférieur à celui de Ricos
Répétabilité	0.75*CV Fi Ricos (6) ou CV fournisseur si inférieur à Ricos
Exactitude	critère retenu par l'organisme EEQ ProBioqual

2.2 Résultats : vérification expérimentales des critères de performance sur le XN-9000 de SYSMEX®.

La vérification expérimentale consiste à réaliser les essais nécessaires et à en exploiter les résultats afin d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire.

2.2.1 Fidélité

La fidélité correspond à la qualité de l'accord entre des mesures répétées du même spécimen dans des conditions précises. Elle s'évalue grâce à l'écart-type et au coefficient de variation. La fidélité correspond à l'erreur aléatoire.



2.2.1.1 Répétabilité

Définition : La répétabilité est le premier critère de performance à vérifier avant toute mise en route d'une nouvelle méthode. Son évaluation consiste à analyser dans un délai le plus court possible le même échantillon dans des conditions strictement identiques : même opérateur, même lot de réactif, même instrument, même étalonnage... « L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour le paramètre concerné. »(4). Les données acquises à l'installation pourront être ultérieurement utilisées pour mettre en évidence un dysfonctionnement au cours du temps.

Méthode : La répétabilité comme les autres critères de performances ont été déterminé sur chacun des trois modules de la chaîne analytique. Chaque module dispose d'un mode manuel et d'un mode automatique. Contrairement à l'automate XE, dans le XN ces deux modes disposent de la même aiguille et du même circuit d'analyse et il n'est donc pas nécessaire d'établir les critères de performance pour chacun d'eux. Pour établir la répétabilité il est recommandé d'utiliser au minimum 2 niveaux de concentration avec si possible un niveau proche de la zone décisionnelle, le nombre de déterminations idéal pour une interprétation statistique optimale est de 30.

Il a été décidé d'évaluer la répétabilité à partir des 3 niveaux des contrôles de qualité interne passés 30 fois dans la même série, par le même opérateur et avec les mêmes lots de réactifs. Les valeurs moyennes des différents niveaux de CQI pour l'ensemble des paramètres couvrent bien le domaine d'analyse. Pour chaque niveau et chaque paramètre on détermine la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation de répétabilité. Une répétabilité sur un échantillon patient « normal » a également été réalisée sur un des modules afin de s'assurer que les performances avec l'utilisation des CQI ne diffèrent pas de celles obtenues avec un échantillon patient.

Résultats

Paramètres	CV % fournisseur XN	CV % RICOS optimal	CV % RICOS souhaitable	CV % RICOS minimal	Niveau 1			Niveau 2			Niveau 3			Sang patient
					XN1	XN2	XN3	XN1	XN2	XN3	XN1	XN2	XN3	XN3
GR	1,5 (si > 4 T/L)	0,90	1,20	1,80	0,77	0,73	0,75	0,63	0,59	0,56	0,54	0,54	0,87	0,80
IDR	2,00	1,01	1,35	1,97	0,49	0,44	0,57	0,48	0,42	0,54	0,54	0,48	0,62	0,53
Ht	1,50	0,76	1,01	1,52	0,82	0,92	0,76	0,64	0,75	0,59	0,57	0,52	1,06	0,86
Hb	1,00	0,80	1,07	1,60	0,86	0,63	0,82	0,51	0,42	0,59	0,44	0,47	0,53	0,50
Pq Impédance	4,0 (si > 100G/L)	2,59	3,45	5,12	4,41	3,77	4,32	2,22	1,54	1,80	1,42	1,47	1,23	1,45
Pq PLT-F	2,5 (si > 100G/L), 5 (si > 20G/L)	2,59	3,45	5,12	\	2,36	2,38	\	1,20	1,23	\	0,74	0,82	1,00
GB	3,0 (si > 4 G/L)	3,22	4,30	6,41	1,93	1,63	1,64	1,84	1,14	1,15	0,97	0,78	0,83	1,50
Ly	8,0 (si > 0,6G/L)	2,87	3,83	5,74	4,15	4,15	3,25	2,82	3,57	3,58	4,11	2,59	4,69	3,07
PN	8,0 (si > 1,2G/L)	4,81	6,41	9,62	2,57	3,08	2,63	3,54	2,91	2,56	1,33	1,93	2,45	2,00
Mono	20,0 (si > 0,2 G/L)	5,01	6,68	10,01	7,88	6,72	7,07	5,47	5,86	7,33	6,26	3,97	8,09	6,51
PE	25,00	5,91	7,88	11,81	7,70	7,65	6,51	8,57	8,82	10,00	3,46	5,76	9,55	13,86
PB	40,00	7,88	10,50	15,75	3,51	3,49	2,32	3,23	2,61	2,90	2,42	2,02	2,32	20,76
Ret	15,00	3,09	4,13	6,19	\	2,52	2,24	\	2,48	2,94	\	4,05	4,46	3,53
EB	25,0 (pour GB > 4 g/L)	\	\	\	9,28	8,95	9,28	5,07	5,58	5,85	3,11	2,71	3,47	NR
IG	25,0 (pour GB > 4 g/L)	\	\	\	2,89	3,35	3,09	3,51	3,15	3,63	2,89	3,19	3,57	NR
plaquetocrite	6,00	3,38	4,50	6,69	\	\	\	3,20	2,05	2,92	1,60	1,75	1,63	1,45

Tableau de synthèse des résultats de la répétabilité pour les trois automates XN.

On peut conclure que les données de répétabilité obtenues pour l'ensemble des paramètres de l'hémogramme sont conformes aux limites acceptables fixées, et que les trois modules offrent des performances semblables.

Les CV de répétabilité obtenus avec le sang patient sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus avec les CQI. Seule exception, les CV des polynucléaires éosinophiles et basophiles obtenus avec le sang patient sont plus élevés que ceux des CQI mais restent conformes aux spécifications fournisseurs. Cette différence s'explique car la moyenne des PNEo et PNBa du sang frais était bien inférieure aux valeurs des CQI niveau 1 :

	Moyenne CQI niveau 1 (XN3)	Moyenne sang frais
PNEo	0.29 G/L	0.09 G/L
PNBa	0.14 G/L	0.02 G/L

2.2.1.2 Reproductibilité

Définition : La reproductibilité, encore appelée fidélité intermédiaire, consiste à effectuer plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon mais en faisant varier les conditions opératoires comme les opérateurs ou les lots de réactifs pendant un intervalle de temps

donné. L'objectif est de connaître la variabilité analytique de la méthode. Si les résultats d'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité sont proches, cela constitue une manifestation de la robustesse de la méthode.

Méthode: Le SH-GTA 04 préconise 30 déterminations établies sur au moins 15 jours et au minimum à deux niveaux de concentration. Le délai de conservation d'un échantillon sanguin pour la réalisation d'une NFS étant de 24h maximum, l'utilisation d'échantillons de patients pour la détermination de la FI n'était pas adaptée, et il a donc été décidé d'utiliser les contrôles de qualité internes (CQI). Les trois niveaux de CQI bas, moyen et haut ont été passés 2 fois par jour pendant 15 jours. Comme pour la répétabilité la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation ont été déterminés pour chaque niveau et pour chaque paramètre.

Résultats :

Paramètres	CV % fournisseur XN	CV % RICOS optimal	CV % RICOS souhaitable	CV % RICOS minimal	Niveau 1			Niveau 2			Niveau 3		
					XN1	XN2	XN3	XN1	XN2	XN3	XN1	XN2	XN3
GR	2,00 (si > 4 T/L)	0,80	1,60	2,40	0,73	0,79	0,82	0,65	0,68	0,54	0,68	0,55	0,67
IDR	2,67	0,88	1,75	2,63	0,59	0,56	0,54	0,73	0,68	0,71	0,56	0,50	0,70
Ht	2,00	0,68	1,35	2,03	0,78	1,04	0,85	0,99	0,95	0,77	0,87	0,77	0,89
Hb	1,33	0,71	1,43	2,14	0,80	0,88	0,66	0,54	0,50	0,53	0,43	0,63	0,40
Pq Impédance	5,3 (si > 100G/L)	2,28	4,55	6,83	5,69	7,16	7,38	2,39	1,54	2,08	1,60	2,23	1,33
Pq PLT-F	3,3 (si > 100G/L), 6,65 (si > 20G/L)	2,28	4,55	6,83		2,71	3,24		1,52	1,74		1,01	1,08
GB	3,99 (si > 4 G/L)	2,85	5,70	8,55	1,96	1,56	1,67	1,60	1,18	1,60	1,20	1,15	1,07
Ly	10,64 (si > 0,6G/L)	2,55	5,10	7,65	3,17	4,81	3,84	3,96	2,97	3,23	2,60	2,61	4,26
PN	10,64 (si > 1,2G/L)	4,28	8,55	12,83	3,49	3,66	4,09	2,87	2,57	2,25	2,35	2,25	2,19
Mono	26,60 (si > 0,2 G/L)	4,45	8,90	13,35	8,20	7,23	7,41	6,87	6,33	9,54	2,44	3,86	7,26
PE	33,25	5,25	10,50	15,75	7,34	7,87	7,08	8,22	7,73	8,32	7,60	8,93	7,86
PB	53,33	7,00	14,00	21,00	2,75	3,74	3,41	3,65	2,45	2,89	2,39	2,48	2,77
Ret	20,00	2,75	5,50	8,25		2,80	3,05		3,21	3,38		3,53	4,93
EB	33,25 (pour GB > 4 g/L)				9,55	11,35	7,54	5,73	5,26	4,36	3,52	2,77	3,39
IG	33,25 (pour GB > 4 g/L)				4,41	4,02	4,17	3,50	3,53	3,94	3,97	3,26	3,96
plaquetocrite	8,00	2,98	5,95	8,93				2,92	3,09	2,72	2,00	1,82	1,73

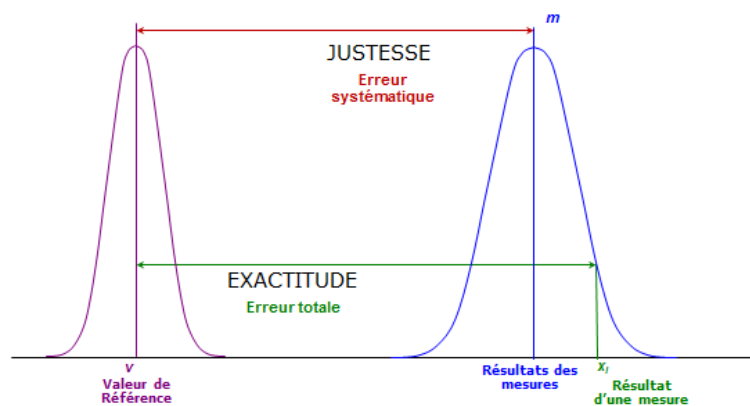
Tableau de synthèse des résultats de la fidélité intermédiaire pour les trois automates XN.

On peut conclure que, dans l'ensemble, les données de reproductibilité obtenues pour les paramètres de l'hémogramme sont conformes aux limites acceptables. Il faut cependant noter l'exception des CV élevés obtenus pour le niveau 1 des plaquettes en impédance (PLT-I). La moyenne du CQI niveau 1 pour les PLT-I est de 39 G/L, or le CV fournisseur est indiqué comme étant valable uniquement pour des plaquettes > 100G/L. Le coefficient de variation

obtenu est néanmoins très proche de la limite supérieure acceptable Ricos, qui a été établie pour une population "normale". Une variation de 7 % sur le niveau bas est jugée sans impact clinique. La reproductibilité est donc considérée validée.

On peut également noter que les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont relativement proches ce qui démontre la robustesse des méthodes de mesure.

2.2.2 Justesse /exactitude



2.2.2.1 Justesse

Définition : La justesse correspond à la qualité de l'accord entre la moyenne d'une série de mesures et la valeur vraie. L'objectif est d'évaluer l'erreur systématique encore appelé biais. L'obtention d'une valeur vraie nécessite l'utilisation d'un matériau de référence certifié ce qui n'est pas toujours possible. Dans ce cas, le biais est alors déterminé par rapport à une « valeur cible ».

Méthode : la justesse est déterminée grâce au CQI externalisé.

L'e

Méthode: L' « inexactitude » de la méthode est déterminée grâce à l'exploitation des évaluations externes de la qualité (EEQ)

$$Z - \text{Score} = \frac{(X_{\text{labo}} - m_{\text{groupe de comparaison}})}{ET_{\text{groupe de comparaison}}}$$

	Nombre groupe de pairs/ toutes techniques	Valeur Labo	Moyenne (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Z-score (groupe de pairs)	Z-score (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Conclusion
Echantillon CQE n°14HD01	74/1013	24,9	24,58	24,62	0,4	0,3	1,30	1,14	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD02	72/1011	2,1	2,05	2,07	0,7	0,2	2,44	1,45	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD03	74/994	3,14	3,10	3,18	0,5	-0,2	1,29	-1,26	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD04	74/994	9,15	9,11	9,33	-0,4	0,1	0,44	-1,93	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HDF3	42/361	4,62	4,54	4,43	0,6	0,9	1,76	4,29	7,3	Conforme

	Nombre groupe de pairs/ toutes techniques	Valeur Labo	Moyenne (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Z-score (groupe de pairs)	Z-score (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Conclusion
Echantillon CQE n°14HD01	77/1021	469	477,4	475,5	-0,6	0,2	-1,76	-1,37	10	Conforme
Echantillon CQE n°14HD02	75/1018	134	132,9	146,6	0,2	-0,9	0,83	-8,59	10	Conforme
Echantillon CQE n°14HD03	75/994	389	382,5	424,7	0,4	-1	1,70	-8,41	10	Conforme
Echantillon CQE n°14HD04	75/994	237	229,3	233,7	1	0,2	3,36	1,41	10	Conforme

Exemple2 : tableau de synthèse des résultats de l'exactitude pour les plaquettes en impédance sur le module XN3.

L'exactitude retenue est celle déterminée par comparaison avec le groupe de pairs et non celle par comparaison avec toutes techniques car il n'existe pas de seuil de décision standardisé pour les paramètres concernés.(4) Sur les 3 modules, pour l'ensemble des paramètres de la numération l'exactitude est conforme aux spécifications attendues pour le groupe de pairs.

2.2.3 Limite de quantification

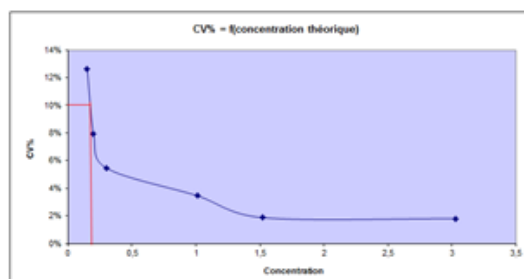
Définition : La limite de quantification est la valeur la plus faible pouvant être mesurée avec un niveau de confiance acceptable. Il ne faut pas la confondre avec la limite de détection qui correspond à la plus petite quantité détectable et différente du blanc.

Méthode : La limite de quantification a été déterminée sur le XN3 en effectuant des dilutions à partir de l'échantillon du niveau 1 de CQI donc de concentration connue. Chaque dilution est analysée une dizaine de fois dans des conditions de répétabilité, ce qui permet de calculer le CV pour chacune d'entre elles. La limite de quantification correspond à la première dilution pour laquelle le CV est acceptable c'est-à-dire $\leq 10\%$. La valeur ainsi obtenue a ensuite été vérifiée sur l'ensemble des modules XN par le passage d'un échantillon patient à une concentration voisine de ce seuil, une dizaine de fois avec le calcul du CV.

Résultat : exemple pour les leucocytes :

Dilution à partir du CQI niveau 1 sur le XN 3

CQI niveau 1	Dilution à réaliser à l'aide du diluant :					
	Pur	1/2	1/3	1/10	1/15	1/20
Bas	1000	1000	1000	200	200	100
Diluant	0	1000	2000	1800	2800	1900
Concentration théorique	3,03	1,52	1,01	0,3	0,2	0,15
réplicat 1	3	1,63	1,08	0,35	0,21	0,17
réplicat 2	3	1,56	1,17	0,38	0,22	0,21
réplicat 3	3,09	1,59	1,13	0,37	0,24	0,13
réplicat 4	3,04	1,63	1,13	0,35	0,22	0,2
réplicat 5	3,08	1,61	1,15	0,34	0,23	0,18
réplicat 6	3,06	1,62	1,08	0,4	0,25	0,17
réplicat 7	3,04	1,56	1,1	0,36	0,24	0,19
réplicat 8	2,91	1,6	1,2	0,35	0,2	0,17
réplicat 9	3,07	1,64	1,16	0,39	0,26	0,19
réplicat 10	2,99	1,57	1,12	0,38	0,23	0,2
moyenne	3,028	1,601	1,132	0,367	0,23	0,181
écart-type	0,05432	0,02998	0,0391	0,02003	0,01826	0,02283
CV	2%	2%	3%	5%	8%	13%



Vérification à partir échantillons patients

Échantillon patient	XN3		XN2		XN1		
	140570508	140640514	140570508	140640514	140570508	140640514	140640529
N°	GB	GB	GB	GB	GB	GB	GB
10	0,24	0,17	0,21	0,19	0,22	0,19	0,08
9	0,24	0,22	0,2	0,18	0,23	0,18	0,08
8	0,24	0,19	0,21	0,2	0,24	0,17	0,07
7	0,24	0,22	0,19	0,2	0,24	0,18	0,08
6	0,25	0,21	0,2	0,17	0,26	0,16	0,1
5	0,27	0,23	0,18	0,17	0,24	0,18	0,08
4	0,29	0,21	0,21	0,19	0,21	0,18	0,07
3	0,25	0,23	0,19	0,19	0,21	0,17	0,06
2	0,25	0,23	0,19	0,19	0,21	0,18	0,07
1	0,22	0,21	0,19	0,17	0,23	0,17	0,07
moyenne	0,25	0,21	0,20	0,19	0,23	0,18	0,08
écart-type	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
CV	7,28	8,65	5,10	6,04	6,89	4,55	15,42

La limite de quantification des leucocytes a donc été fixée à 0.20 G/L.

Les Paramètres	GB	PLT-I	PLT-F
Limite de quantification	0.2 G/L	10 G/L	5 G/L

Limites de quantification retenues pour les paramètres testés sur les automates XN

Une des règles « rerun » gérée par l'automate c'est le repassage des plaquettes < 20 G/L dans le mode fluo. La détermination de la limite de quantification des plaquettes en apporte une justification en effet ce mode de comptage possède une limite de quantification plus basse que le mode impédance. De plus le CV de répétabilité et de reproductibilité des PLT-F du niveau bas du CQI est inférieur à celui des PLT-I. Confère tableau de résultat de la répétabilité et reproductibilité.

2.2.4 Contamination inter-échantillons

Définition : La contamination est un « phénomène qui résulte du transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre tel qu'il produit une modification dont l'effet peut être évalué et quantifié »(7). Il est intéressant de vérifier l'existence d'une contamination en particulier

pour les paramètres pour lesquels il existe un différentiel de concentration important en physiopathologie.

Il a été décidé, en raison du recrutement du laboratoire de vérifier la contamination pour les globules blancs et les plaquettes. En effet, le LBM assure le diagnostic et le suivi de nombreuses hémopathies impliquant des variations importantes de ces deux paramètres.

Méthode : L'étude de la contamination consiste, à analyser successivement :

- Un échantillon présentant un taux élevé du paramètre mesuré, 3 fois : H1, H2, H3
- Puis un échantillon présentant un taux bas du même paramètre, 3 fois : B1, B2, B3

Pour une meilleure représentativité et afin de réduire les erreurs aléatoires, cette séquence de mesure (H1, H2, H3, B1, B2, B3) a été répétée 3 fois de suite. On calcule ainsi un pourcentage de contamination qui sera comparé à celui annoncé par le fournisseur.

$$\text{Contamination \%} = 100 \times \frac{(B1m - B3m)}{(Hm - B3m)}$$

B1m = moyenne des B1
 B3m = moyenne des B3
 Hm = moyenne des H

L'analyse de la contamination a été réalisée à partir d'échantillons de patients.

<u>Résultat</u>		% contamination			
		XN1	XN2	XN3	Annoncé par le fournisseur
Globules Blancs Echantillon haut= 71.2 G/L / Echantillon bas = 0.31 G/L		0.01	0.04	0.00	< 1.0
Plaquettes Echantillon haut= 2116 G/L Echantillon bas = 22 G/L	PLT-I	0.06	0.13	0.03	< 1.0
	PLT-F	NA	0.12	0.07	< 1.0

Tableau de synthèse des résultats des tests de contamination effectués

On peut conclure à l'absence de contamination pour les paramètres testés.

2.2.5 Comparaison

Définition : La comparaison de méthode permet de vérifier la corrélation entre deux méthodes ou deux équipements qui mesurent les mêmes paramètres, que ce soit lors d'un

changement d'automate ou entre des automates en miroir ou en back-up. Elle est réalisée après vérification des autres critères de performance (répétabilité, fidélité intermédiaire...). Sa réalisation est obligatoire si l'on souhaite utiliser les antécédents des patients dans leur suivi. En cas de discordance entre deux méthodes ou deux automates, il conviendra d'évaluer les causes et d'en informer les prescripteurs et les patients.

L'installation de la nouvelle chaîne a nécessité le passage par des automates de transition. La comparaison de méthode a donc dû dans un premier temps être réalisée entre l'automate référent de l'ancienne chaîne et les deux automates prêtés, puis secondairement entre la chaîne de transition et la nouvelle chaîne analytique. De plus, le laboratoire étant établi sur deux sites qui réalisent des numérations sanguines, la corrélation entre les automates de ces deux sites a également été vérifiée.

Schéma des différentes comparaisons de méthode effectuées, cf. **annexe VIII**.

Méthode : Pour vérifier la comparabilité entre deux automates, différents échantillons sont analysés successivement sur les deux instruments dans un délai le plus court possible afin de limiter une éventuelle dérive pouvant être due à une instabilité de l'échantillon. Le choix des échantillons est important et il faut tester un effectif de taille significative. Nous avons choisi d'en sélectionner 40 selon les recommandations de la SFBC. Ces échantillons ont été sélectionnés afin de couvrir au mieux la gamme de mesure des valeurs rencontrées en physiopathologie. Dans ce but nous avons réalisé un tableau d'aide pour sélectionner au mieux les échantillons de patients.

Paramètres	Niv 1		Niv 2		Niv 3	
	Concentrations	Effectif	Concentrations	Effectif	Concentrations	Effectif
GR	<3,5 T/L	> 8	3,5 - 5,0 T/L	>12	> 5,0 T/L	> 8
Ht	< 30 %	> 8	30 -42 %	>12	> 42 %	> 8
Hb	< 10 g/dL	> 8	10 -14,5 g/dL	>12	> 14,5 g/dL	> 8
Plaquettes	< 150 G/L	> 8	150 – 400	>12	> 400	> 8
GB	<4 G/L	> 8	4- 15 G/L	>12	>15 G/L	> 8
PN	< 2,5 G/L	> 8	2,5- 10 G/L	>12	> 10 G/L	> 8
Ly	<1,5 G/L	> 8	1,5 -3,5 G/L	>12	> 3,5 G/L	> 8
Mono	< 0,4 G/L	> 8	0,4 - 1,2 G/L	>12	> 1,2 G/L	> 8
PNEo	< 0,05 G/L	> 8	0,05 - 0,4 G/L	>12	> 0,4 G/L	> 8
PNBa	< 0,01 G/L	> 8	0,01- 0,05 G/L	>12	> 0,05 G/L	> 8

Tableau d'aide à la sélection des échantillons pour les comparaisons de méthode

L'exploitation des résultats s'est faite de manière globale par la réalisation du diagramme de dispersion des valeurs et le calcul de la droite de régression. La pente doit être la plus proche de 1 et l'ordonnée à l'origine doit être la plus proche de 0. Le coefficient de corrélation n'a qu'un intérêt très limité il sert uniquement à démontrer un lien entre deux variables indépendantes et n'est donc pas suffisant pour démontrer la comparabilité entre deux méthodes. L'analyse des résultats individuels s'est faite grâce au diagramme des différences et des rapports interprétés par rapport à des limites acceptables. Pour chacun des couples retenus x_i (méthode A) et y_i (méthode B) les différences $x_i - y_i$ sont calculées ainsi que les rapports y_i/x_i et les graphiques des différences, $(x_i - y_i)$ en fonction de x_i et des rapports (y_i / x_i) en fonction de x_i sont établis. L'analyse de ces graphes permet de repérer les échantillons déviants ainsi que d'éventuelles différences systématiques.

L'analyse des résultats doit être effectuée rapidement après le passage des échantillons afin de détecter précocement des discordances et de pouvoir effectuer des vérifications le cas échéant.

Exemple :

Paramètres	nombre d'essais	Intervalle de comparaison	Equation droite de regression	r2	nombre de déviants
GR	40	2,31 - 5,87 T/L	$y = 0,964 x + 0,650$	0,998	0
Ht	40	21,3 - 51,0 %	$y = 0,973 x + 0,723$	0,998	0
Hb	40	6,9 - 17,9 g/dL	$y = 0,989 x + 0,141$	0,999	0
Plaquettes	40	2 - 860 G/L	$y = 1,002 x + 0,279$	0,998	0
GB	39	1,11 - 26,13 G/L	$y = 1,001 x + 0,032$	0,999	0
PN	40	0,75 - 24,95 G/L	$y = 1,005 x + 0,003$	0,999	0
Ly	39	0,04 - 7,9 G/L	$y = 1,000 x - 0,011$	0,998	2
Mono	40	0,04 - 2,16 G/L	$y = 0,987 x - 0,021$	0,984	0
Eo	40	0,00 - 1,05 G/L	$y = 1,005 x + 0,001$	0,988	0
Baso	40	0,00 - 0,16 G/L	$y = 0,880 x + 0,006$	0,816	1

Résultats de la comparaison entre l'automate XN3et l'automate XN2:

En ce qui concerne les globules blancs et les lymphocytes, un échantillon à 109 G/L a été « retiré » de la série, car sa valeur très élevée faussait l'équation de la droite de régression. Deux points discordants (0,11 vs 0,23 et 0,11 vs 0,32 G/L) ont été observés, concernant deux patients lymphopéniques. Ces différences étaient sans impact clinique. De plus, pour un des

deux patients, la formule aurait été contrôlée manuellement. Pour ces raisons la corrélation entre les deux automates a été jugée conforme.

Par ailleurs l'ensemble des comparaisons d'automate effectuées a été jugée conforme.

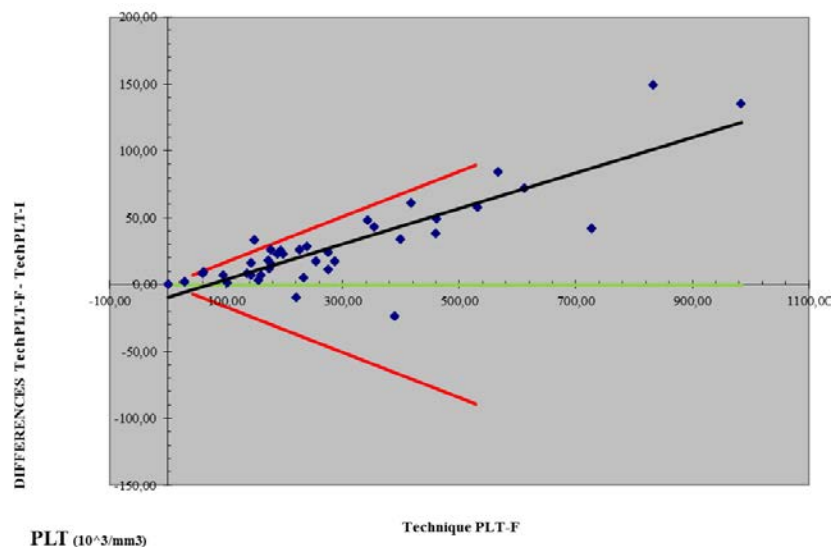
A noter qu'une comparaison des canaux plaquettes impédance versus plaquettes fluo a également été réalisée sur les deux automates équipés. La valeur des plaquettes mesurée avec le canal fluo est rendue quand la valeur obtenue avec le canal impédance est inférieure à 20 G/L ou si le graphe est anormal. Les résultats du XN2 et XN3 sont comparables.

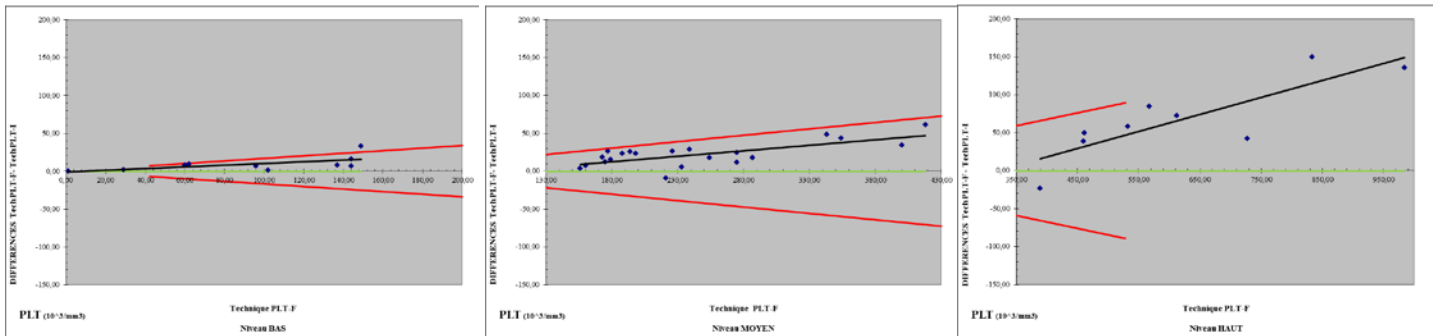
Exemple :

Comparaison PLT-I / PLT-F sur le XN2					
Nombre d'essais		Intervalle de comparaison	Equation droite de régression	r ²	Nombre de déviants
Tous	40	1 – 849 G/L	$y = 0.867 x + 9.880$	0.991	2
Niveau BAS	10	1 – 137 G/L	$y = 0.888 x + 1.212$	0.970	1
Niveau MOYEN	21	151 – 366 G/L	$y = 0.856 x + 13.483$	0.972	0
Niveau HAUT	9	412 – 849 G/L	$y = 0.777 x + 71.075$	0.965	1

Résultats de la comparaison PLT-I/PLT-F sur le XN2

Diagramme des différences :





La comparaison entre les plaquettes impédance et fluo est jugée conforme. Cependant la technique de cytométrie en flux donne dans l'ensemble des résultats supérieurs à la technique d'impédance. Cette différence s'accroît nettement pour les valeurs hautes de plaquettes. Le mode plaquette fluo est donc à proscrire dans les valeurs hautes et à utiliser pour les valeurs moyennes et surtout dans les valeurs basses.

2.3 Vérification des paramètres calculés

L'hémogramme comprend des paramètres mesurés qui comme on l'a vu font l'objet d'une vérification de méthode, mais aussi un certain nombre de paramètres qui sont calculés à partir d'eux. On se doit de vérifier que les calculs sont correctement réalisés.

Vérification des paramètres calculés, cf. **annexe IX**.

2.4 Vérification de la bonne exécution des règles d'expertise.

La nouveauté de cette chaîne analytique réside entre autres dans l'application automatique d'un certain nombre de règles d'expertise qui ont été paramétrées par les biologistes sur le middleware MPL. Ces règles, établies à partir de la bibliographie et de l'expérience acquise, constituent des aides à la vérification technique, et permettent une certaine standardisation dans la gestion des échantillons patients. Ces règles ne se substituent en aucun cas au technicien qui valide techniquement toutes les demandes. Elles s'appliquent à la réception par l'automate du résultat brut obtenu lors du 1^{er} passage du tube. Elles permettent le repassage, l'ajout d'analyses induisant un repassage automatique, la suppression d'analyses, l'ajout de commentaires en regard des résultats sur MPL, la mise en alarme des résultats, la modification de certains résultats ou encore la création de lame. De nombreuses règles d'expertises ont été programmées, cf. **annexe X**.

La bonne exécution de ces règles d'expertise se doit d'être vérifiée et fait partie de la vérification de méthode. Un groupe de travail « informatique » composé d'un biologiste et des deux techniciens référents informatiques et d'un interne, s'est chargé de ce travail.

Une fois l'ensemble des règles paramétrées sur le middleware, une série de demandes-test ont été créées afin de vérifier l'application correcte de ces dernières. Des copies d'écrans constituent la preuve de cette vérification. Ces tests ont eu lieu avant la mise en service de la chaîne. Des tests similaires ont lieu à chaque changement intervenant sur le système informatique, comme le passage à une nouvelle version du logiciel. Un tableau Excel a été élaboré reprenant l'ensemble des règles d'expertise avec les liens renvoyant aux copies d'écran justifiant ainsi leur vérification.

Exemple : cf. **annexe XI**.

Au moment du passage en routine, une période probatoire a été réalisée pendant laquelle une vérification technique en double a été mise en place avec un technicien et une personne du groupe de travail informatique. Le but était de maintenir une expertise de chaque demande d'examen pendant le temps nécessaire permettant de s'assurer que le système était parfaitement opérationnel.

3 Conclusion : Rapport de validation de méthode

Comme on l'a vu la vérification expérimentale sur site a pour but de démontrer que la méthode (couple analyseur/réactif) fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire et qu'elle donne des résultats sûrs pour les patients. Un rapport a été réalisé pour chacun des paramètres mesurés de l'hémogramme regroupant les performances des trois modules de la chaîne analytique. La cellule qualité a créé un rapport type de validation/vérification des méthodes quantitatives (réf : 7180-IM-055) en format Excel inspiré du SH FORM 43 (fiche type quantitatif pour la vérification/validation de méthode) qui a été utilisé pour l'ensemble des paramètres de la numération-formule. Un extrait du rapport de validation des leucocytes est présenté en **annexe XII**. Il restera à déterminer les incertitudes de mesures pour l'ensemble de ces paramètres.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont été jugé conforme aux critères d'acceptabilité définis au préalable, et la méthode considérée comme apte à être utilisée en routine.


L'ensemble des résultats brut provenant des automates ayant servi à la vérification de méthode ont été conservé dans des fichiers informatiques. Les numéros des lots des réactifs et CQI utilisées ont été consignés ainsi que les noms des opérateurs ayant participé à la vérification.

Une fois le rapport terminé, le fichier sera converti en format PDF et archivé dans un emplacement prédéfini par la cellule qualité avec l'ensemble des rapports de validation de méthode du laboratoire.

Bibliographie :

1. Sysmex® corporation. Mode d'emploi - Série XN. 2010.
2. COFRAC, section Santé humaine. SH REF 08 Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 1 [Internet]. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
3. Afnor, NF EN ISO 15189:2012 - Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigence concernant la qualité et la compétence. 2012 sept.
4. COFRAC, section Santé humaine. SH-GTA-04 : guide technique d'accréditation de vérification (Portée A) / validation (Portée B) des méthodes en biologie médicale. [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
5. Scherrer F, Boisson RC, Cartier R, Cohen R, Eynard JC, Poggi B, et al. Réflexion sur le choix des limites acceptables dans les programmes d'évaluation externe de la qualité. Ann Biol Clin (Paris). déc 2007;65(6):677- 684.
6. Vassault A, Grafmeyer D, Graeve J de, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Ann Biol Clin (Paris). 24 nov 1999;57(6):685- 95.
7. VASSAULT A, HULIN A, CHAPUZET E, ARNAUD J, GIRAUD C, groupe de travail SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. 2010;68 (hors-série n°1):247- 294.

Annexe I : Organigramme du laboratoire

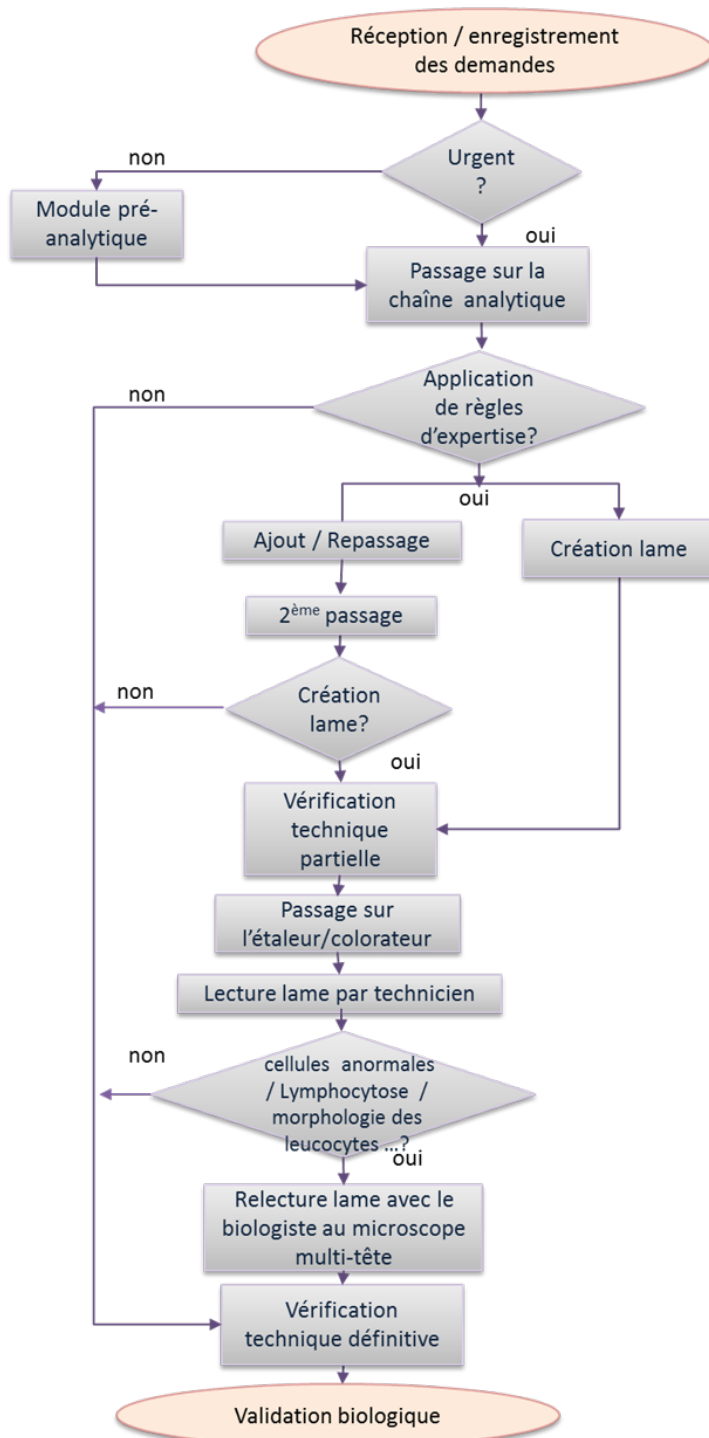
	DOCUMENT INFORMATIF Organigramme du service d'Hématologie	Diffusion par : PHU 07 - Biologie - HEMATOLOGIE	9240-DI-079
Processus : MGT-Management/Organisation - Communication		Page 1 / 1	V. 01

Direction biologie Pr Patrick LUSTENBERGER <i>Directeur médical</i> Isabelle BERARD <i>Cadre administratif</i> Marie-Paule MELLERIN <i>Cadre supérieur</i> Cellule qualité Valérie LE PAGE <i>Responsable Management Qualité</i> Florent KRASKE <i>Assistant Qualité</i> Pascal VERDIER <i>Biologiste, référent validation de méthode</i>	service : HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE	Chef de service : Pr Marie-Christine BÉNÉ PU PH		
	Site : Hôtel Dieu	Cadre de santé : François CARCOUËT		
	Responsable qualité Elodie BOISSIER Responsable informatique Marc FOUASSIER Responsable métrologie	UF 9104 / Cytologie Soraya WUILLEME, PH <i>Responsable</i> Marion EVEILLARD, PHC Yannick LE BRIS, AHU Sophie NION, ATT (0.2) Elisabeth LETARD, ATT (0.1) François SUBIGER, ATT (0.1) Claire AUDEBERT Marine CARL Alexis CHARPENTIER Myriam CHEVALIER Samuel CONTAMINE Elodie DUCLOUX Sandrine GRIMAULT Marie-France LE GOFF Stéphanie ROCUET Aline ROCHERIOUX Khadija VIAU	UF 9103 / Hémostase Marc TROSSAERT, PH <i>Responsable</i> Marc FOUASSIER, PH Marianne SIGAUD, PH Catherine TERNISIEN, PH Assori ITOUAN GAPORO, AS Catherine BADAUD Emmanuelle CADOR Gwennaëlle CHOLLET Nathalie DELANOE Pauline HENSEVAL Nathalie LE COQ Anne-Sophie LUQUET Catherine VEINSTEIN UF 9106 / Culture cellulaire Sylvie HERMOUET MCU PH	UF 9107 / Cytométrie Flux Marie-Christine BÉNÉ PUPH <i>Responsable</i> Soraya WUILLEME, PH Marion EVEILLARD, PHC Yannick LE BRIS, AHU Nelly ROBILLARD, IH Yves GARREAU Christophe GUILLEVIN Alexia MERLOZ Caroline PANNETIER UF 9311 / Tumorothèque Laurence LODE, PH <i>Responsable</i> Réjane DOUAUD Olivia NAGEL Anne PORTUGAL
Site : HGRL		Cadre de santé : François CARCOUËT		
UF 9302 / Cytologie - Hémostase Elodie BOISSIER, ATT <i>Responsable</i> Simone BONNET Françoise OERTLIN Véronique VAILLANT	Nathalie LOQUAI Fanny LENOBLE	UF 9227 / Unité Mixte de Génomique du Cancer Stéphane MINVIELLE, DR Florence MAGRANGEAS, IH Elise DOUILLARD Nathalie ROI		

REDACTEUR(S)	VERIFICATEUR(S)	APPROBATEUR(S)	Date d'application
Elodie BOISSIER (Responsable qualité - PHU 07 - Biologie/Hématologie)	Francois CARCOUËT (Cadre de santé - PHU 07 - Biologie/Hématologie)	Marie christine BENE (Chef de service - PHU 07 - Biologie/Hématologie)	23/04/2014

Annexe II

Logigramme de la réalisation de la NFS



Annexe III: Extrait plan expérimental global pour la numération (7180-IM-062)

Examen	Nature du spécimen	Type de méthode <i>qualitatif / quantitatif</i>	Portée <i>A/B</i>	Type de validation <i>rétrospective / initiale / partielle</i>	Service <i>code UF</i>	Unités	Référence du réactif	Automates	Analyses réalisées sur HGRL <i>oui / non</i>	Technicien (s) responsable (s)	Biologiste (s) responsable (s)	Planification	
												Date de début	Date de fin
GR	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	T/L	CELLPACK DCL + CELLPACK PST	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	07/03/2014
Ht	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	%	CELLPACK DCL + CELLPACK PST	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	07/03/2014
Hb	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	g/dl	SULFLYSER + CELLPACK DCL + CELLPACK PST	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	07/03/2014
Plaquettes (impédance)	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	G/L	CELLPACK DCL + CELLPACK PST	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	07/03/2014
Plaquette fluo (PLT-F)	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	G/L	FLUOROCELL PLTF + CELLPACK DFL	XN 9000 2/3	non	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	07/03/2014
Plaquetocrite	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	%	CELLPACK DCL + CELLPACK PST	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	08/03/2014
GB	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	G/L	FLUOROCELL + LYSERCELL WNR	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	07/03/2014
IDR	Sang EDTA	quantitatif	A	Validation/Vérification initiale	9104	%	CELLPACK DCL + CELLPACK PST	XN 9000 1/2/3;	oui	Elodie DUCLOUX Stéphanie ROCUET	S. Wuilleme	24/02/2014	08/03/2014

Examen	Répétabilité														
	Niveau	Type d'échantillon	Nombre de mesures	date	Critères d'acceptabilité	Niveau	Type d'échantillon	Nombre de mesures	date	Critères d'acceptabilité	Niveau	Type d'échantillon	Nombre de mesures	date	Critères d'acceptabilité
GR	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur
Ht	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur
Hb	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur
Plaquettes (impédance)	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur
Plaquette fluo (PLT-F)	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Fournisseur
Plaquetocrite						Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur
GB	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur
IDR	Bas	CQI XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	24/02/2014	Ricos minimal/fournisseur

Examen	Fidélité intermédiaire (reproductibilité)														
	Niveau concentration	Type d'échantillon	Nombre de mesures	Période / Conditions	Critères d'acceptabilité	Niveau concentration	Type d'échantillon	Nombre de mesures	Période / Conditions	Critères d'acceptabilité	Niveau concentration	Type d'échantillon	Nombre de mesures	Période / Conditions	Critères d'acceptabilité
GR	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	CQI	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur
Ht	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	CQI	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur
Hb	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	CQI	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur
Pq (impédance)	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur
Pq (PLT-F)	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Fournisseur
Plaquetocrite						Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur
GB	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur
IDR	Bas	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Moyen	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur	Haut	XN CHECK CX264998B	30	temps nécessaire pour 30 valeurs de CQI (meme numero de lot)	Ricos minimal/fournisseur


Examen	Exactitude		Limite de quantification			Contamination inter-échantillon			Approbation de la planification		
	Description	Critères d'acceptabilité	A faire oui / non	Description	Critères d'acceptabilité	A faire oui / non	Description	Critères d'acceptabilité	Rédacteur	Approbateur	Date
GR	EEQ	Probioqual	non			non			M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
Ht	EEQ	Probioqual	non			non			M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
Hb	EEQ	Probioqual	non			non			M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
Pq (impédance)	EEQ	Probioqual	oui	Méthode du pole 7180-IM méthode des dilutions	plus faible concentration correspondant à un CV de 10%	oui	passer un échantillon "haut" 3x suivi d'un échantillon "bas" 3x. Cette série est à répéter 3x	Seuil fournisseur	M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
Pq (PLT-F)	EEQ	Probioqual	oui	Méthode du pole 7180-IM méthode des dilutions	plus faible concentration correspondant à un CV de 10%	oui	passer un échantillon "haut" 3x suivi d'un échantillon "bas" 3x. Cette série est à répéter 3x	Seuil fournisseur	M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
Plaquetocrite	EEQ	Probioqual	non			non			M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
GB	EEQ	Probioqual	oui	Méthode du pole 7180-IM méthode des dilutions	plus faible concentration correspondant à un CV de 10%	oui	passer un échantillon "haut" 3x suivi d'un échantillon "bas" 3x. Cette série est à répéter 3x	Seuil fournisseur	M. Branger	S. Wulleme	24/01/2014
IDR	EEQ	Probioqual	non			non			M. Branger	S. Wulleme	25/01/2014

Annexe IV : Liste des paramètres mesurés et calculé pour les automates SYSMEX

Paramètres mesurés		
Paramètre	unité	Principe mesure
GR (globule rouge)	T/L	Impédance
Ht (hématocrite)	%	Impédance
Hb (hémoglobine)	g/dl	Spectrophotométrie
IDR (indice de répartition des rouges)	%	Impédance
PLT-I (plaquette impédance)	G/L	Impédance
PLT-F (plaquette mode fluo)	G/L	C.M.F
Plaquetocrite	%	Impédance
GB (globule blanc)	G/L	C.M.F
PN (Polynucléaire neutrophile)	G/L	C.M.F
Ly (Lymphocyte)	G/L	C.M.F
Mono (Monocyte)	G/L	C.M.F
PNEo (Polynucléaire Eosinophile)	G/L	C.M.F
PNBa (Polynucléaire basophile)	G/L	C.M.F
IG (Immature granuleux)	%	C.M.F
EB (erythroblaste)	G/L	C.M.F
Réticulocytes	G/L	C.M.F

Paramètres calculés		
Paramètre	unité	Calcul
VGM (volume globulaire moyen)	fl	$Ht(\%)*10/GR(T/L)$
CCMH (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine)	g/dl	$Hb(g/dl)*100/Ht(\%)$
TCMH (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine)	pg	$Hb(g/dl)*10/GR(T/L)$
VPM (volume plaquettaire moyen)	fl	$PCT \% *10000/ PLT (G/L)$
PN	%	$PN(G/L)*100/GB(G/L)$
Ly	%	$Ly(G/L)*100/GB(G/L)$
Mono	%	$Mono(G/L)*100/GB (G/L)$
PNEo	%	$PNEo(\%)*100/GB(G/L)$
PNBa	%	$PNBa(\%)*100/GB(G/L)$
IG	%	$IG(\%)*100/GB(G/L)$
Réticulocytes	G/L	$Ret\%o *GR*10^3/1000$
EB	%	$EB(\%)*100/TNC-N(G/L)$

Annexe V : extrait analyse de risque hémogramme automatisé.

		Imprimé ANALYSE DE RISQUE	7180-IM-033							
		Processus : Assurance Qualité - Analyse des risques a priori Rubrique de classement interne au service : v:/Biologie/Qualité/Documents Qualité	26/11/2010							
Laboratoire :	Hématologie		Analyse/méthode étudiée : NFS - chaine Sysmex							
Date de mise à jour :	98/09/2014		Participants : Valérie Le Page, Stéphanie Rocuet, Pascal Verdier, Soraya Wuilleme, Elodie Ducloux, Florent Kraske, Marine Branger							
ETAPE 1 : Réception / prétraitement des échantillons										
5M	Mode de défaillance	Effet	Cause	Détection	Moyen de maîtrise existant	F*	G*	D*	R	Action corrective ou préventive proposée
<p>Analyse de risque préanalytique détaillée dans le document "Analyse de risques L2R" (laboratoire de réponse rapide) partie Préanalytique (contrôle à réception - enregistrement - Etiquetage - Traitement pré-analytique des échantillons (RSA sans centrifugation; pas de passage RSA pour la filière "urgent")). Les recommandations pour le prélèvement (nature du tube, délai, préconisations) sont détaillées dans le manuel de prélèvement en ligne du laboratoire. En cas de prélèvement non conforme, celui ci est géré selon le mode opératoire du laboratoire "gestion des non-conformités au CRTE" (9293-MO-100) et le mode opératoire "saisie d'une non conformité majeure en hématologie" (9240-MO-001).</p> <p style="color: red; font-weight: bold;">Cas de la nuit ?</p>										
Matériel	Etiquette Dxlab mal collée	Perte étiquette: pas de lecture code barre, Analyses non réalisées Problème de préhension du tube: perte du tube, endommagement de l'aiguille.	Colle défectueuse / Mauvais étiquetage	Contrôle visuel	Vérification systématique sur chaque tube	5	5	2	50	Formation personnel CRTE
Matières	Quantité insuffisante (< 1 ml)	Pas d'analyse possible / résultat erroné	prélèvement insuffisant	Contrôle visuel	Vérification systématique de la quantité pour chaque tube. Si quantité insuffisante: passage en manuel (bouchon ouvert sur le XN)	7	5	2	70	
Matières	Présence de microcaillot dans les tubes pédiatrique	Résultats erronés / bouchage aiguille	diverses : prélèvement difficile...	Contrôle visuel	Vérification systématique de l'absence de microcaillot avant analyse pour les micro tubes.	7	10	2	140	
Main-d'œuvre	Homogénéisation incomplète	rendu de résultat erroné.	Absence d'agitation manuelle des rack de tubes en mode auto et d'agitation manuelle du tube environ 10 fois avant passage manuel.	Possible à la validation technique/biologique ?	Formation/habilitation technicien	2	5	2		A préciser dans le MO
Main-d'œuvre	Acceptation d'ajout d'analyse sur échantillon périmé (>24h)	Absence de résultat / résultat erroné	Pas de vérification de la date et heure de prélèvement	Contrôle visuel	Consultation du bon de demande pour connaître l'heure de prélèvement (refus d'analyse si délai dépassé)	2	7	2	28	
Main-d'œuvre	Analyse spécialisée non réalisée (ex MOL)	Absence de résultat	Erreur lors de l'enregistrement de l'échantillon (CRTE) Ex: MOL nécessite une formule	Contrôle visuel/appe du service pour résultats	Formation / habilitation CRTE	7	5	5	175	Formation personnel CRTE Rajout d'une règle d'expertise: rajout test FORMULE quand COMOL2 développé.

ETAPE 2 : Analyse des échantillons sur automate (chaines XN, XE, XS)										
5M	Mode de défaillance	Effet	Cause	Détection	Moyen de maîtrise existant	F*	G*	D*	R	Action corrective ou préventive proposée
Matériel (automate)	Absence de maintenance	Encrassement des automates / pannes	Maintenance oubliée / reportée	Suivi des maintenances sur MPL	Suivi des maintenances sur MPL Opérations de maintenance (quotidienne, hebdomadaire, mensuelle) décrites dans les modes opératoires	2	5	2	20	
Matériel (automate)	Dérive de l'automate	Absence de résultat, résultat erroné	divers (absence maintenance, vieillissement)	CIQ	Passage des CQI à fréquence définie quotidiennement : - 9240-DI-042 (XS, XE) - 9240-MO-243 (XN) Passage de CQI avant et après maintenance	5	5	2	50	
Matériel (informatique)	Problème transmission des résultats de l'automate vers le middleware	Résultat erroné / tronqué	Problème informatique	Contrôle visuel	Vérification des connexions à l'installation	2	7	5	70	Vérification des connexions informatiques (période?)
Matériel (informatique)	Indisponibilité d'un ou plusieurs postes MPL	Absence de réalisation des analyses/ pas de transmission de résultats	Problème informatique (ex: disque dur)	Visuel	Installation d'un poste de secours (7180-MO-035)	5	2	2	20	
Matériel (informatique)	Connexion / MPL/ SIL (Dxlab)	Absence de réalisation des analyses/ pas de transmission de résultats dans Dxlab	Intervention technique	Visuel	Procédure dégradée informatique (enregistrement sur le middleware)(7180-PR-031)	5	2	2	20	
Milieu	Conditions environnementales du fonctionnement de l'automate non respectées: Température (15°C-30°C)	Dysfonctionnement de la chaîne	conditions environnementales	Visuel	Automate dans salle climatisée	2	2	2	8	
Milieu	Conditions environnementales du fonctionnement de l'automate non respectées: Electricité	Dysfonctionnement de la chaîne	Panne électrique	Visuel	Automate sur réseau ondulé	2	2	2	8	
Matières (tube EDTA)	Présence caillot / Prélèvement hémorragique / lactescent	Résultat erroné	Prise d'essai inadaptée/ Interférence analytique	Vigilance à la vérification analytique (antériorité/ résultat abbérants/ CCMH)	Formation - habilitation MO pour recherche d'un caillot (9240-MO-154) MO pour substitution du plasma en cas d'échantillon lactescent/hémorragique (9240-MO-153)	7	10	2	140	
Matières (réactif)	Utilisation de réactifs périmés, mal conservés	Altération de la qualité du réactif et de la qualité de l'analyse	Mauvaise gestion des réactifs	CIQ	Gestion des stocks de réactifs par Gesstock Traçabilité des lots et des péremptions gérés par l'automate (code-barre)	2	5	2	20	
Matières (réactif)	Rupture de stock des réactifs	Absence d'analyse	Pas de gestion de stock	visuel	Gestion des stocks de réactifs par Gesstock Suivi des consommations de réactifs par l'automate (9240-MO-248 (XN); 9240-MO-077 (XE); 9240-MO-079 (XS)) Dépannage par laboratoire voisin si besoin	5	5	2	50	

Méthode	Non maitrise de la gestion des CIQ	Risque de rendre des résultats erronés	Oubli de passage du CIQ Démarrage ou poursuite de la production avec un CIQ non conforme	Alerte sur IPU / MPL	Formation - habilitation Passage des CQI sur XE, XS et XN détaillés dans les MO (9240-MO-230; MO-081 et MO-243)	5	7	2	70	Formalisation de la conduite à tenir en cas de CQI non conforme
Méthode	Règles d'expertises modifiées (repasse, rajout d'analyse) (Repasse: Hb < 8 g/dl, Pq < 20 G/L, CCMH haute, GB bas)	Résultats erronés ? Résultats incomplets	Absence de validation initiale des règles d'expertise	Possible à la validation technique/biologique	Validation des règles et vérification	2	7	5	70	
Méthode	Règles d'expertises non validées (repasse, rajout d'analyse)	Résultats erronés ? Résultats incomplets	Absence de validation initiale des règles d'expertise	Possible à la validation technique/biologique	Modification possible des règles uniquement par les administrateurs	2	7	5	70	
Main-d'œuvre	Défaillance dans le processus d'habilitation	Erreur lors de la réalisation des étapes analytiques: retard, absence d'analyse	Formation incomplète, problème organisationnel	visuel	Formation et habilitation du personnel pour l'utilisation des automates suivies et validées : - 9240-IM-121 (XN) - 9240-IM-128 (XE/XS) Mode opératoires d'utilisation des chaînes Sysmex disponibles	2	10	2	40	
Main-d'œuvre	Vérification analytique inappropriée	Rendu résultat non conforme	Erreur humaine	Vérification formule manuel Validation biologique	Formation - habilitation Procédures de validation des lignées erythrocytaires (9240-PR-027 et 014), leucocytaires (9240-PR-030 et 013) et plaquettaires (9240-PR-031 et 015)	2	10	2	40	

Pour chaque défaillance on évalue la fréquence (F), la gravité (G) et la détection (D), en tenant compte des moyens de prévention déjà en place. Une échelle est proposée avec la matrice de l'analyse de risque. L'échelle de cotation va de 1 à 10, avec 4 cotations possibles :

F = Fréquence

- 2 Occurrence ou risque d'exposition faible
- 5 Occurrence ou risque d'exposition moyen
- 7 Occurrence ou risque d'exposition fréquent
- 10 Occurrence ou risque d'exposition permanent

G = Gravité (l'intitulé peut être modulé en fonction de l'analyse étudiée)

- 2 Pas d'impact sur l'analyse
- 5 Perte de temps, perte de réactif
- 7 Impact empêchant de rendre le résultat
- 10 Risque de résultat erroné

D = Détection

- 2 Détection facile, l'opérateur pourra corriger
- 5 Détection possible, mais risque que l'opérateur ne la voit pas
- 7 Détection difficile
- 10 Pas de détection possible

$R \text{ (risque)} = F * G * D$

Annexe VI :

Intervalles de référence des paramètres de la numération formule en fonction de l'âge :

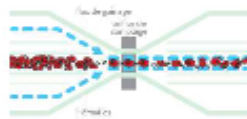
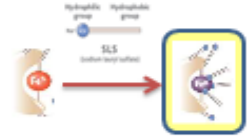

Categories d'âge	GR	Ht	Hb	VGM	TCMH	CCMH	IDR	Plaquettes	VPM	EB
	T/L	%	g/dL	fL	pg	g/dL	%	G/L	fL	G/L
Nouveau-né	3,91-6,43	43,4-67,5	14,1-21,6	96,5-114	32-39	31,5-36,5	15-18	150-400	8,7-11,6	0-1
2 j	3,81-6,1	40,6-64,1	13,8-22,1	95-116						0-0,2
3-7 j	3,78-6,17	39,2-62,7	13,5-21,9	92-112	9-12,1					
8-14 j	3,7-5,67	35,7-58,5	12,3-19,9	88,5-110		30-37,5				
15 j à 1 mois	3,11-5,16	30,2-49,4	10,8-17,2	88,5-108		28-36,5				
2 mois	3,09-4,35	27,3-41,2	9,7-13,5	80,5-101		27-33,5				
3 à 6 mois	3,22-4,8	27,2-41,4	9,7-13,1	75-92	25,5-29,5	31,5-36	12-14,5		8,5-11,4	0
7 mois à 2 ans	4,04-5,3	30,6-42,2	10,3-13,7	71-83	23,5-28				8,4-10,7	
3 à 6 ans	4,12-5,31	32,5-42,6	11,1-13,9	72,5-85	24-29		8,8-11,8			
7 à 12 ans	4,12-5,31	33,2-42,2	11,3-14,4	75-88	25-29,5					
13 à 16 ans	4,14-5,53	34,7-46,2	11,8-16	77,5-92,5	26,5-31	32-36	12-14,5	7,4-11,7		
Adulte femme	4,1-5,1	36-47	12,0-16,0	80-98	26-32					
Adulte homme	4,5-5,9	40-52	13,5-17,5	80-98	26-32					

Valeur par âge	RETICULOCYTES (G/l)										
	J0 à J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8 à J14	J15 à 12 ans	13 à 16 ans	Adulte
	160-300	180-325	170-323	125-280	90-235	65-200	50-180	20-100	25-65	25-100	25-100

CATEGORIES D'AGE	LEUCOCYTES	POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES	POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES	POLYNUCLEAIRES BASOPHILES	LYMPHOCYTES	MONOCYTES
	G/L	G/L	G/L	G/L	G/L	G/L
Nouveau-né	9,1-30	5-26	< 0,8	< 0,2	2-6,7	0,4-3
1 j	11,2-27	4-19			2-6,6	
2 j	7,9-22,5	3-16			2-6,8	
3 j	6,2-17,1	3-11			2-6,4	
4 à 7 j	6,3-17,4	1,5-9,5			2-8	
8 à 14 j	7,3-16,6	1-9,3			3-9,4	
15 j à 1 mois	7,1-15,9	1-4,9			3,5-10,2	0,3-1,5
2 mois	6,4-12,5	1-4,7			3,7-10,5	
3 à 6 mois	7,5-15,7	1-6,6			3,8-11,1	
7 mois à 2 ans	6,4-16,4	1,5-7,2			2,6-10,9	
3 à 6 ans	5-13,6	1,5-9			1,8-7,3	0,3-1
7 à 12 ans	4,9-12	1,5-7,7			1,7-5,1	
13 à 16 ans	4,5-10	1,5-7,6			1,3-4,3	
Adulte	4-10	1,7-7,5	0,04-0,5	0-0,06	1,5-4	0,15-0,9

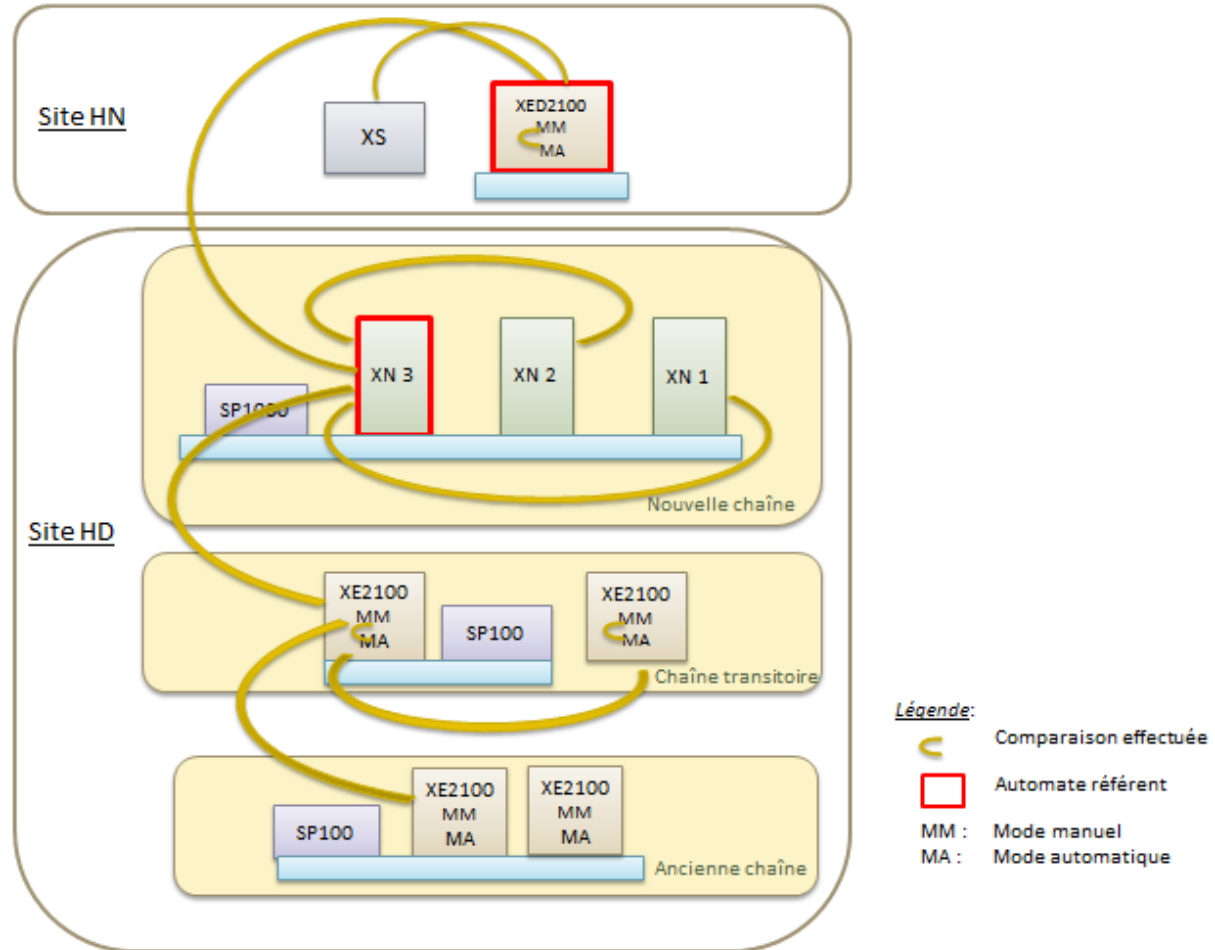
Annexe VII

Description de la méthode pour la mesure des hématies, de l'hémoglobine et des leucocytes

Analyte / Mesurande :	Globules rouges	Hémoglobine	Globules blancs
Principe de la mesure :	Impédance	Spectrophotométrie	Cytométrie en flux
Méthode de mesure :	<p>Le passage de cellules en suspension dans un liquide conducteur (principe de focalisation hydrodynamique à volume fixe calibré) à travers un orifice modifie la résistance électrique entre deux électrodes. Cette variation d'impédance est enregistrée sous forme d'impulsions. Quand une cellule coupe le champ électrique cela entraîne:</p> <ul style="list-style-type: none"> une diminution de la conductivité l'augmentation de la résistance électrique <p>Le nombre d'impulsions enregistré correspond au passage des cellules. La hauteur des impulsions est proportionnelle au volume de la cellule détectée d'où l'identification.</p> 	<p>Méthode du Lauryle Sulfate de Sodium (SLS). Le SLS détruit les membranes des globules rouges et libère l'hémoglobine. Le réactif SLS se combine alors avec l'hémoglobine pour former un hémichrome stable. La concentration en hémoglobine est ensuite quantifiée par colorimétrie en utilisant un photomètre à filtre.</p> 	<p>ANALYSE CELLULAIRE TRIDIMENSIONNELLE:</p> <ul style="list-style-type: none"> fluorescence (SFL): information selon le contenu en ADN/ARN de la cellule. petit angle (FSC): information sur la taille de la cellule. grand angle (SSC): information sur la structure de la cellule <p>Le Lysercell WNR lyse les GR, PLT et le cytoplasme des GB (excepté les basophiles qui restent intacts). Le Fluorocell WNR marque les acides nucléiques des GB et des NRBC.</p> 
Type d'échantillon primaire :	Sang total	Sang total	Sang total
Type de récipient, Additifs :	EDTA	EDTA	EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	Agitation des tubes par retournement	Agitation des tubes par retournement	Agitation des tubes par retournement
Unités :	Ters/L	g/dl	G/L
Intervalle de référence :	Document: 3240 - DI - 136 "Intervalles de référence de la numération globulaire et plaquettaire en fonction de l'âge"	Document: 3240 - DI - 136 "Intervalles de référence de la numération globulaire et plaquettaire en fonction de l'âge"	Document: 3240 - DI - 136 "Intervalles de référence de la numération globulaire et plaquettaire en fonction de l'âge"
Codage C.N.G. :			
Instrument :	Module XN10 sur chaîne XN-3000 de SYSMEX(n°serie: 13622/ 13621/ 13620)	Module XN10 sur chaîne XN-3000 de SYSMEX(n°serie: 13622/ 13621/ 13620)	Module XN10 sur chaîne XN-3000 de SYSMEX(n°serie: 13622/ 13621/ 13620)
Référence du réactif :	Cellpack	Sulfolyser	Fluorocell WNR et Lysercell WNR
Matériau d'étalonnage / Raccordement métrologique :	NA	sucun	NA
Type d'étalonnage :	NA	sucun	NA

Annexe VIII

Schéma des comparaisons de méthode effectuées

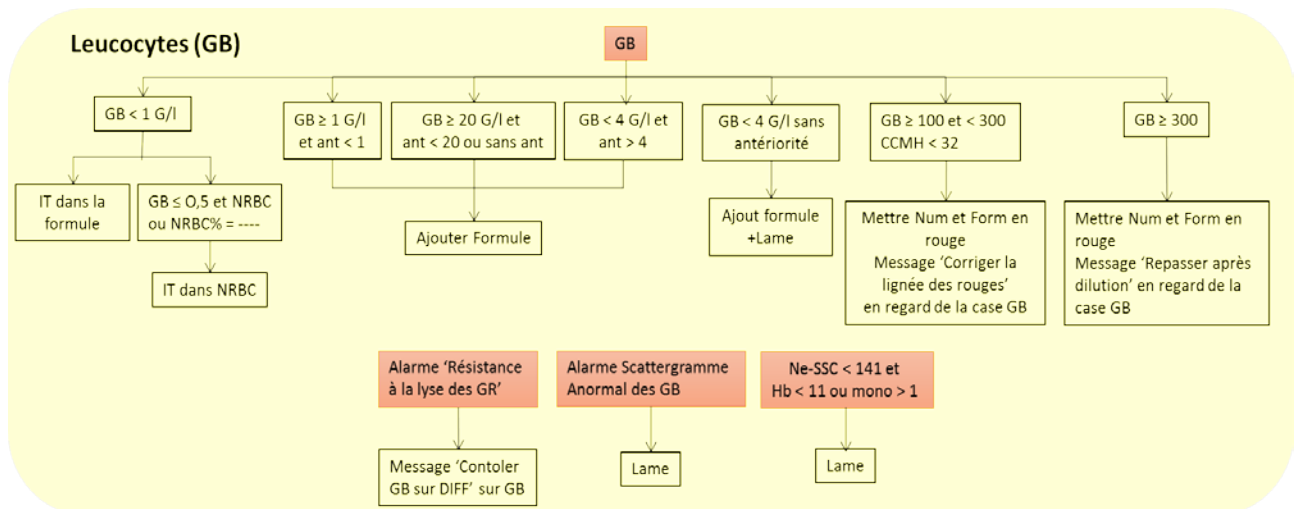
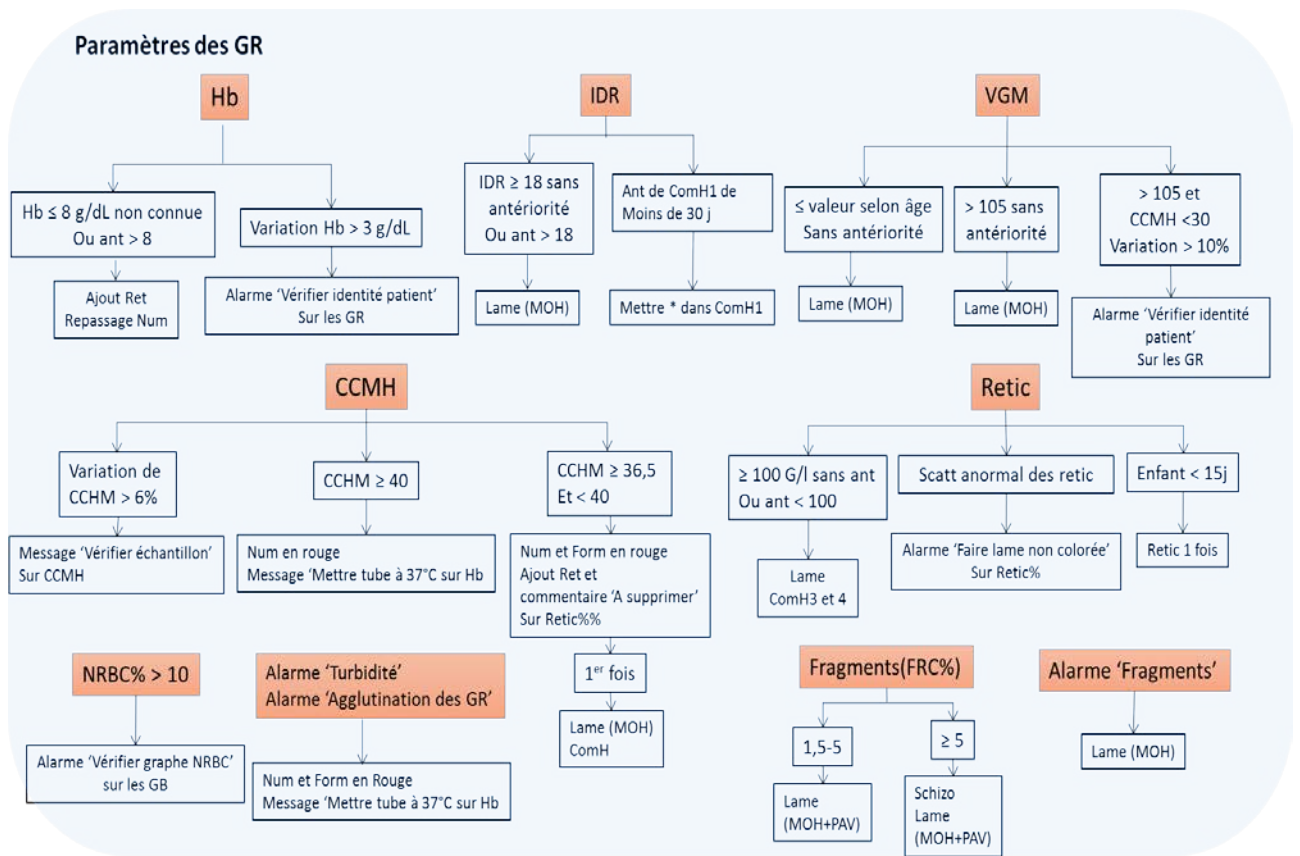


Annexe IX

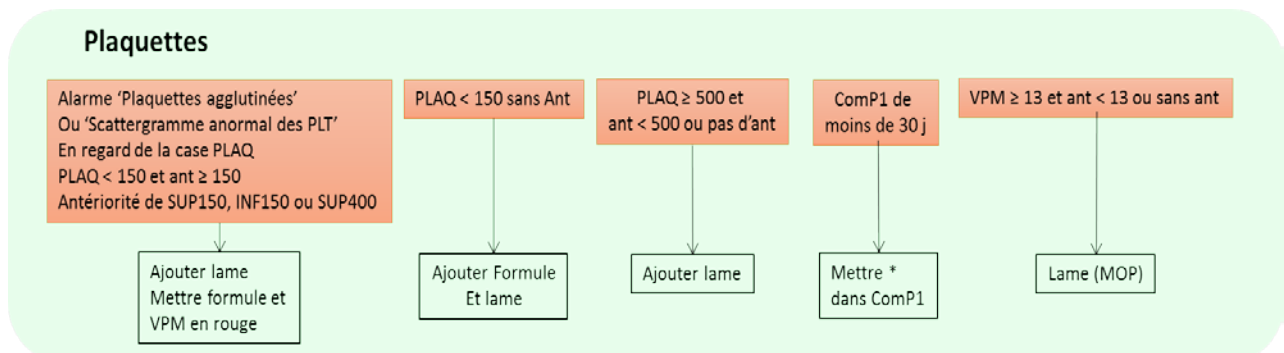
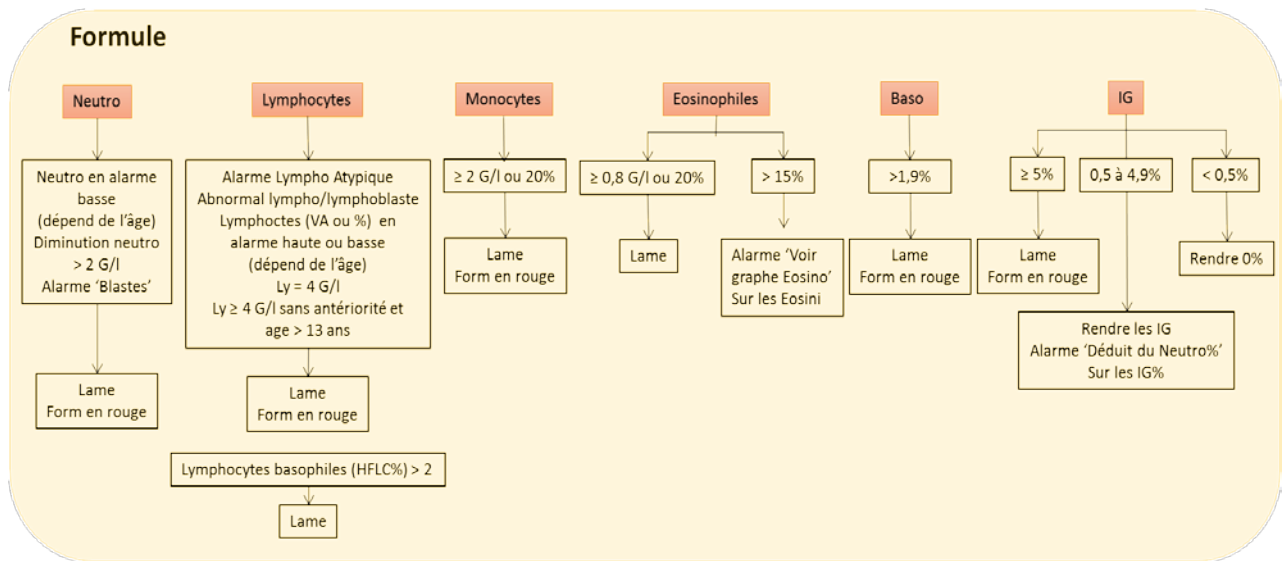
Vérification des paramètres calculés

Paramètre	Calcul	XN1/dossier 141702117 (EEQ-14HDF03)			XN2/dossier 141702120 (EEQ-14HDF03)			XN3/dossier 141702123 (EEQ-14HDF03)		
		Valeur automate	Valeur calculée	Conforme Oui/Non	Valeur automate	Valeur calculée	Conforme Oui/Non	Valeur automate	Valeur calculée	Conforme Oui/Non
VGM (fl)	Ht(%)*10/GR(T/L)	94,4	36,8*10/3,90 = 94,4	O	93,4	37,0*10/3,96 = 93,4	O	93,9	36,8*10/3,92 = 93,9	O
CCMH (g/dl)	Hb(g/dl)*100/Ht(%)	32,3	11,9*100/36,8 = 32,3	O	31,9	11,8*100/37,0 = 31,9	O	33,2	12,2*100/36,8 = 33,2	O
TCMH (pg)	Hb(g/dl)*10/GR(T/L)	30,5	11,9*10/3,90 = 30,5	O	29,8	11,8*10/3,96 = 29,8	O	31,1	12,2*10/3,92 = 31,1	O
VPM (fl)	PCT % *10000/ PLT (G/L)	11	0,26*10000/238 = 10,9	N	10,8	0,26*10000/255 = 10,2	N	11,1	0,27*10000/261 = 10,3	N
PN (%)	PN(G/L)*100/GB(G/L)	60,4	2,80*100/4,64 = 60,4	O	62	2,75*100/4,44 = 62	O	61,3	2,83*100/4,62 = 61,3	O
Ly (%)	Ly(G/L)*100/GB(G/L)	23,7	1,1*100/4,64 = 23,7	O	22,3	0,99*100/4,44 = 22,3	O	22,5	1,04*100/4,62 = 22,5	O
Mono (%)	Mono(G/L)*100/GB (G/L)	10,8	0,5*100/4,64 = 10,8	O	11	0,49*100/4,44 = 11,0	O	11,5	0,53*100/4,62 = 11,5	O
PNEo (%)	PNEo(%)*100/GB(G/L)	4,5	0,21*100/4,64 = 4,5	O	3,8	0,17*100/4,44 = 3,8	O	4,1	0,19*100/4,62 = 4,1	O
PNBa (%)	PNBa(%)*100/GB(G/L)	0,6	0,03*100/4,64 = 0,6	O	0,9	0,04*100/4,44 = 0,9	O	0,6	0,03*100/4,62 = 0,6	O
IG (%)	IG(%)*100/GB(G/L)	0,2	0,01*100/4,64 = 0,2	O	0,2	0,01*100/4,44 = 0,2	O	0,2	0,01*100/4,62 = 0,2	O
Ret (G/L)	Ret%o *GR*10 ³ /1000	NA	NA	NA	0,063	15,9*3,96/1000 = 0,063	O	0,0627	16,0*3,92/1000 0,0627	O
EB (%)	EB(G/L)*100/RBC(T/L)	0,4	0,02*100/3,90 = 0,5	N	0,2	0,01*100/3,96 = 0,2	O	0,4	0,02*100/3,92 = 0,5	N

Annexe X : Règles d'expertises :



Règles d'expertises (suites)



Annexe XI


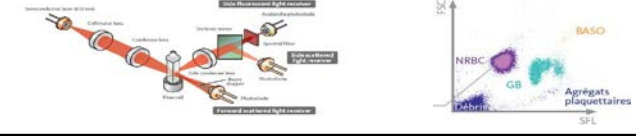
Exemple de vérification d'une règle d'expertise portant sur les polynucléaires éosinophiles :

Condition	Action	Test en production (depuis 12/03/2014)			Test en production (après modif 07/04/2014: changement version de middleware)			Date modification	Texte justificatif	Référence justificative
		Testé le	N° dossier	Validé	Testé le	N° dossier	Validé			
Eosino ≥ 0,8 ou Eosino% ≥ 20	Ajouter lame	12/03/2014	140710676	OK	07/04/2014	140970162	OK		Seuil plus strict que GFHC	GFHC > 1,5 G/L

The screenshot shows the MPL Evo 1.15 interface with a patient's test results on the left and a list of applied rules on the right. The patient ID '230140710676' is circled in blue. The test results table shows various parameters including Hemoglobin (Hb), Hematocrit (Hct), Hematocrit (h), and various leukocyte counts. The list of applied rules on the right includes several conditions, with one rule circled in red: 'Eosino >= 0.8 et ou eosino% >= 20: faire une lame'. This rule is associated with the action 'Ajouter lame'.

Dans cet exemple, lors du premier passage l'automate a rendu 6.5 % de PNEo soit 0.95 G/L donc > 0.8 G/L ce qui doit déclencher la création d'une lame pour vérification au microscope.

Annexe XII : Rapport de validation provisoire des globules blancs :

		IMPRIME			Diffusion par :	
		Rapport de validation de méthode quantitative				
Processus : Analytique		Date d'application :		août-13		
Entité :		Hématologie		Référence :		
Unité :		9102				
1- METHODE EVALUEE						
Indice de version :		Date :		Motifs de la création / modification:		
V1				Validation initiale		
Analyte / Mesurande :		Globules blancs				
Principe de la mesure :		Cytométrie en flux				
Méthode de mesure :		<p>ANALYSE CELLULAIRE TRIDIMENSIONNELLE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • fluorescence (SFL): information selon le contenu en ADN/ARN de la cellule. • petit angle (FSC) : information sur la taille de la cellule. • grand angle (SSC): information sur la structure de la cellule. <p>Le Lysercell WNR lyse les GR, PLT et le cytoplasme des GB (excepté les basophiles qui restent intacts). Le Fluorocell WNR marque les acides nucléiques des GB et des NRBC.</p> 				
Type d'échantillon primaire :		Sang total				
Type de récipient, Additifs :		EDTA				
Prétraitement de l'échantillon :		Agitation des tubes par retournement				
Unités :		G/L				
Intervalles de référence :		Document: 9240 - DI - 136 "Intervalles de référence de la numération globulaire et plaquettaire en fonction de l'âge"				
Codage C.N.Q. :		/				
Instrument :		Module XN10 sur chaîne XN-9000 de SYSMEX(n°serie: 13622/ 13621/ 13620)				
Référence du réactif :		Fluorocell WNR et Lysercell WNR				
Matériau d'étalonnage / Raccordement métrologique		NA				
Type d'étalonnage :		NA				
2- MISE EN OEUVRE						
Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification / validation :		Elodie DUCLOUX; Stéphanie ROUET; BRANGER Marine				
Procédure de validation		Méthode adoptée : 7180-PR-022				
Procédure de gestion de la portée flexible		7180-PR-026				
Période d'évaluation :		du :	24/02/2014	au:	07/03/2014	Pour évaluation initiale (répéta-comparaison de méthode)
		du :	24/03/2014	au:	08/04/2014	Reproductibilité
Date de mise en service :		12/03/2014				
3- MAITRISE DES RISQUES						
<input checked="" type="checkbox"/>		Etude AMDEC (cf. 7180-IM-033)				
<input type="checkbox"/>		Etude simplifiée (cf. ci-dessous)				

4- EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE XN 3 (13622)

	Echantillons	Nombre (N)	Moyenne G/L	Ecart-type G/L	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	CQI level 1 lot 4041	30	3,00	0,05	1,64	NA	6,41	Conforme
Niveau 2	CQI level 2 lot 4041	30	6,88	0,08	1,15	3,06	6,41	Conforme
Niveau 3	CQI level 3 lot 4041	30	16,35	0,14	0,83	3,06	6,41	Conforme

Conclusions :

Les données de répétabilité sont conformes aux limites acceptables (fournisseur+ RICOS).

REPETABILITE XN 2 (13621)

	Echantillons	Nombre (N)	Moyenne G/L	Ecart-type G/L	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	CQI level 1 lot 4041	30	2,99	0,05	1,63	NA	6,41	Conforme
Niveau 2	CQI level 2 lot 4041	30	6,87	0,08	1,14	3,06	6,41	Conforme
Niveau 3	CQI level 3 lot 4041	30	16,19	0,13	0,78	3,06	6,41	Conforme

Conclusions :

Les données de répétabilité sont conformes aux limites acceptables (fournisseur+ RICOS).

REPETABILITE XN 1 (13620)

	Echantillons	Nombre (N)	Moyenne G/L	Ecart-type G/L	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	CQI level 1 lot 4041	30	3,01	0,06	1,93	NA	6,41	Conforme
Niveau 2	CQI level 2 lot 4041	30	6,85	0,13	1,84	3,06	6,41	Conforme
Niveau 3	CQI level 3 lot 4041	30	16,27	0,16	0,97	3,06	6,41	Conforme

Conclusions :

Les données de répétabilité sont conformes aux limites acceptables (fournisseur+ RICOS).

FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE 13622 (XN3)

	Echantillons	Nombre (N)	Moyenne G/L	Ecart-type G/L	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	CQI level 1 lot 4041	30	3,03	0,05	1,7	3,99 (Si >4G/L)	8,55	Conforme
Niveau 2	CQI level 2 lot 4041	30	6,84	0,11	1,6	3,99	8,55	Conforme
Niveau 3	CQI level 3 lot 4041	30	16,36	0,18	1,1	3,99	8,55	Conforme

Conclusions :

Les données de reproductibilité sont conformes aux limites acceptables (fournisseur + RICOS).

FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE 13621 (XN2)

	Echantillons	Nombre (N)	Moyenne G/L	Ecart-type G/L	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	CQI level 1 lot 4041	30	3,01	0,05	1,6	3,99 (Si >4G/L)	8,55	Conforme
Niveau 2	CQI level 2 lot 4041	30	6,80	0,08	1,2	3,99	8,55	Conforme
Niveau 3	CQI level 3 lot 4041	30	16,19	0,19	1,2	3,99	8,55	Conforme

Conclusions :

Les données de reproductibilité sont conformes aux limites acceptables (fournisseur + RICOS).

FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE 13620 (XN1)

	Echantillons	Nombre (N)	Moyenne G/L	Ecart-type G/L	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	CQI level 1 lot 4041	30	3,05	0,06	2,0	3,99 (Si >4G/L)	8,55	Conforme
Niveau 2	CQI level 2 lot 4041	30	6,84	0,11	1,6	3,99	8,55	Conforme
Niveau 3	CQI level 3 lot 4041	30	16,31	0,20	1,2	3,99	8,55	Conforme

Conclusions :

Les données de reproductibilité sont conformes aux limites acceptables (fournisseur + RICOS).

EXACTITUDE XN3 (13622)										
Cas des contrôles externes ponctuels										
	Nombre groupe de pairs/ toutes techniques	Valeur Labo	Moyenne (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Z-score (groupe de pairs)	Z-score (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Conclu sion
Echantillon CQE n°14HD01	74/1013	24,9	24,58	24,62	0,4	0,3	1,30	1,14	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD02	72/1011	2,1	2,05	2,07	0,7	0,2	2,44	1,45	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD03	74/994	3,14	3,10	3,18	0,5	-0,2	1,29	-1,26	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD04	74/994	9,15	9,11	9,33	-0,4	0,1	0,44	-1,93	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HDF3	42/361	4,62	4,54	4,43	0,6	0,9	1,76	4,29	7,3	Conforme
Conclusions :										
Biais conforme aux spécifications attendues (critère Ricos optimal retenu par l'organisme EEQ ProBioqual)										
EXACTITUDE XN2 (13621)										
Cas des contrôles externes ponctuels										
	Nombre groupe de pairs/ toutes techniques	Valeur Labo	Moyenne (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Z-score (groupe de pairs)	Z-score (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Conclu sion
Echantillon CQE n°14HD01	74/1013	23,97	24,58	24,62	-0,8	-0,8	-2,48	-2,64	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD02	72/1011	1,98	2,05	2,07	-0,8	-0,7	-3,41	-4,35	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD03	74/994	3,01	3,10	3,18	-1,1	-0,7	-2,90	-5,35	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD04	74/994	9,41	9,11	9,33	0,5	0,2	3,29	0,86	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HDF3	42/361	4,44	4,54	4,43	-0,7	0	-2,20	0,23	7,3	Conforme
Conclusions :										
Biais conforme aux spécifications attendues (critère Ricos optimal retenu par l'organisme EEQ ProBioqual)										
EXACTITUDE XN1 (13620)										
Cas des contrôles externes ponctuels										
	Nombre groupe de pairs/ toutes techniques	Valeur Labo	Moyenne (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Z-score (groupe de pairs)	Z-score (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Conclu sion
Echantillon CQE n°14HD01	74/1013	24,7	24,58	24,62	0,2	0,1	0,49	0,32	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD02	72/1011	2	2,05	2,07	-0,7	-0,6	-2,44	-3,38	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD03	74/994	3,06	3,10	3,18	-0,5	-0,5	-1,29	-3,77	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HD04	74/994	9,3	9,11	9,33	0,3	-0,1	2,09	-0,32	7,3	Conforme
Echantillon CQE n°14HDF3	42/361	4,64	4,54	4,43	0,7	1	2,20	4,74	7,3	Conforme
Conclusions :										
Biais conforme aux spécifications attendues (critère Ricos optimal retenu par l'organisme EEQ ProBioqual)										

<u>COMPARAISON DE METHODE XED2100 (F1848) vs XN3 (13622)</u>	
Données bibliographiques	Ricos C. Biological variation database specifications; Mode d'emploi XN9000/ XED2100 : Performances/Spécification. SH GTA 04 COFRAC
Méthode prise comme référence	XN 3 (13622)
Nombre de mesures :	39
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	1,11 - 26,13 G/L
Méthode d'exploitation des résultats :	Regression linéaire; diagramme des différences et diagramme des rapports
Equation de la droite de régression :	$y = 1,008x - 0,0661$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = 0
Conclusions et dispositions :	Aucune discordance significative détectée. Bonne corrélation entre les deux automates (comparaison intersite).
<u>COMPARAISON DE METHODE XN2 (13621) vs XN3 (13622)</u>	
Données bibliographiques	Ricos C. Biological variation database specifications; Mode d'emploi XN9000 : Performances/Spécification. SH GTA 04 COFRAC
Méthode prise comme référence	XN 3 (13622)
Nombre de mesures :	39
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	1,11 - 26,13 G/L
Méthode d'exploitation des résultats :	Regression linéaire; diagramme des différences et diagramme des rapports
Equation de la droite de régression :	$y = 1,0014x + 0,0321$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = 0
Conclusions et dispositions :	Aucune discordance significative détectée. Bonne corrélation entre les deux automates
<u>COMPARAISON DE METHODE XN1 (13620) vs XN3 (13622)</u>	
Données bibliographiques	Ricos C. Biological variation database specifications; Mode d'emploi XN9000 : Performances/Spécification. SH GTA 04 COFRAC
Méthode prise comme référence	XN 3 (13622)
Nombre de mesures :	39
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	1,11 - 26,13 G/L
Méthode d'exploitation des résultats :	Regression linéaire; diagramme des différences et diagramme des rapports
Equation de la droite de régression :	$y = 0,9976x - 0,0054$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = 0
Conclusions et dispositions :	Aucune discordance significative détectée. Bonne corrélation entre les deux automates
<u>COMPARAISON DE METHODE XE2100 vs XN3 (13622)</u>	
Données bibliographiques	Ricos C. Biological variation database specifications; Mode d'emploi XN9000 : Performances/Spécification. SH GTA 04 COFRAC
Méthode prise comme référence	XN 3 (13622)
Nombre de mesures :	39
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	1,11 - 26,13 G/L
Méthode d'exploitation des résultats :	Regression linéaire; diagramme des différences et diagramme des rapports
Equation de la droite de régression :	$y = 1,0093x + 0,0082$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = 0
Conclusions et dispositions :	Aucune discordance significative détectée. Bonne corrélation entre l'automate précédent et l'automate actuel

INTERVALLE DE MESURE <i>Indispensable en portée B</i>		
Mode de détermination :	Données fournisseurs: mode d'emploi XN9000 : Performances/Spécification Limite de quantification: mesure de 10 répliqués, CV < 10 %	
Limite de détection :		
Limite de quantification :	0,2 G/L ou moins	
Limite supérieure de linéarité :	310 G/L	
INTERFERENCES		
Vérification bibliographique :	Données fournisseurs: mode d'emploi XN9000 : Performances/Spécification. Sous-estimation: Agrégation leucocytaires (coag) Sur-estimation: Agrégat PLT / cryoprotéine/ cryoglobuline/ Fibrine/ PLT géantes	
Vérification expérimentale :	Non réalisée	
CONTAMINATION <i>Indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A</i>		
Inter échantillon :	Oui, contamination critique d'un échantillon très faible s'il est précédé d'un échantillon très fort.	
Inter réactif :		Spécification fournisseur
Vérification bibliographique :	Donnée fournisseur: conta < ou =1,0%	
Vérification expérimentale :	Etape vérifiée sur site : Etape réalisée à partir de deux échantillons patients (71,20 G/L et 0,31 G/L) Les 2 échantillons ont été analysés dans la même série, répétés 3 fois et cela 3 fois de suite. XN1((13620) = 0,01% XN2 (13621) = 0,04 % XN3(16622) = 0%	
5- VALIDATION FINALE		
Commentaires éventuels :		
Les vérifications analytiques effectuées sur la chaîne Sysmex XN9000 montrent que la méthode est répétable, reproductible, exacte et que les résultats sont comparables avec ceux obtenus sur l'autre automate utilisé en routine. La méthode utilisée pour la détermination des leucocytes est apte à être utilisée en routine. La confirmation des performances de la méthode en routine est assurée par la surveillance des résultats des CIQ et des EEQ, et le calcul de l'incertitude de mesure.		
Validée par :	S. Wuilleme	Signature :
6- HISTORIQUE		
Version	Date	Historique des révisions
V01	07/03/2014	Création du document

Résumé :

Le laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes c'est doté d'une nouvelle chaîne analytique automatisée de numération formule sanguine : la chaîne XN9000 du fournisseur SYSMEX® comportant 3 analyseurs XN10. L'arrivée de nouveaux automates imposant des vérifications de méthode a participé à la décision du laboratoire de présenter à l'accréditation la numération formule sanguine pour la prochaine visite COFRAC. Etant en stage dans ce laboratoire pour le semestre : novembre 2013 - mai 2014, le choix de mon mémoire c'est naturellement orienter vers la vérification de méthode de ces nouveaux automates.

La première étape, a été de rédiger le plan d'action. Dans ce but, un formulaire du pôle de biologie du CHU de Nantes a été utilisé , permettant de répertorier pour chaque paramètre les critères de performances à vérifier, dans définir les modalités de mise en œuvre, ainsi que de choisir les critères d'acceptabilité. Le planning de réalisation et les responsabilités ont également été définis. L'équipe en charge de cette vérification de méthode était constituée d'une biologiste responsable, de deux techniciennes et de moi-même.

Dans un second temps la mise en œuvre a été réalisée durant sept jours dédiés, durant lesquels la répétabilité, les limites de quantification, les comparaisons de méthodes, et les tests de contamination ont pu être effectués. La fidélité intermédiaire a été déterminée des lors que le nombre de mesure de CIQ était suffisant. Avant la mise en route de la chaîne analytique les règles d'expertises ont également étaient vérifiées. Puis dès réception des premiers résultats d'EEQ, l'exactitude a pu être déterminée.

Rapidement après la mise en œuvre, l'exploitation des données a été réalisée grâce un logiciel fournit par le fournisseur. Ce qui a permis de compléter le rapport de vérification de méthode. Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont été jugé conforme aux critères d'acceptabilité définis au préalable, et la méthode considérée comme apte à être utilisé en routine.

La vérification de méthode est une exigence forte de la norme. Elle permet en effet d'acquérir une bonne connaissance des méthodes d'analyses utilisées, de ses performances et de ses limites, indispensable pour la bonne réalisation des analyses ainsi que pour leurs interprétations.