

Université Pierre et Marie Curie

Sorbonne Universités

MEMOIRE
POUR L'OBTENSION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MEDICALE »

**Formule sanguine au microscope
en portée flexible
ajoutée à la demande d'accréditation
actuelle du LABM BIOLABS**

Laurence Benattar

Année Universitaire 2015-2016

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.

Laurence Benattar

Docteur en Pharmacie – DES de Biologie médicale

En remplacement du Directeur du site Dupont des Loges au Laboratoire Biolabs – Paris
durant la réalisation de ce travail.

Remerciements

Je remercie les responsables du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale », Monsieur le Docteur Vaubourdolle et Monsieur le Docteur Pernet, de m'avoir permis de suivre leur enseignement au sein de la promotion 2015 - 2016.

Je remercie toute l'équipe des intervenants pour leur enseignement.

Je remercie aussi mes « voisins de classe » pour leur présence agréable et leur amitié.

Je remercie le Directeur du Laboratoire Biolabs pour m'avoir permis de réaliser ce travail ainsi que toute l'équipe du site Dupont des Loges pour leur participation, leur soutien, leur bonne humeur et leur bonne volonté.

Enfin, je remercie mon entourage pour son soutien tout au long de cette année.

Sommaire

<u>Introduction</u>	1
<u>1 Généralités</u>	
1.1 La formule sanguine au microscope.....	2
<i>Généralités sur l'hémogramme</i>	
<i>Généralités sur la formule sanguine au microscope</i>	
1.2 La qualité.....	4
<i>Généralités sur la qualité</i>	
<i>Généralités sur l'accréditation</i>	
<i>Généralités sur la portée flexible</i>	
1.3 Accréditation de la formule sanguine au microscope en portée flexible.....	6
1.4 Objectifs.....	7
1.5 Limites de l'étude.....	8
1.6 Annonce du plan.....	8
<u>2 La formule sanguine au microscope en portée flexible</u>	
2.1 Application des référentiels à la formule sanguine au microscope	9
2.1.1 Description du processus.....	9
2.1.2 Critères de revue microscopique du frottis sanguin.....	10
2.1.3 Maitrise des risques.....	11
2.1.4 Méthodologie.....	15
2.1.4.1 Logigramme et formulaire de portée flexible	15
2.1.4.2 Processus analytiques.....	15
2.1.4.3 Processus supports.....	16
2.1.5 Définition des critères de performance à valider.....	18
2.1.6 Choix des limites acceptables.....	19
2.2 Evaluation des performances de la méthode : vérification/validation de méthode.....	21
2.2.1 Analyse quantitative.....	21
2.2.2 Analyse qualitative.....	26
2.2.3 Analyse des résultats et interprétation.....	27
2.2.3.1 Analyse quantitative.....	27
2.2.3.2 Analyse qualitative.....	28
<u>3 Conclusion</u>	29
Annexes.....	31
Bibliographie	49

Annexes

1. Processus « cœur du métier »
2. Tableau récapitulatif des performances à évaluer
3. Organigramme Biolabs
4. Portée type par sous famille
5. Logigramme de révision de la formule sanguine au microscope
6. Fiche d'instruction décrivant les principes de réalisation d'un frottis sanguin
7. Logigramme de portée flexible
8. Procédure de gestion de la portée flexible
9. Fiche d'habilitation du personnel
10. Fiche d'évaluation du maintien des compétences du personnel
11. Fiche d'habilitation du Biologiste Remplaçant
12. Tableau récapitulatif des actions menées
13. Tables de Rümke
14. Représentation graphique de la comparaison de méthode

Glossaire

AFNOR : Association Française de Normalisation

A/NA : Applicable / Non applicable

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ARS : Agence Régionale de Santé

C/NC : Calculé / Non calculé

CIQ : Contrôles Internes de Qualité

CQN : Contrôle National de Qualité

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

ET : Ecart type

FI : Fidélité intermédiaire

FSM : Formule sanguine au microscope

GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses

GTA : Guide Technique d'Accréditation

HAS : Hautes Autorités de Santé

IDE : Infirmier Diplôme d'Etat

Ly : Lymphocytes

MGG : May-Grünwald Giemsa

Mo : Monocytes

NFS: Numération – Formule sanguine

Plq : plaquettes

PN.N : Polynucléaires Neutrophiles

PN.Eo: Polynucléaires Eosinophiles

PN.Ba : Polynucléaires Basophiles

SIL : Système d'Information des Laboratoires

SMQ : Système de Management de la Qualité

Introduction

Le présent mémoire a pour objectif de décrire les différentes étapes mises en œuvre au Laboratoire Biolabs pour ajouter à leur accréditation actuelle la « formule sanguine au microscope » en portée flexible.

L'examen microscopique de frottis sanguins reste un examen incontournable pour tout Laboratoire, quel que soit son type d'activité et le type d'automate utilisé pour l'hémogramme.

La norme NF ISO 15189 rend obligatoire l'accréditation des Laboratoires depuis l'ordonnance du 13 Janvier 2010. Le COFRAC, seul organisme d'accréditation en France, édite des documents dédiés à l'accréditation des Laboratoires. Les référentiels du COFRAC, révisés régulièrement, fournissent notamment, des guides techniques et des exemples de validation/vérification de méthode que j'ai utilisés pour ce travail.

Le SH GTA 04 décrit l'examen microscopique du frottis sanguin comme le sous processus 2 d'un processus complexe, l'hémogramme, dans le domaine Biologie médicale, le sous-domaine Hématologie, la sous-famille Hématocytologie. La dénomination précise de la méthode est, selon le SH INF 50, « l'identification morphologique et/ou numération relative des sous-populations leucocytaires après coloration, par microscopie optique »

Dans la ligne de portée Hématologie, le sous processus 1, l'hémogramme sur automate (ici, Pentra XLR - Horiba), faisant partie des examens soumis à l'accréditation lors de la visite initiale du COFRAC (Janvier 2016) et ayant reçu la confiance du COFRAC (Mars 2016), il s'agit donc d'une portée flexible, d'une méthode déjà utilisée au laboratoire depuis plus de 10 ans, d'une vérification de méthode d'une méthode adoptée, donc d'une portée A, et, selon le SH GTA 04, d'une méthode à la fois quantitative et qualitative.

L'examen microscopique de frottis sanguins fait appel à des critères de reconnaissance cellulaire et de quantification de certains d'entre eux, dans des conditions d'observation (étalement et coloration des frottis) qui doivent être optimales. Ainsi, d'un point de vue purement « théorique », aborder le sujet de la cytologie, tant sur un plan qualitatif que quantitatif, est justifié. D'un point de vue « pratique », le SH GTA 04 distingue clairement les critères de performance à vérifier pour les méthodes qualitatives et quantitatives. Pourtant, nous allons voir que cette distinction est moins simple qu'il n'y paraît.

Nous allons donc voir comment aborder cette problématique en utilisant les référentiels actuels du COFRAC, principalement le SH FORM 43 selon une approche processus. Nous commenterons les résultats obtenus et discuterons des méthodes utilisées pour les obtenir.

1. Généralités

1.1 La formule sanguine au microscope

Généralités sur l'hémogramme :

La première observation du sang au microscope a probablement été réalisée par Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) grâce à ses lentilles microscopiques pour les hématies (1), et Marcello Malpighi (1628-1694) pour le pus (2), dès le 17^{ième} siècle. Avec un microscope rudimentaire, Hooke, un savant anglais, est le premier à découvrir la cellule, en 1665 puis le britannique William Hewson (1739-1774) décrira les globules blancs et principalement ceux du système lymphatique (3).

En 1900, Georges Hayem (1841-1935) écrivit à propos de la leucémie : « Le diagnostic dans des cas de ce genre ne présente réellement aucune difficulté et, cependant, l'examen du sang est si communément dédaigné que les médecins ne le font pas toujours ». L'examen était effectivement très simple et sans danger pour le patient, puisqu'il se faisait alors à partir d'une goutte de sang recueillie par piqûre au bout du doigt et déposée entre lame et lamelle (4).

Vers 1910, fut décrit un nouveau type de globule blanc, le monocyte, distinct des lymphocytes et des granulocytes. Dès 1913, C.Champy publie les premiers dessins représentant les cellules du sang, montrant nettement les degrés d'acidophilie et de basophilie attendus pour chaque type cellulaire (5).

En France, l'institutionnalisation de l'Hématologie commença vers 1920 avec la généralisation de la pratique des examens de sang dans les laboratoires des hôpitaux. Prosper-Emile Weil (1873-1963), Noël Fiessinger (1881-1946), Jacques Roskam (1890-1977) et Paul Chevallier (1884-1960) avaient créé en 1931 la Société Française d'Hématologie présidée par Georges Hayem (1841-1933).

A partir de 1954, les techniciens du service d'Hématologie de l'Hôpital Hérold (ex Hôpital Robert Debré - Paris) furent chargés de classer chaque « cellule leucosique » de frottis sanguin dans l'une des six variétés suivantes: hémocytoblaste, lymphoblaste, promyélocyte, monoblaste et cellule leucosique monocytoïde. Ils utilisèrent la méthode d'Artur Pappenheim basée sur les colorations de May-Grünwald et Giemsa (6) inspirée du procédé de Romanowsky (1891) et modifié par Giemsa (1905) pour l'hématologie. Il préconise l'emploi successif de deux mélanges complexes de colorants, la solution de May-Grünwald, mélange neutre d'éosine et de bleu de méthylène en solution alcoolique, et la solution de Giemsa ajoutant aux colorants précédents l'azur. Le principe de cette coloration repose sur une fixation en milieu alcoolique dans le liquide de May-Grünwald qui, dilué dans un second temps en milieu aqueux, permet la dissociation du colorant neutre et son action colorante (7). Une autre modification du procédé de Romanowsky donnera la coloration de Wright, très utilisée en Hématologie dans tous les pays anglo-saxons alors qu'en France, nous utilisons la coloration panoptique de May-Grünwald Giemsa (MGG).

L'hémogramme est un examen de Biologie prescrit dans des situations très diverses telles qu'une altération de l'état général, une grossesse, dans le cadre de la médecine du travail ou plus

simplement dans le cadre d'un « bilan général ». De manière plus ciblée, il est prescrit au cours de pathologies infectieuses, anémiques, hémorragiques, thrombotiques, lors d'une suspicion d'hémopathie ou de syndrome tumoral et dans le suivi de certains traitements, dont les chimiothérapies. Il est réalisé à partir d'un prélèvement de sang veineux périphérique sur un tube contenant un anticoagulant, l'EDTA (acide éthylène tétra acétique) et porte sur l'analyse des trois grandes lignées de cellules sanguines : les hématies, les leucocytes et les plaquettes.

Au début du siècle dernier, la numération formule sanguine était réalisée entièrement par des méthodes manuelles. Depuis l'avènement des analyseurs automatiques, la qualité et la quantité des résultats obtenus ont été considérablement améliorées. Les automates d'hématologie fournissent des données chiffrées (mesurées et calculées) et des graphes qui permettent d'apprécier les différents paramètres de l'hémogramme. Toutefois, malgré les grandes avancées en matière d'automatisation et de technologie, la révision au microscope du frottis sanguin reste la technique de référence devant toute anomalie qualitative ou quantitative (signalée ou non par l'automate), d'autant que l'automate génère lui-même des alarmes indiquant la nécessité d'une révision au microscope de ses données dans diverses circonstances. On peut considérer 4 cas de figures donnant lieu à une révision microscopique d'un frottis à partir des données de l'automate :

- une anomalie quantitative donnant lieu à une révision de type quantitative (ex: présence d'érythroblastes comptés dans les leucocytes)
- une anomalie quantitative donnant lieu à une révision de type qualitative (ex: morphologie des hématies, suspicion d'amas plaquettaires)
- une anomalie qualitative donnant lieu à une révision quantitative (ex: schizocytes)
- une anomalie qualitative donnant lieu à une révision qualitative (ex: lymphocytes activés)

On note déjà la forte imbrication entre les anomalies qualitatives et quantitatives en cytologie.

Il existe des intervalles de référence, des valeurs seuils, des valeurs critiques pour chaque paramètre de la numération formule sanguine en fonction de l'âge et du sexe du patient. Nous utiliserons ici :

- les valeurs seuil de la HAS (8),
- les valeurs critiques de Mc Farlan (9),
- les propositions du GFHC pour la revue microscopique du frottis sanguin (10),
- les dernières recommandations internationales de standardisation de l'ICSH (11).

Généralités sur la formule sanguine au microscope :

L'analyse microscopique des cellules du sang (identification et/ou comptage) s'effectue à partir d'une goutte de sang total prélevé sur tube EDTA, étalée sur une lame de verre, colorée et observée au microscope optique.

Deux points sont fondamentaux lors de la réalisation du frottis :

- l'aspect du frottis qui va conditionner la qualité de la zone de lecture, indispensable à une bonne appréciation et un « bon dénombrement » des populations cellulaires présentes (12)
- la qualité de la coloration qui va permettre d'apprécier les degrés de basophilie et d'acidophilie, indispensables à une bonne identification des cellules (13).

Deux points sont fondamentaux lors de l'analyse microscopique du frottis :

- un échantillonnage adéquat et représentatif de l'échantillon dans une zone de lecture adéquate (14)
- une bonne compréhension à la fois de la question (diagnostic ou biologique) posée et une bonne connaissance des anomalies détectées et/ou à détecter.

1.2 La Qualité

Généralités sur la qualité :

La « Qualité » selon Colbert (XVII^e siècle) se rapporte à « la qualité supérieure des produits de la manufacture royale » (1664) et fait référence au savoir-faire reconnu français sous le règne de Louis XIV. Ce concept sera ensuite largement développé dans l'ère de l'industrialisation, avec, tout d'abord, dans les années 1940, W. Edwards Deming (1900-1993), Ingénieur et Statisticien américain, dont les théories qui s'opposent alors au Taylorisme (concept de division du travail lui étant d'abord incontestablement préféré), feront échos dès 1950 au Japon, puis finalement dans les années 1980 aux Etats-Unis. Vilfredo Pareto (1848-1923), Sociologue et Economiste italien, introduisit le concept d'efficacité, de courbe d'indifférence qui est à l'origine du « diagramme de Pareto », utilisé dès 1934 aux USA pour la classification des défauts selon leur gravité. Depuis les années 50, on connaît la roue de Deming (ou *Deming wheel*), célèbre illustration de la méthode de gestion de la qualité dite PDCA (*Plan-Do-Check-Act*), ou encore PDSA (*Plan-Do-Study-Act*).

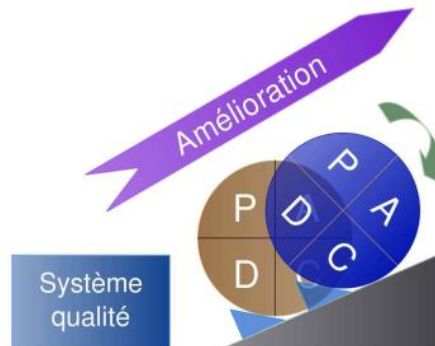


Figure 1 : Roue de Deming

Dans les années 1960, encore au Japon, K. Ishikawa (1915-1989), Ingénieur chimiste japonais, publie le diagramme de « causes et effets » qui est un outil fondamental encore très utilisé de nos jours.

Ces outils seront utilisés dans la réalisation de ce travail.

En France, on retiendra :

- Dès 1933, le Premier Salon de la Qualité Française à Paris,
- En 1941, le décret du 24 mai 1941 qui définit le statut de normalisation et crée la marque NF,
- En 1951, l'AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance et de leur Criticité),
- En 1961, la création de l'Association Française des Qualiticiens (AFQ),
- En 1994, la création du Comité Français d'Accréditation (COFRAC),
- En 2003, la création de l'Union des Associations AFAQ – AFNOR.

Ainsi, depuis « l'esprit qualité » comme marque de « savoir-faire » du XVII^e siècle, d'excellence, de « supériorité du produit » ou comme simple argument commercial, le sens accordé à cette notion a changé. Originaire du monde industriel, d'abord dans les programmes spatiaux puis dans toute l'industrie, la gestion de la qualité concerne aujourd'hui tous les secteurs d'activité dont la santé. C'est un domaine vaste, complexe, normé, réglementé, avec un vocabulaire propre, en constante évolution mais définitivement et irréversiblement en marche.

L'approche processus est une méthode destinée à maîtriser et améliorer le fonctionnement d'un organisme. A l'origine, une exigence de l'ISO 9001, l'approche processus s'applique aussi aux Laboratoires et consiste à :

- déterminer pour chaque processus ses éléments entrants et ses produits ou services en sortie
- déterminer la séquence et les interactions de ces processus ;
- déterminer les critères et les méthodes pour assurer la maîtrise des processus ;
- maîtriser les ressources et les informations nécessaires au bon fonctionnement des processus
- surveiller, mesurer et analyser les processus ;
- mettre en œuvre les actions nécessaires pour atteindre les objectifs et l'amélioration continue.

Elle permet d'établir une cartographie qui dissocie et articule ensemble les activités dite « cœur du métier » des activités stratégiques (ou de pilotage) et supports (annexe 1).

Généralités sur l'accréditation :

Depuis la mise en place du GBEA dans les années 90, l'accréditation, rendue obligatoire par l'ordonnance du 13 Janvier 2010 (16), a réformé la Biologie médicale dans le but principal d'en renforcer les exigences en matière de qualité et de compétence. La norme NF EN ISO 15189, créée en 2007 et révisée en 2012, s'applique aux LABM seuls, et regroupe à la fois des dispositions techniques et documentaires dans la perspective d'une installation et d'une amélioration continue du système de qualité des Laboratoires.

Créé en 1994, le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) est l'unique organisme d'accréditation en France. Il crée la Section Humaine (SH) en 2010 et, selon l'Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010, applique la norme NF EN ISO 15189, complétée le cas échéant par la norme NF EN ISO 22870. Le COFRAC édite un ensemble de documents relatifs à l'accréditation des Laboratoires, pour certains, récemment révisés, avec notamment, actuellement en vigueur:

- le SH REF 02 explicitant les dispositions législatives et réglementaires (Rev05, nouvellement révisé au 1^{er} Juillet 2016),
- les SH REF 08 (Rev03-12/2015) et SH INF 50 (Rev02-02/2016), respectivement, l'expression et évaluation des portées d'accréditation, et les portées d'accréditation,
- les SH GTA 04 (Rev01-04/2015) et SH FORM 43 (Rev01-04/2015), respectivement, guide technique et fiche type d'accréditation pour la vérification/validation de méthode en Biologie médicale.

Généralités sur la portée flexible :

C'est en 2010, que le COFRAC énonce les notions de « portées flexibles » selon qu'une méthode est adoptée ou adaptée : les portées d'accréditation sont énoncées dans les documents SH REF 08 et SH INF 50 *et définies comme suit*: « l'énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité ». Y sont aussi définies les notions suivantes :

- Adopter une méthode: intégrer dans sa portée d'accréditation une méthode normalisée ou consensuellement reconnue (ex. méthode fournisseur), flexibilité de type A
- Adapter une méthode: modifier une méthode validée pour l'ajuster aux besoins du laboratoire / du client (patient / prescripteur), flexibilité de type B
- Portée flexible standard (A): 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 de méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées (SH INF 50).

Le laboratoire doit donc définir, au sein d'une procédure de gestion de portée flexible, les dispositions organisationnelles mises en œuvre afin d'apporter les garanties nécessaires quant à la maîtrise de sa portée d'accréditation. Cette procédure de gestion est destinée à passer en revue les processus mis en jeu lors de toute modification telle qu'un changement d'équipements, une modification de méthodes, ect ... L'évaluation porte notamment sur:

- la compétence et la capacité du personnel à pratiquer chacune des techniques de mesure
- les dispositions organisationnelles mises en œuvre pour maîtriser sa portée
- le processus de revue, confirmation et autorisation d'emploi des méthodes
- les dispositions qui décrivent l'ensemble du processus sur la base du dossier de vérification de méthode (d'après SH REF 08).

Aussi, les responsabilités à chaque étape du processus doivent être décrites.

1.3 L'accréditation de la formule sanguine au microscope en portée flexible

Le SH GTA 04, guide technique d'accréditation de validation/vérification de méthode en Biologie médicale, énonce notamment les critères de performance à évaluer dans le cas d'un examen de type qualitatif et quantitatif (annexe 2).

Le SH GTA 04 définit :

- les méthodes quantitatives selon : « Elles fournissent des résultats issus de données numériques. Remarque : Le dénombrement est une propriété quantitative, d'unité égale à 1. Les résultats issus d'un ratio (%) sont également considérés comme des résultats quantitatifs ».
- les méthodes qualitatives selon : « Elles fournissent des résultats issus de données non numériques. Par exemple, les examens à lecture subjective (identification macro et/ou microscopique, ...) ou les résultats binaires (présence/absence, positif/négatif, ...) »

- le site Luxembourg étant géographiquement situé à proximité du Centre anti cancéreux Pierre et Marie Curie, les suivis de chimiothérapie sont fréquents.

- une partie de la patientèle est suivie en Hématologie clinique à l'hôpital Necker-Enfants Malades

En 3 mois de remplacement, j'ai pu diagnostiquer 2 leucémies aiguës de novo (LAM), une anomalie de l'hémoglobine, un syndrome lymphoprolifératif, une hyperéosinophilie et suivre de nombreuses pathologies connues.

Le nombre de formule sanguine revues au microscope oscille entre 0 et 8/ j, soit en moyenne, 3 à 4 /j.

1.5 Limites de l'étude

La première limite tient au contexte lui-même d'une mission d'une durée limitée à 3 mois.

La formule sanguine au microscope est réalisée au laboratoire depuis ses débuts, ainsi, certaines actions et documents n'ont pas donné lieu à une révision.

L'étude ne porte pas sur :

- l'évaluation des performances de l'automate d'hématologie qui faisait partie du dossier de demande initiale d'accréditation
- la mise au point de la technique de coloration : adoptée, utilisée au Laboratoire depuis plus de 10 ans, elle a été choisie notamment en fonction des besoins du laboratoire. Il s'agit d'un kit de coloration rapide qui ne produit pas une coloration optimale mais reste très utilisé dans les laboratoires ayant une « faible activité » de cytologie.
- la formation, l'habilitation de l'équipe technique ni le maintien des compétences
- l'habilitation du Biologiste Remplaçant que je suis

Mais je fais des propositions pour chacun de ces points.

1.6 Annonce du plan

Nous présenterons d'abord le logigramme et le formulaire d'ajout d'une analyse en portée flexible que j'ai utilisés pour cette étude puis, selon le SH FORM 43, nous présenterons la technique, le mode opératoire, le domaine d'application, la vérification/validation de méthode. Nous passerons en revue les processus de pilotage et de supports impliqués dans cette méthode.

Nous présenterons ensuite, les critères de performances à vérifier, les limites acceptables pour ces critères, l'évaluation des performances de la méthode avec compilation et analyse des résultats obtenus.

Enfin, nous commenterons et discuterons ces résultats et tenterons d'apporter des idées de réponses ou de réflexion aux questions qui se sont posées et aux difficultés rencontrées au cours de ce travail. Nous conclurons quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées.

2. La formule sanguine au microscope en portée flexible au LABM Biolabs

2.1 Application des révérenciels à la formule sanguine au microscope

L'identification morphologique après coloration par microscopie optique, comme définit dans le SH INF 50 (annexe 4) peut ici être envisagé dans le cadre d'une portée flexible de type A. Il s'agit donc, pour utiliser sous accréditation l'examen microscopique de la formule sanguine, de répondre aux exigences rassemblées sous forme de formulaire : le SH FORM 43.

2.1.1 Description du processus

Le processus complexe « Hémogramme » peut se décrire selon un logigramme (annexe 5) qui permet de répondre à la question : « quand réalise t on un frottis ? » : très simplement :

- lorsque les critères de révision microscopique du frottis sanguins (présentés ci-après) sont applicables (avec ou sans ré analyse de l'échantillon sur l'automate)
- lorsque l'automate génère une alarme (nous ne reviendrons pas ici sur les alarmes automate)

Selon le SH FORM 43, la méthode peut être décrite comme suit :

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : Hémogramme
Numération-formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe X (nombre de sous-processus : 2)

SOUS-PROCESSUS 2 : Examen microscopique de frottis colorés au MGG
Portée A X ; Portée B <input type="checkbox"/>

Il s'agit d'une portée A puisque la méthode est consensuellement reconnue.

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/ Mesurande	Identification et comptage relatif des cellules sanguines circulantes normales et anormales
Principe de la mesure	Lecture au microscope optique après coloration au MGG. Identification morphologique et/ ou numération : pourcentage des sous populations leucocytaires sur 100 cellules observées
Méthode de mesure	Observation microscopique - Comptage microscopique
Type d'échantillon primaire	Sang total
Type de récipient	EDTA
Prétraitement de l'échantillon	Agitation douce par retournement
Unités de mesure	G/L et %
Intervalles de référence	Valeurs seuil HAS
Instruments	Microscope optique Carl Zeiss
Réactifs utilisés	Kit RAL 555 (réf 361550-0000) notice 12001 version 2
Marquage CE	Oui
Matériel utilisé	Lames porte objet en verre
Matériaux d'étalonnage	NA
Contrôles de qualité externe	EEQ : Biologie prospective CQN : ANSM

2.1.2 Critères de revue microscopique du frottis sanguin

Par souci de clarté, je présente ici les critères de revue microscopique des frottis sanguins.

L'instruction D2-INS 02 présentait les critères donnant lieu à la réalisation d'un frottis et/ou à la ré-analyse sur automate. Je l'ai modifiée et complétée à partir des recommandations du GFHC (10) .

Réaliser un frottis sanguin si :

- Leucocytes - formule sanguine automate :

Paramètre	Critère	Condition
Leucocytes	< 4 G/L	pour la 1 ^{ère} fois
	> 20 G/L	pour la 1 ^{ère} fois
	> 1 G/L	antériorité < 1 G/L
Alarme scattergramme		
polynucléaires neutrophiles	< 1.5 G/L ou > 15 G/L	pour la 1 ^{ère} fois
Alarme blastes, IG		
polynucléaires éosinophiles	> 1.5 G/L ou > 15%	pour la 1 ^{ère} fois
polynucléaires basophiles	> 0.3 G/L	pour la 1 ^{ère} fois
lymphocytes	> 5 G/L (adultes)	pour la 1 ^{ère} fois
	> 6 G/L (enfants 6 - 12 ans)	
Alarme Ly atypiques ou anormaux		
monocytes	> 1.5 G/L ou > 20%	pour la 1 ^{ère} fois

- Hématies - hémoglobine - constantes érythrocytaires - réticulocytes

Paramètre	Critère	Condition	Commentaire
Hématies	Alarme NRBC, fragments		
Hémoglobine	< 8 g/dL (adulte)	pour la 1 ^{ère} fois	vérifier l'absence de caillot, ré-analyse
	< 9 g/dL (enfant)	pour la 1 ^{ère} fois	
VGM	< 75 fl	pour la 1 ^{ère} fois	
	> 105 fl	pour la 1 ^{ère} fois	
CCMH	> 36 g/dl	tube à 37°C	ré-analyse et lame
Réticulocytes	> 120 G/L	avec une anémie	

- Plaquettes

Paramètre	Critère	Condition	Commentaire
Plaquettes	< 100 G/L	pour la 1 ^{ère} fois	vérifier l'absence de caillot, ré-analyse et lame
	> 450 G/L	pour la 1 ^{ère} fois	
	-	Alarme « agrégats plaquettaires »	

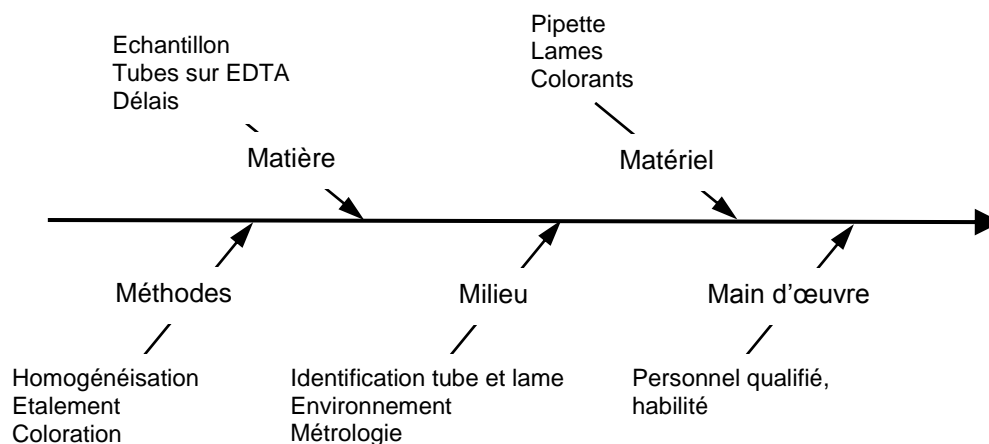
Autres critères : Autres cas où la réalisation d'un frottis sanguin est indispensable :

- Enfant de moins de 12 mois pour la première fois,
- Patient connu pour une interférence (cryoglobuline, leucoagglutination ...)
- Présence d'érythroblastes, de cellules anormales et/ou blastes sur le frottis précédent,
- Dès que l'automate donne une alarme sur la formule,
- Si alarme « fragments érythrocytaires ou schizocytes »
- Si antériorités > 30 jours ou si le frottis non réalisé > 30 jours avec des paramètres perturbés,
- Si pourcentage de grandes cellules immatures > 4%,
- Si présence d'érythroblastes : faire une lame, compter les érythroblastes et corriger le nombre des leucocytes en fonction de la formule donnée dans le manuel d'utilisation de l'automate.

2.1.3 Maitrise des risques :

Dans le cadre de l'examen microscopique du frottis sanguin, la maîtrise des risques est capitale. Qui plus est, on la retrouve dans l'évaluation qualitative de la méthode. J'ai choisi de présenter le diagramme d'Ishikawa en 3 sections : pré, péri et post- analytique, comme suit :

1) Pré-analytique : de l'étalement à la coloration



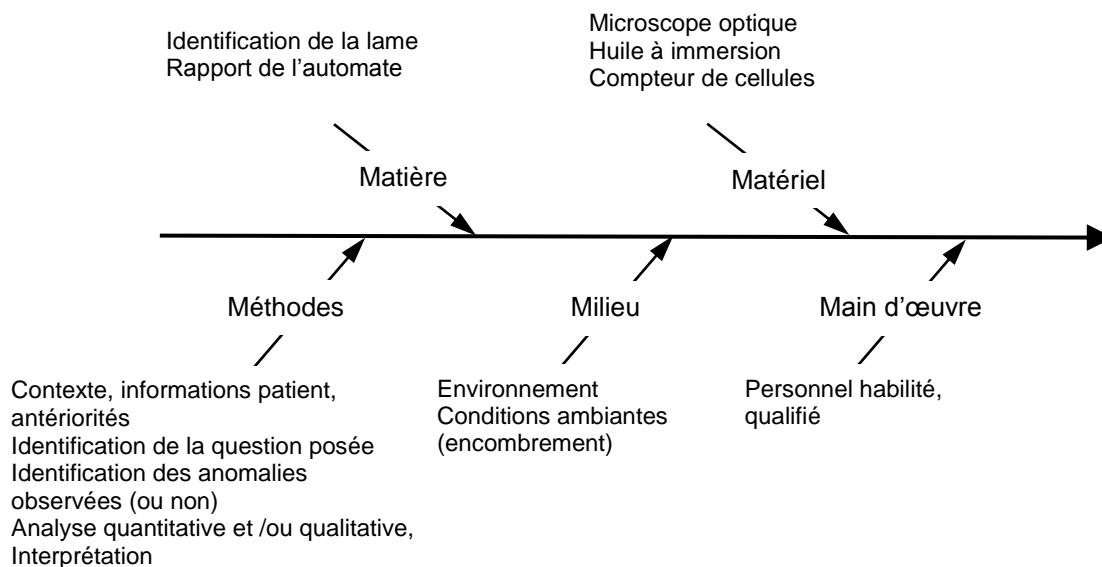
	Données d'entrée	Echelle de criticité	Points critiques à maitriser	Modalités de maitrise
pré-analytique	Matière			
	Echantillon	5	Identification Vérification systématique	Procédure de prélèvements Manuel de prélèvement Formation et habilitation Vérifier sur tube EDTA
		3	Tube EDTA, micro-caillot, agglutinines froides, quantité insuffisante	Vérification tube EDTA avant toute analyse
		2	Délais et température avant réalisation	Logistique, transport
		2	Prétraitement : agitation douce	Procédure / Mode opératoire
	Matériel			
	Colorants	2	Absence de dépôts ou de cristallisation	Fiche fournisseur
		2	Rebouchage des flacons	Instruction
		2	Suivi des numéros de lot, péremption	Traçabilité
		2	Lieu de stockage	Enregistrement des température
		3	Qualité de la coloration	Formation du personnel
	Méthode			
	Procédure	5	Connaissance des règles de validation, valeurs seuils, d'alerte, critiques, de ré-analyse	Formation, habilitation du personnel
	Réalisation du frottis : étalement et coloration	3	Identification de la lame	N° dossier, date et nom du patient
			Observation macroscopique	Formation du personnel – Habilitation niveau 1 et suivi

	Milieu			
	Conditions environnementales	3	Température Pièce technique climatisée	Suivi métrologique
	Encombrement	3	Coloration - Séchage des lames	Espace dédié
	Main d'œuvre			
	Personnel	4	Connaissance alertes et critères de réalisation d'une lame, alarmes automate	Habilitation niveau 1 et suivi Critères de réalisation d'une lame en Hématologie
		3	Réalisation d'un frottis	Habilitation niveau 1 Mode opératoire Traçabilité de l'occupation du poste de travail

A ce niveau, selon moi :

- Le risque le plus important est l'erreur de tube ou une mauvaise identification du frottis lors de sa réalisation (effacement du numéro lors de la coloration).
- La mésinterprétation d'une alerte automate sera tout aussi décisive
- La qualité du frottis se vérifie à cette étape : aspect et couleur macroscopique

2) Analytique : lecture au microscope et interprétation



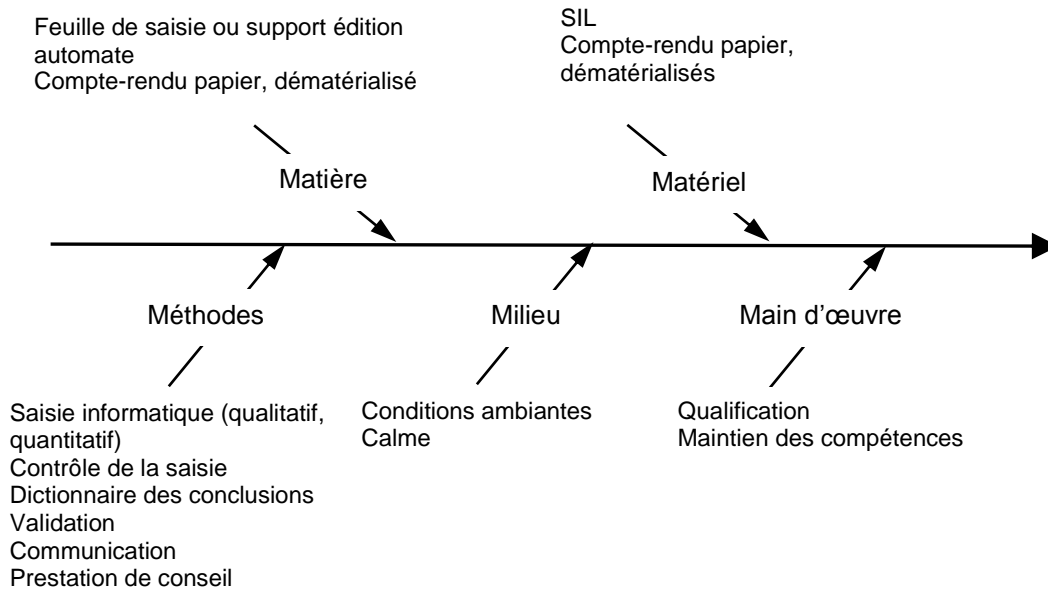
	Données d'entrée	Echelle de criticité	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
analytique	Matière			
	Lame	4	Identification	Vérification avant toute lecture
			Aspect, couleur	Instruction d'étalement et coloration
			Présence d'érythroblaste	Compter +/- corriger le nombre de leucocytes
Rapport automate	4	Identification	N° dossier, nom du patient, date	

Matériel			
Microscope	3	Maintenance (bon état et propre)	Formation du personnel Entretien annuel par une société externe
	5	Panne	Conduite à tenir en cas de panne du microscope
Compteur de cellule	4	Non relié au middleware Recopiage manuel sur rapport automate	Vérification recopiage
Méthode			
Identification de la question posée	4	Contexte et informations pertinentes	Accès au SIL
		Rapport automate +/- antériorités	
Identification des anomalies	4	Erreur d'échantillonnage	Formation, Habilitation niveau 2/3 et maintien EEQ Tracabilité de l'occupation du poste de travail
	5	Erreur d'interprétation Anomalies simples / complexes qualitatives / quantitatives	
	5		
Milieu			
Conditions environnementales	2	Température	Pièce technique climatisée
Encombrement :	2	Microscope, compteur et SIL	Endroit dédié
Main d'œuvre			
Personnel	3	Lecture de frottis sanguins « normaux »	Habilitation niveau 2 Demande second avis ? EEQ
	4	Lecture de frottis sanguins « pathologiques »	Habilitation niveau 3 Demande second avis ? EEQ

Viennent ensuite les risques inhérents à l'analyse proprement dite :

- dus au faible nombre de cellules comptées : un échantillonnage insuffisant constitue un risque important. Il est traditionnellement d'usage qu'un décompte s'effectue sur 100 cellules. Pourtant, parfois, le nombre de leucocytes est tellement faible qu'on ne dispose pas de 100 cellules à compter sur un frottis. Dans d'autres cas, on peut être amené à faire un décompte sur 100 cellules supplémentaires.
- dus à un mauvais étalement (d'autant que celui-ci est manuel et « opérateur dépendant ») : il a été montré que les monocytes sont plus fortement représentés dans les fins de frottis par exemple (14). Une instruction concernant la réalisation du frottis sanguin a donc été rédigée (annexe 6).
- dus à une mauvaise coloration et/ou une « mauvaise lecture » : les deux situations sont sources d'erreur et nécessitent toujours une homogénéisation des pratiques (17).
- l'erreur d'interprétation : c'est probablement la plus « crainte » des erreurs, elle a deux sources principales : les mauvaises conditions techniques que l'on vient de citer et une erreur (humaine) d'interprétation. Encore une fois, on revient sur les notions de formation, habilitation et maintien des compétences.

3) Post-analytique : de la saisie à la validation



	Données d'entrée	Echelle de criticité	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
post-analytique	Matière			
	Feuille de saisie	3	Support édition automate	Vérification saisie + initiales
	Matériel			
	Suivi des résultats	3	EEQ, CQN	Procédure de suivi
	SIL	3	panne	Procédure mode dégradé
		3	Paramétrage, suivi, modification, vérification, diffusion	Responsable Qualité et référent SIL
	Méthode			
	Saisie des résultats	4	Décompte	Contrôle de saisie manuelle
		3	Commentaire (s)	Dictionnaire des commentaires
		3	Identification de l'opérateur	Traçabilité sur le SIL
	Validation	4	Personnel formé et habilité	Traçabilité
	Communication résultats pathologiques	3	Au Biologiste d'un autre site	Tél, Fax, compte-rendu dématérialisé
			Au prescripteur	Tél, prestation de conseil
			Au patient	
	Milieu			
Conditions environnementales	2	Ergonomie	Endroit calme permettant de conserver l'anonymat	
Main d'œuvre				
Personnel	5	Connaissance des hémopathies, conclusions pertinentes	Habilitation niveau 3 Maintien des compétences	

Ici, c'est l'erreur de saisie dans le SIL qui constitue le plus grand risque à mon sens, d'abord, à partir du compteur de cellules (non connecté) puis à partir du support recopié.

En résumé, on notera l'impact essentiel de la formation du personnel à toutes les étapes et de la qualité du frottis sanguin réalisé.

En pratique au Laboratoire Biolabs, les frottis sanguins sont analysés et les résultats saisis par le Biologiste du site Dupont des Loges. Toutefois, il est choisi de conserver l'habilitation du personnel technique à la lecture des lames acquise antérieurement.

2.1.4 Méthodologie

2.1.4.1 Logigramme et formulaire de portée flexible :

Dans le but d'organiser ce travail, j'ai utilisé à la fois le logigramme de portée flexible (annexe 7) et le formulaire dédié modifié pour les besoins de cette présentation (annexe 8).

Le logigramme permet de lister les actions à mener en décrivant, pour chacune, les responsabilités et les moyens ou méthodes à disposition ou à envisager. Le formulaire permet, quant à lui, de détailler chaque action et d'en viser la réalisation.

Ne s'agissant ni d'une nouvelle analyse ni d'une modification majeure dans un processus analytique existant mais d'un ajout d'une ligne de portée dans une famille déjà ouverte et d'une méthode déjà utilisée au Laboratoire, les achats n'ont pas donné lieu à une révision. Ainsi, nous pouvons « ouvrir » le dossier de validation/ vérification de méthode et envisager successivement les modifications à apporter dans le processus analytique puis dans les processus supports.

2.1.4.2 Processus analytique :

Sur le plan pré-analytique :

- le contenant (tube EDTA), les moyens et délais d'acheminement, le prétraitement (agitation douce par retournement) de l'échantillon n'ont pas nécessité de modification par rapport au sous-processus 1 de l'hémogramme. Je propose juste de créer un indicateur quant aux délais de réalisation
- les conditions de température sont satisfaisantes en l'état: pièce technique climatisée
- une place dédiée consacrée à la lecture au microscope existe déjà
- une liste de travail devrait être établie à partir des dossiers incomplets de l'analyse « numération formule sanguine »
- les fiches d'informations concernant les alertes nécessitant la réalisation d'un frottis sanguin à partir des résultats de l'automate d'hématologie et la fiche d'information concernant la réalisation d'un frottis sanguin ont été révisées
- une attention particulière doit être portée à l'identification des lames
- le choix de la coloration n'est pas optimale, elle n'est pas adaptable, je n'ai pas la possibilité de la modifier mais elle correspond aux besoins du Laboratoire en terme d'activité

Sur le plan analytique :

- la gestion des CQI, EEQ, CQN a fait l'objet d'un écart critique lors de la visite initiale et a été révisée : les résultats apparaissent sur des fichiers partagés et sont consultables en temps réel à partir des 4 sites
- la fiche de résultat issue du Pentra-XLR est utilisée pour support de lecture au microscope et il n'y a pas de station de saisie à proximité du microscope
- l'achat d'un compteur de cellule connecté devrait être envisagé, un contrôle devrait être mis en place dans l'intervalle

Pour la partie post- analytique :

- les valeurs de référence sont inchangées par rapport à celles utilisées pour l'automate,

- la saisie des résultats sur Alysée doit être vérifiée et encadrée
- la validation consiste en la validation de l'ensemble « numération – formule sanguine » avec saisie informatique (simple) de la formule leucocytaire, ajout de la mention « formule vérifiée manuellement » et/ou d'autres commentaires assignés à cette analyse et/ou saisis en texte libre.
- la communication des résultats n'a pas été sujette à modification
- la conservation des lames réalisées et lues, par incrémentation de la date de l'examen, dans des boîtes de lames dédiées à cet effet a été organisée. Les lames lues seront conservées 1 mois puis, soit éliminées, soit rangées dans une autre boîte dite « de bibliothèque ».

2.1.4.3 Processus supports

Ressources humaines :

C'est très probablement le support le plus crucial à la fois en cytologie et dans cette démarche qualité. Pour ma part et compte-tenu de l'organisation du laboratoire, j'ai proposé 3 niveaux d'habilitation (sous forme de fiche) pour le personnel :

- niveau 1 : qui nécessite la connaissance et l'identification des messages d'alerte de l'automate, la communication au Biologiste des résultats urgents, critiques, la réalisation du frottis et de sa coloration (avec « vérification macroscopique »)
- niveau 2 : qui nécessite la connaissance des sous populations leucocytaires normales, de « savoir faire une formule normale » et détecter des éléments anormaux
- niveau 3 : qui nécessite la reconnaissance et l'identification des cellules anormales et des hémopathies

A cela, j'ai ajouté :

- une fiche d'évaluation du maintien des compétences
- une fiche d'habilitation pour le Biologiste Remplaçant que je suis, pour lequel, rien n'était prévu en cytologie.

Ces fiches d'habilitation sont proposées en annexes 8, 9 et 10.

Je n'ai pas participé à la formation, l'habilitation et au plan de maintien des compétences du personnel, j'émet juste des propositions sur ce sujet précis.

Quant au maintien des compétences, un programme et un suivi doivent être établis en fonction de la fiche de poste, de la formation et du niveau d'habilitation (actuel et souhaité) de chacun.

Système d'information des laboratoires (SIL) :

S'agissant d'une structure privée avec 4 entités géographiquement distinctes, le système informatique est en réseau. On peut sélectionner :

- des domaines analytiques pour tous les sites
- des domaines de validation pour chaque site

Il s'agit du logiciel Alysée utilisé ici, sans système expert associé

- il n'y a pas eu besoin de prévoir de connexion additionnelle, de modification des valeurs et intervalles de référence mais de leurs unités

- dans le paramétrage, il a été procédé à la modification de la liste préexistante des commentaires associés à la formule sanguine, sachant que la saisie de texte libre reste à tout moment utilisable
- un contrôle de saisie manuelle des résultats doit être instauré et tracé
- la validation Biologique est assurée par le Responsable de chaque site et non par celui qui saisit les résultats de la formule et les commentaires. Une modification du paramétrage à ce niveau ne semble pas réalisable.

Une messagerie partagée permet de visualiser tous les messages en temps réel et de partager des données comme les contrôles de qualité quotidiens dans tous les sites, par exemple.

Enfin, à partir du logiciel de gestion de la Qualité, Gesqual, des rappels sont assignés à chacun pour la prise de connaissance de documents et la date limite de cette prise de connaissance.

A mon arrivée au Laboratoire, une liste d'environ 30 documents m'avait été assignée pour une prise de connaissance sous 15 jours par ordre de priorité. Elle contenait notamment :

- la fiche d'instruction du mode dégradé en cas de panne informatique
- les valeurs limites pour chaque paramètre

mais aucun document ne portait sur la cytologie.

Cette étude ne porte pas sur la vérification du système informatique, d'autant qu'une vérification de celui-ci dans sa globalité a été réalisée pour le dossier de demande d'accréditation.

J'ai aussi demandé le changement des unités en Hématologie (en G/L pour la plupart et non en mm³) pour les valeurs usuelles, valeurs seuils, critères d'alerte sur les documents qualité et les comptes-rendus d'analyse comptes-rendus : ce point ayant justement fait l'objet d'un écart sur les comptes-rendus lors de la visite initiale du COFRAC, cette modification a été rapidement réalisée.

J'ai préconisé qu'une feuille de paillasse des frottis à réaliser soit éditée mais, du fait de l'organisation du laboratoire et des transports à partir des différents sites, c'est la liste des incomplets du soir qui permet de vérifier qu'aucune formule n'a été « oubliée ».

Enfin, j'ai préconisé qu'une vérification de la saisie manuelle soit instituée (double saisie ou contrôle nominatif).

Matériel, réactifs et locaux :

Peu de choses ont été modifiées dans ce domaine, l'organisation du Laboratoire étant déjà effective. Il n'était pas nécessaire d'effectuer de nouveaux achats ni de revoir des contrats (si ce n'est celui de la révision du microscope) mais de spécifier l'utilisation en Hématologie de certains matériels (le microscope, une pipette pasteur capable de délivrer un volume d'environ 5 µl, non critique) et de certains consommables (lames et lamelles, le kit de coloration MGG, l'huile à immersion).

L'intégration à la gestion des stocks et la mise en œuvre en routine étaient déjà effectives.

La métrologie reste très limitée en cytologie puisque les techniques se font à température ambiante.

Seuls points qui auraient nécessité une modification :

- la place dédiée à la lecture des frottis
- une station de consultation et de saisie à proximité du microscope
- un meilleur entretien du microscope

- une amélioration de la qualité de la coloration.

Gestion documentaire :

Il n'a pas été nécessaire de modifier le manuel de prélèvement ni le catalogue des analyses

Ont été révisés:

- tous les documents portant des unités non usuelles
- les critères de revue microscopique du frottis sanguin
- l'instruction de réalisation et coloration du frottis sanguin avec notamment, l'observation macroscopique et la création d'une bibliothèque de lames
- la procédure de gestion des CIQ et EEQ

Ont été créés :

- le dossier de validation/vérification de méthode
- les fiches d'habilitation et maintien des compétences du personnel (annexes 9,10)
- une fiche d'habilitation du Biologiste Remplaçant dédiée à cette activité (annexe 11)

Je ne fais qu'émettre des propositions qui seront validées (ou non) par la Biologiste titulaire, quant à la création de documents dédiés à la formule sanguine au microscope.

J'ai aussi proposé de créer des indicateurs propres à la cytologie sanguine.

Logistique :

Le suivi des délais de transport et de réalisation des analyses n'est pas spécifique à la cytologie et a montré qu'il devait être mieux encadré lors de la visite initiale du COFRAC.

Je n'ai pas participé au processus de pilotage : compte-tenu de la durée de ma mission, je ne participerai pas à la prochaine revue de Direction ni à la révision du dossier de vérification de méthode de la formule sanguine au microscope jusqu'à son achèvement.

En résumé, les actions menées sont présentées en annexe 12.

2.1.5 Critères de performance de la méthode à vérifier :

La réalisation de la formule sanguine au microscope est considérée selon le SH GTA04 comme une technique qualitative dans le sens où il s'agit de reconnaître des cellules. Toutefois, elle comporte une bonne part de l'aspect quantitatif puisqu'il s'agit de les compter. Ainsi, le dossier de vérification de méthode portera à la fois sur des aspects qualitatifs et des aspects quantitatifs qui, toujours selon le SH GTA 04 en portée A, prévoit l'évaluation des critères suivants :

1) Pour l'aspect quantitatif :

- la répétabilité
- la fidélité intermédiaire
- la justesse inter-opérateur et la variabilité inter-opérateur
- l'exactitude
- la comparaison de méthode (avec la formule de l'automate)

- 2) Pour l'aspect qualitatif : très principalement, la maîtrise des risques de variabilité (habilitation du personnel, traitement et suivi des contrôles de qualité....)

Nous allons vite constater que le plan envisagé de vérification de méthode est en fait découpé selon un autre schéma puisque :

- la méthode quantitative convient bien aux sous populations leucocytaires « fortement » représentées dans la formule que sont les PN.N, Ly, Mo
- la méthode qualitative doit s'appliquer à l'identification d'éléments plus rares, même si ceux là sont quantifiés, et cela, qu'ils soient normaux ou anormaux.

Ainsi, le projet de travail initial peut se résumer comme suit :

Objet de l'analyse :	Mode d'évaluation :
Plaquettes :	qualitatif
Hématies	qualitatif
Leucocytes	.
PN.N :	quantitatif
PN.Eo :	qualitatif
PN.Ba :	qualitatif
Ly :	quantitatif
Mo :	quantitatif
Cellules anormales	qualitatif

2.1.6 Choix des limites acceptables

Un automate d'hématologie compte en général 10 000 leucocytes pour établir une formule sanguine. Pour la formule sanguine rendue par un automate, les limites d'acceptabilité sont bien décrites dans la littérature et, par souci de comparaison, je mentionnerai à titre indicatif les valeurs des limites acceptables selon Ricos (18).

	CV rép ($1 / 1.33$)	Incertitude ($0.5 \times CV_w$)	Biais ($1.25 \times \sqrt{CV_w^2 + CV_g^2}$)
PN.N si > 1.2 G/L	6.4	8.6	9.2
PN.Eo	7.9	10.5	19.8
PN.Ba	10.5	14	15.4
Ly si > 0.6 G/L	3.8	5.1	9.2
Mo si > 0.2 G/L	6.7	8.9	13.2

Figure 3 : limites d'acceptabilité de la formule automate selon Ricos (21)

Pour la formule sanguine au microscope, un opérateur compte le plus souvent 100 (voir 200 cellules dans certaines situations). On ne peut donc pas attendre les mêmes limites d'acceptabilité de ces deux méthodes. Par opposition aux formules sanguines de l'automate, il n'existe pas, à ma connaissance, de consensus définissant les limites acceptables quant à la formule sanguine au microscope. Il s'agit donc de se fixer ses propres limites d'acceptabilité.

Ayant observé que « plus un évènement est rare, plus un CV élevé est acceptable » Rümke CL a établi un intervalle de confiance qui permet de poser des limites d'acceptabilité (18). Une extrapolation à tous les pourcentages a été établie (19). Appliqué à la cytologie hématologique, la table de Rümke fournit, pour une valeur de leucocyte donnée, l'intervalle toléré de la valeur de ces mêmes leucocytes observés au microscope (20) (annexe 13) selon : si 1 % d'un type cellulaire donné est effectivement présent sur le frottis, on obtiendra un compte au microscope (« intervalle de confiance ») :

- de 0 à 5 si on compte 100 cellules
- de 0 à 4 si on compte 200 cellules
- de 0 à 3 si on compte 500 cellules
- de 0 à 2 si on compte 1000 cellules
- de 0 à 1 si on compte 1000 cellules.

C'est cette table qui est généralement utilisée dans la littérature comme limite d'acceptabilité en cytologie pour la variabilité inter opérateur mais nous en discuterons ci-après.

- Pour la répétabilité : nous utiliserons comme limite acceptable :

$$CV \text{ rép lim} = 100 \times 1 / \sqrt{\text{valeur cible}} \quad (21)$$

- Pour la fidélité intermédiaire : $CV \text{ FI} = 1,33 \times 1 / \sqrt{\text{valeur cible}} \quad (21)$
- Pour la justesse et la variabilité inter-opérateur, nous pouvons donc utiliser la table extrapolée de Rümke mais nous allons essayer de suivre le SH GTA 04 pour essayer d'identifier d'autres choix possibles.
- L'exactitude sera évaluée à partir des rapports de participation aux EEQ selon leur interprétation (programme Biologie prospective) qui établit une limite acceptable pour un Z-score < 1.
- Une comparaison de méthode avec la formule sanguine rendue par l'automate est réalisée.

Voici ce qui a effectivement été réalisé :

Critère de performance	Support	Méthodologie	Evaluation	Choix des limites acceptables
Répétabilité	2 lames normales 1 opérateur	1x10 lectures 10 x1 lecture	CV	$100 \times 1 / \sqrt{\text{valeur cible}}$
Fidélité intermédiaire	2 lames normales, 4 opérateurs	1 lecture	CV	$1,33 \times 1 / \sqrt{\text{valeur cible}}$
Justesse inter-opérateur	10 lames normales, 4 opérateurs	1 lecture	Résultats « bruts »	Table de Rümke
			Z-score	Z-score < 2*
			biais par opérateur	?
Variabilité inter-opérateur	10 lames normales, 4 opérateurs	1 lecture	CV « opérateur »	CV de répétabilité
			CV « lame »	CV de répétabilité
			analyse de variance	F 5%(3;36)
Exactitude	EEQ	10 derniers EEQ	Z- score	Z-score < 1*
Comparaison de méthode	30 lames normales, 1 opérateur	microscope versus automate	droite de régression	discordants

Figure 4 Critères de performances évalués et limites acceptables utilisées

* : La justification de la valeur du choix du Z-score s'explique selon le niveau de confiance que l'on souhaite obtenir:

Z-Score (écarts types)	Valeur de p (probabilité)	Niveau de confiance
< -1,65 ou > +1,65	< 0,10	90%
< -1,96 ou > +1,96	< 0,05	95%
< -2,58 ou > +2,58	< 0,01	99%

Ainsi, il apparaît qu'en l'absence de consensus sur le sujet, on peut se fixer comme limite acceptable, le niveau de confiance que l'on souhaite.

2.2 Evaluation des performances de la méthode : vérification/validation de méthode

2.2.1 Analyse quantitative - cellules normales

Dans le but de vérifier à quel type de sous population leucocytaire pouvait s'appliquer la méthode quantitative, j'ai pris en compte toutes les sous populations leucocytaires dans un premier temps.

Répétabilité :

Définition : la répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les mêmes conditions, par un même opérateur et dans un délai le plus court possible afin de caractériser la meilleure performance possible. C'est le premier critère de performance à vérifier avant toute évaluation de méthode.

Méthode : La répétabilité a été évaluée à partir de 2 échantillons de 2 niveaux différents de GB pour lesquels j'ai (1 opérateur) effectué la formule sanguine au microscope sur 100 cellules

- sur un même frottis 10 fois
- sur 10 frottis issus d'un même échantillon 1 fois

Résultats :

		1 frottis / 10 lectures		10 frottis / 1 lecture		Valeur cible (automate)	CV lim (1/√val . cible)	CV limite Ricos
		Moyenne	CV (%)	Moyenne	CV (%)			
Lame 1 (GB = 7.7 G/L)	PN.N	49.5	9.1	49.6	6.4	51.3	14.0	6.4
	PN.Eo	3.1	23.8	2.9	25.4	4.2	48.8	7.9
	PN.Ba	1	81.6	1.2	86.1	0.5	141.4	10.5
	Ly	38.2	8.8	36.4	10.0	37	16.4	3.8
	Mo	8.3	27.3	9.9	30.3	7	37.8	6.7
Lame 2 (GB = 22.4 G/L)	PN.N	71.7	5.1	71.8	6.1	12.83	11.4	6.4
	PN.Eo	1.2	65.7	1.3	63.3	15.75	81.6	7.9
	PN.Ba	0.1	316.2	0.1	210.8	21.0	87.7	10.5
	Ly	19.1	15.5	18.7	21.7	7.65	28.2	3.8
	Mo	7.8	31.3	7.9	31.8	13.35	34.7	6.7

Figure 5 : Tableau récapitulatif des résultats de l'évaluation de répétabilité

En retenant comme limite d'acceptabilité $CV_{lim} = 100 \times 1 / \sqrt{\text{valeur cible}}$, on peut observer que les CV de répétabilité obtenus sont :

- inférieurs au CV limite calculé pour les PN.N, Ly et Mo
- inférieurs au CV limite calculé pour les PN.Eo et, pour les Ba, seulement dans un cas sur 2

On peut conclure que les données de répétabilité sont acceptables pour les PN.N, Ly, Mo et les Eo.

Tous les CV obtenus sont supérieurs au CV rép selon Ricos (sauf pour les PN.N dans 3 cas sur 4).

Fidélité intermédiaire :

Définition : la fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon en faisant varier au moins un facteur. Classiquement, elle est évaluée à partir des CIQ. Je choisis d'en évaluer une approche en faisant varier le facteur « opérateur » et en utilisant des échantillons normaux à défaut de CIQ.

Méthode : Une approche de la fidélité intermédiaire a été réalisée en effectuant le décompte de 100 cellules sur les frottis des deux échantillons précédemment utilisés par tous les opérateurs potentiels (susceptibles de réaliser une lecture de frottis sanguin au microscope) du laboratoire (n = 4).

Résultats :

		Moyenne	CV (%)	Valeur cible (automate)	CV lim (1,33 / $\sqrt{\text{valeur cible}}$)	Incertitude Ricos
Lame 1 (GB = 7.7 G/L)	PN.N	46.25	7.6	51.3	18.6	8.6
	PN.Eo	3	27.2	4.2	64.9	10.5
	PN.Ba	1	81.6	0.5	188.1	14
	Ly	41	8.9	37.0	21.9	5.1
	Mo	8.75	27.0	7.0	50.3	8.9
Lame 2 (GB = 22.4 G/L)	PN.N	70.75	6.3	76.3	15.2	8.6
	PN.Eo	2	40.8	1.5	108.6	10.5
	PN.Ba	0	/	1.3	116.6	14
	Ly	22.5	16.4	12.6	37.5	5.1
	Mo	4.75	20.2	8.3	46.2	8.9

Figure 6 : Tableau récapitulatif des résultats de l'évaluation de la fidélité intermédiaire

Comme précédemment :

- tous les CV obtenus sont nettement inférieurs aux CV limites, même pour les PN. Eo et Ba (quand ceux-ci ont pu être évalués, soit un cas sur 2).
- tous les CV obtenus sont supérieurs au CV rép selon Ricos sauf pour les PN.N.

Variabilité inter opérateur (Justesse et variabilité inter opérateur) :

Définition : la variabilité inter-opérateur constitue un indicateur de maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Elle doit être minimale pour que le résultat rendu ne soit pas « opérateur dépendant ». Appliquée à la formule sanguine au microscope, son importance est majeure.

La variabilité inter-opérateur peut être évaluée selon deux critères :

- la justesse inter-opérateur
- la variabilité inter-opérateur « proprement dite »

Approche de la justesse inter opérateur :

Méthode : La justesse inter opérateur a été évaluée à partir de 10 frottis normaux (nous ne disposons pas de CIQ externalisés), analysées par les 4 lecteurs.

Évalués selon la table de Rümke, les résultats sont satisfaisants.

Comme dans le SH GTA 04, on peut aussi choisir d'évaluer cette justesse par le Z-score : il s'agit d'une évaluation statistique qui quantifie la distance d'un point (x) à la moyenne (m) pondérée par son écart-type (ET) :

$$\text{Z-score} = (x - m) / \text{ET}$$

On peut considérer que cette moyenne est soit celle des n opérateurs, soit celle fournie par l'automate. Ainsi, on aura :

- le Z-score par rapport aux résultats de la formule automate
- le Z-score par rapport à la moyenne des lectures microscopiques des 4 opérateurs

Résultats :

Les résultats du Z-score inter lecteur peuvent se résumer à :

Z - score global par opérateur	Op1	Op2	Op3	Op4
par rapport à l'automate	1.41	1.20	1.30	1.36
par rapport à la moyenne des opérateurs	0.80	0.67	0.62	0.87

Figure 7 : Tableau récapitulatif de l'évaluation de la justesse inter opérateur par le Z-score

Si on considère comme limite d'acceptabilité selon l'exemple de l'annexe 2 du SH GTA04 :

$$| \text{Z-score} | < 2$$

les Z-scores calculés par opérateur sont acceptables c'est-à-dire que les opérateurs sont justes entre eux et par rapport à l'automate pour un niveau de confiance à 95%.

Le SH GTA 04 dit aussi : « La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire), établie avec des échantillons de CIQ, à la valeur cible attendue (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs, ou la valeur assignée), assimilée à la valeur « vraie » (v) de l'échantillon testé. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

$$\text{Biais (\%)} = 100 \times (m - v) / v$$

Ainsi, nous pouvons aussi considérer une approche du biais de justesse (puisque nous n'avons pas de CIQ) qui fournit, lui, la distance d'un point à la moyenne pondérée par cette moyenne.

Biais de justesse %	Op1	Op2	Op3	Op4
global / opérateur/ automate	50	42	43	48
global / opérateur/ moyenne des opérateurs	26	29	25	31

Figure 8 : Tableau récapitulatif de l'évaluation de la justesse inter opérateur par le biais de justesse

Ne disposant pas de valeur de biais limite acceptable pour conclure, on peut juste dire qu'ils varient entre : 25 et 50 (et 10 et 31% si on ne considère que « PN.N + Ly + Mo »), lorsque ce biais selon Ricos varie entre 9 et 20%. Se pose ici la question de la prise en compte ou non de l'ensemble des résultats : un biais global doit tenir compte des résultats des 5 sous populations cellulaires, or, les PN.Eo et Ba n'ont pas donné de résultats satisfaisants sur les critères précédents. Toutefois, s'agissant de pourcentages, on est devant des variables « liées » (i.e. « non indépendantes »).

Variabilité inter opérateur :

Méthode : La variabilité inter-opérateur consiste à évaluer les CV de chaque opérateur : selon le SH GTA 04, « Le laboratoire pourra utiliser la variabilité inter-opérateurs (CV) et la comparer à la variabilité intra-opérateur d'un référent. Un rapport proche de 1 montre la concordance obtenue pour n opérateurs (cf. robustesse - §10.11). ». C'est une « approche de la robustesse » qui « peut être une mesure de la reproductibilité des résultats obtenus dans des conditions opératoires normales, entre laboratoires, entre opérateurs, ..., comparée à la répétabilité de cette même procédure d'analyse appliquée dans des conditions opératoires de type répétabilité (même opérateur, même série). Plus le rapport entre ces deux expressions de la fidélité est proche de 1, plus la méthode sera robuste. »

Résultats :

En observant les résultats bruts (%) et en se reportant à la table de Rümke, ils sont acceptables.

CV	Op1	Op2	Op3	Op4	CV max répéta (Lame 1)
PN.N	14	21	19	24	9.1
PN.Eo	100	170	100	70	25.4
PN.Ba	NC	NC	NC	NC	86.1
Ly	20	34	34	41	10.0
Mo	70	40	40	50	30.3

Figure 9 : Evaluation de la variabilité inter opérateur par le CV « opérateur »

Si on se réfère à l'exemple de l'annexe 1 du SH GTA 04 qui donne comme critère d'interprétation pour la méthode au microscope :

CV < 30% pour PN.N et ly et CV < 50% pour Mo

Ces CV sont inférieurs aux CV limites acceptables et la variabilité inter opérateur est acceptable (sauf pour le premier lecteur avec les Mo). Par contre, si on se réfère au CV de répétabilité obtenu lors de l'essai de répétabilité (lame1), la variabilité inter opérateur n'est pas acceptable : rapport entre 2 et 4. J'ai donc voulu préciser la signification de cela et calculé le CV pour chaque frottis lu par les 4 opérateurs, pour chaque sous population leucocytaire quand cela était possible. Je les ai comparé, de la même manière, au CV (CVmax rép) obtenu sur la lame 1 de l'essai de répétabilité.

CV	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	CV max répéta (Lame 1)
PN.N	6.3	7.6	13.1	11.5	7.9	4.6	7.7	2.0	8.7	2.6	9.1
PN.Eo	40.8	200	100.7	0	158.7	36.9	200	55.9	42.6	81.6	25.4
PN.Ba	NC	NC	NC	NC	NC	200	NC	NC	200	NC	86.1
Ly	16.4	14.6	13.5	10.0	13.4	6.0	83.2	6.8	11.6	3.1	10.0
Mo	20.2	19.9	38.6	30.6	25.5	29.7	43.5	40.0	29.7	38.6	30.3

Figure 10 : Tableau récapitulatif de l'évaluation de la variabilité inter opérateur par le CV « lame »

On note des CV élevés pour la lame 7 principalement mais aussi pour les lames 3,4,8 et 10.

Ainsi, il n'est pas déraisonnable de penser qu'il y a une variabilité inter opérateur et une variabilité due au frottis lui-même (même si il s'agit d'échantillons normaux).

Aussi et à propos, toujours selon le SH GTA04 : « Une autre possibilité pour quantifier la variabilité inter-opérateur sera l'analyse de variance appliquée aux résultats obtenus par les n opérateurs ».

J'ai donc voulu évaluer la variabilité inter opérateur par une analyse de variance (dite « ANOVA ») à partir des mêmes résultats des 4 opérateurs pour les 10 frottis normaux précédemment utilisés. Celle-ci devrait permettre de dissocier la variabilité inter opérateur de la variabilité « inter frottis », ou, en termes statistiques, de vérifier leur indépendance.

	source de variation	somme des carrés des écarts	ddl	variance	Fcalc	F 5% (ddl 3;40)
PN.N	entre opérateurs	18.3	3	6.09	0,047	2,84
	entre frottis	4380.5	9	486.72	3,79	
	totale	5011.8	39	128.51		
Ly	entre opérateurs	-37202.3	3	-12400.8	-116.74	2,84
	entre frottis	3476.5	9	386.3	-0.03	
	totale	4142.8	39	106.2		
Mo	entre opérateurs	-1349.1	3	-449.7	-38.21	2,84
	entre frottis	324.7	9	36.1	3.07	
	totale	459	39	11.8		

Figure 11 : Evaluation de la variabilité inter opérateur par analyse de variance

Selon les résultats de l'analyse de variance, la variabilité inter opérateur est acceptable pour les PN N seulement et non acceptable à la fois pour les Ly et les Mo et il existe bien une variabilité « inter frottis » pour les PN.N et les Mo.

Exactitude :

Définition : L'exactitude est définie comme l'écart entre une valeur mesurée et la valeur vraie du mesurande.

Méthode : L'exactitude a été évaluée en analysant les résultats des EEQ (programme de Biologie Prospective) sur les 10 derniers EEQ (environ 12 mois). Celui-ci évalue les résultats par l'établissement du Z-score, représentant l'écart observé entre la valeur du laboratoire et la valeur cible. Le biais limite est donné sur les comptes-rendus de Biologie prospective (BP).

Résultats : Les résultats des EEQ peuvent se résumer selon:

EEQ	Nombre d'EEQ évalués/10	(Z score < 1)	(Acceptable selon Rümke)	Conclusion
PN.N	10	10	10	Conforme
PN.Eo	10	10	10	Conforme
PN.Ba	0	NC		NC
Ly	10	10	10	Conforme
Mo	10	10	10	Conforme

Figure 12 : Résumé de l'évaluation de l'exactitude

Ainsi, tous les EEQ sur une période d'un an sont conformes selon l'évaluation du programme de Biologie prospective.

Comparaison de méthode : corrélation microscope / automate :

Définition : La corrélation a été évaluée par la comparaison du décompte automate versus microscope de 30 formules d'échantillons normaux.

Méthode : La comparaison de méthode a été réalisée entre les résultats de la formule au microscope (y) et celle de l'automate (x).

Résultats : Le calcul du coefficient de corrélation n'a pas d'intérêt lorsqu'il s'agit d'une comparaison de méthode, il sera fourni à titre indicatif. L'équation de la droite de régression sera établie .

Paramètre	Nombre de mesures	Intervalle de comparaison (%)	Equation droite de régression	Coefficient de corrélation indicatif	Nombre de discordants
PN.N	30	42 - 75	$y = - 0.985 x + 0.463$	0.83	2
Ly	30	17 - 49	$y = 0.941x + 3.026$	0.86	2
Mo	30	2 - 18	$y = - 1.194 x - 1.39$	0.72	3

Figure 13 : Evaluation de la comparaison de méthode « formule au microscope versus formule automate »

Pour chaque sous population (PN N, Ly et Mo), les graphes représentant $y = f(x)$, les différences et les quotients sont présentés en annexe 14.

Dans les trois cas, les pentes sont globalement proches de 1, les coefficients de corrélations ne sont, comme attendu, pas satisfaisants et les discordants sont difficilement identifiables.

Enfin, les autres critères de performance seront pas traités puisque pas pertinents pour cette analyse.

Limite de détection : non applicable - Argumentaire de la conclusion : limite de détection non quantifiable sur une analyse microscopique

Interférences : non applicable – Argumentaire de la conclusion : Pas d'incidence sur l'aspect ou la quantification des cellules effectivement observées sur frottis.

Contamination : Non applicable car chaque prélèvement fait l'objet d'une analyse individuelle.

Robustesse et stabilité des réactifs : non applicable car pas d'incidence sur l'aspect ou la quantification des cellules observées.

Intervalles de référence : applicable – Ceux de la HAS.

2.2.2 **Analyse qualitative - cellules anormales et populations faiblement représentées**

Pour l'analyse de la recherche de cellules anormales, l'approche se doit qualitative, elle correspond au même modèle d'étude que celui des PN. Eo et Ba puisque leur présence en faible pourcentage ne permet pas une étude quantitative proprement dite.

La vérification de la présence et de la détection de cellules anormales est effectuée en participant aux EEQ et CQN puisque il n'y a pas de CIQ externalisés. Ce sont les participations aux EEQ et CQN qui permettent une évaluation de ces paramètres. Il existe aussi des moyens de tester ses compétences comme le site HEMATimage, les divers réseaux d'échange d'images, les confrontations inter-laboratoires

Incertitude/ facteurs de variabilité :

Le calcul de l'incertitude de mesure n'est pas pertinent pour cette méthode. Il s'agit d'une analyse de risque (détaillée précédemment), avec très principalement ici :

- Les risques d'ordre « technique » :
 - reconnaissance des alarmes et facteurs déclenchant la réalisation d'un frottis
 - réalisation d'un frottis de bonne qualité (étalement et coloration)
- Les risques d'ordre « méthodologique » :
 - bonne lecture du frottis (zone de lecture, échantillonnage suffisant)
 - bonne reconnaissance des types cellulaires.
- Les risques d'ordre « humain » :
 - identification des lames
 - erreur de saisie
 - formation, habilitation, maintien des compétences

Pour ce qui concerne la détection des cellules anormales, je n'ai eu à ma disposition qu'un CQN, le 15HEM02, un échantillon de LLC qui a été reconnu par les 3 opérateurs existants et la Biologiste titulaire. Durant ma mission, j'ai souhaité soumettre aux opérateurs les lames diagnostiquées pendant ma mission : une LAM, une LLC, un syndrome lymphoprolifératif, une hyperéosinophilie, une anomalie de l'hémoglobine avec un fort retentissement sur la morphologie des hématies.

J'ai aussi révisé le dictionnaire des commentaires de la formule sanguine dans un but d'harmonisation.

2.2.3 Analyse et interprétation des résultats du dossier de vérification de méthode :

2.2.3.1 Analyse quantitative :

Outre la difficulté à effectuer une analyse quantitative sur les PN.N, Ly, Mo et une analyse qualitative sur les autres paramètres, l'appréciation des performances de la méthode reste délicate.

Répétabilité : La limite acceptable « $1/\sqrt{\text{val. cible}}$ » donne des CV très élevés (par rapport à ceux de Ricos, par exemple). En choisissant cette limite acceptable, la méthode est répétable pour les PN.N, Ly et Mo, et même pour les PN.Eo. On peut toutefois se demander ce que représente un CV de 50 ou 80 % par exemple.

Ainsi, dans l'ordre d'acceptabilité des CV croissants, on a :

$$\text{« Ricos} < 1/\sqrt{\text{val. cible}} < \text{Rümke extrapolé} \text{ »}$$

Fidélité intermédiaire : La limite acceptable $1.33 \times 1/\sqrt{\text{val. cible}}$ donne une limite acceptable « encore plus large » que celle de la répétabilité. En choisissant cette limite acceptable, la méthode présente une fidélité intermédiaire acceptable pour les PNN, les Ly et Mo et même pour les PN Eo.

Ainsi, dans l'ordre d'acceptabilité des CV croissants, on aura de la même manière :

$$\text{« Ricos} < 1.33 \times 1/\sqrt{\text{val. cible}} < \text{Rümke extrapolé} \text{ »}$$

Justesse inter-opérateur : Son évaluation selon la table extrapolée de Rümke ou par le Z-score font que ce critère est acceptable. Par contre, si on calcul une approche du biais de justesse, on se heurte à plusieurs questions quant à son interprétation :

- je n'ai pas connaissance d'une limite d'acceptabilité reconnue pour le biais dans ce cadre précis, mais on peut se demander ce que représente un biais de 50%.
- je peux juste conclure que les résultats sont dispersés (rapport de l'ordre de 2) et supérieur au biais selon Ricos,

- j'observe qu'ils diffèrent si on prend en considération les pourcentages des seuls « PN.N +Ly+Mo » de l'ensemble des résultats (avec PN.Eo et Ba). Or, d'un côté, puisqu'il s'agit de pourcentages, on est dans le cadre statistique de variables « liées » (« non indépendantes »), de l'autre, la répétabilité n'étant pas vérifiée pour les PN. Ba et « peu interprétable » pour les PN.Ba, on ne peut pas les prendre en considération. Mais est-il juste de dissocier les données ?

Très schématiquement, on observe qu'en ne prenant pas en compte les PN.Eo et PN.Ba, le Z-score augmente et le biais diminue.

Une autre méthode aurait consisté en l'évaluation des valeurs absolues des sous populations leucocytaires mais, les frottis étant normaux (c'est-à-dire issus d'échantillons ayant un hémogramme normal), cela revient quasiment à utiliser la table de Rümke qui donne des fourchettes suffisamment « larges » pour conclure de la même façon à l'acceptabilité de cette justesse.

Aussi, le Z-score est utilisable pour des valeurs numériques et pas pour des pourcentages.

On peut avoir recours à la conclusion « pas d'incidence sur la décision / conclusion » pour valider ce critère mais, les lames étant normales, ce n'est précisément pas adapté. Une question compliquée se pose alors : à partir de quand aurait-on une incidence sur la décision ?

Enfin, on ne peut pas établir avec certitude un ordre d'acceptabilité croissant mais on peut très probablement considérer que:

« biais Ricos » < Z-score < 2 < Rümke extrapolé ».

Variabilité inter opérateur : Que ce soit par l'évaluation de ses CV ou par l'analyse de variance, les résultats ne sont statistiquement pas acceptables. Pourtant, si on se réfère à la table de Rümke, ils le sont.

On ne peut pas établir d'ordre d'acceptabilité croissant mais on peut probablement considérer que:

« CV Ricos » < CV de répétabilité < analyse de variance < Rümke.

L'analyse de variance est peut être le test qui rend le mieux compte des constatations faites au regard des résultats : il valide ce critère pour les seuls PN.N. Quand on sait que la difficulté la plus souvent observée pour certains opérateurs reste de différencier un lymphocyte et un monocyte, il semble probable que ce soit la plus grande source de variabilité inter opérateur.

Exactitude : Les rapports des EEQ sont très bons et la méthode présente une exactitude très acceptable selon le critère Z-score < 1.

Comparaison de méthode : Si on observe bien une tendance et des équations de droite de régression acceptables entre le résultat au microscope et celui de l'automate, cette comparaison est acceptable. Par contre, les coefficients de corrélation ne sont statistiquement pas satisfaisants. Quant aux « discordants », rien de « particulier » ne permet de les expliquer. On peut considérer qu'il s'agit d'écart acceptable selon Rümke.

En pratique puisque l'automate compte jusqu'à 10 000 cellules, s'il ne montre ni anomalie ni erreur sur ses cadrans de désignation des populations leucocytaires, on peut choisir de « rendre la formule automate » après vérification de celle-ci. Ainsi, le décompte de 100 cellules au microscope comparé à

celui d'un automate offre statistiquement une précision 10 fois moindre, c'est pourquoi le coefficient de corrélation n'est pas interprétable.

2.3.3.2 Analyse qualitative

Pour l'évaluation des critères qualitatifs, c'est bien sûr par la maîtrise des risques, avec, entre autres, la formation, l'habilitation et le maintien des compétences qu'ils peuvent être améliorés.

C'est par la participation aux EEQ et CQN qu'ils peuvent être évalués et ceux qui sont présentés étaient très satisfaisants. .

Enfin, rien n'a été dit sur les hématies et les plaquettes.

En résumé, je pense qu'en l'état, le dossier de vérification de méthode doit être amélioré et que les critères de performance à évaluer doivent être affinés et ré évalués.

3. Conclusion

L'accréditation des Laboratoires est, outre son caractère obligatoire et contraignant, un moyen très efficace d'œuvrer pour l'amélioration de la qualité des résultats en Biologie. Même si les besoins, les activités, les méthodes sont différentes d'une structure à l'autre, il est normal d'attendre les mêmes performances analytiques entre deux structures de Biologie. Pourtant, pour exemple, la qualité de la coloration de MGG est indirectement liée à la taille et à l'activité du Laboratoire qui ne dispose pas d'un grand choix de coloration en regard de ses besoins.

L'intérêt de l'approche processus permet de maîtriser tous les points qui s'articulent autour d'une activité de Biologie et c'est une réelle source d'amélioration en Biologie médicale.

Pour l'évaluation quantitative, d'un point de vue statistique, une des difficultés de l'évaluation de ces critères porte surtout sur le choix des critères d'acceptabilité : un juste milieu entre « Ricos » et « Rümke » devrait être envisagé et un consensus serait appréciable et rassurant sur ce point.

Une autre difficulté porte sur le choix des méthodes d'évaluation : statistiquement, on ne peut pas traiter des pourcentages indépendamment (comme des variables indépendantes) et exclure les populations faiblement représentées de l'analyse. Barnett l'avait déjà bien compris : dès 1932, à juste titre, il a soulevé la question de l'évaluation des pourcentages obtenus par l'analyse microscopique.

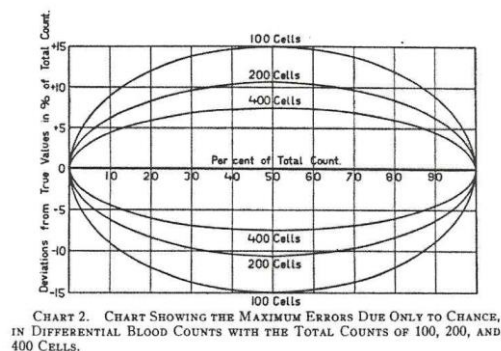


Figure 14 : Relation entre le nombre de cellules comptées et l'erreur maximale d'évaluation due au hasard selon Barnett (24)

Il envisage d'abord, sous l'angle statistique, le caractère « lié » de ces pourcentages et évalue l'erreur de quantification ('due au hasard') selon la représentation qui lie étroitement le pourcentage observé au nombre de cellules comptées.

Est-ce pour autant la réponse à apporter ? D'un point de vue statistique, c'est probablement la plus juste dans l'analyse de pourcentages. D'un point de vue pratique, la formule sanguine au microscope s'effectue usuellement sur 100 cellules (rarement 200) et il est peu probable que cela change.

Une troisième difficulté, et non des moindres, consiste en l'adaptation de tests statistiques à cette problématique : afin de traiter de la même manière toutes les sous populations leucocytaires, peut-on envisager des tests non paramétriques, d'autant qu'il semble peu probable que les échantillons pathologiques suivent une distribution normale ?

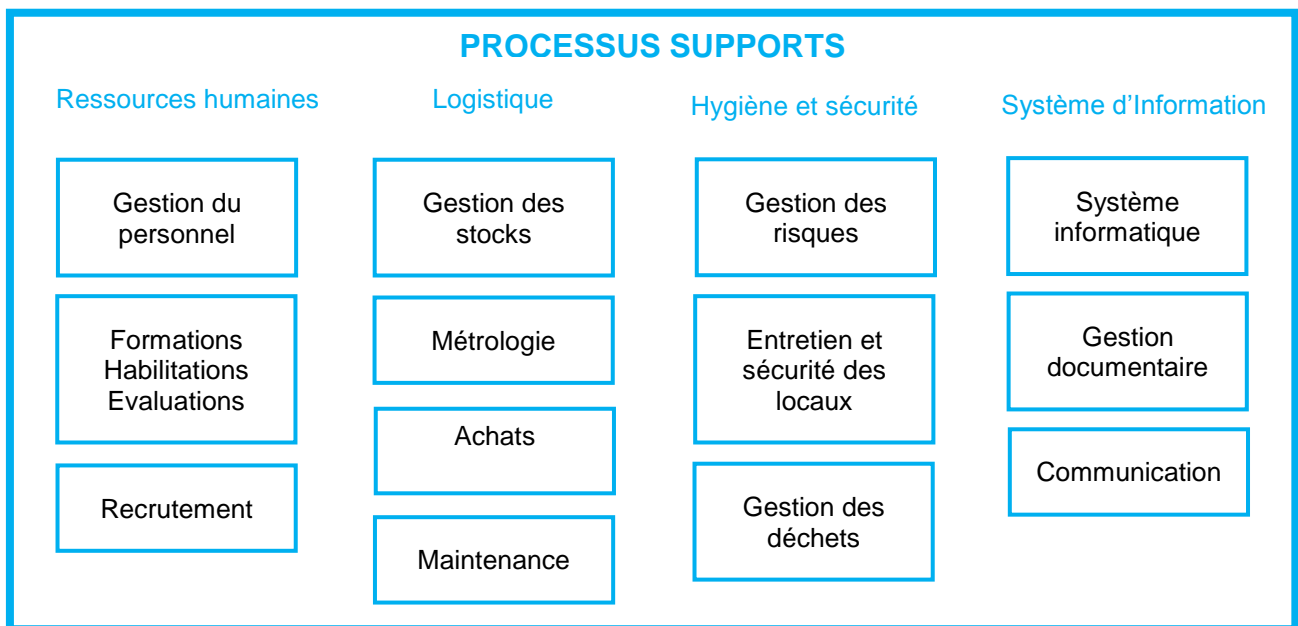
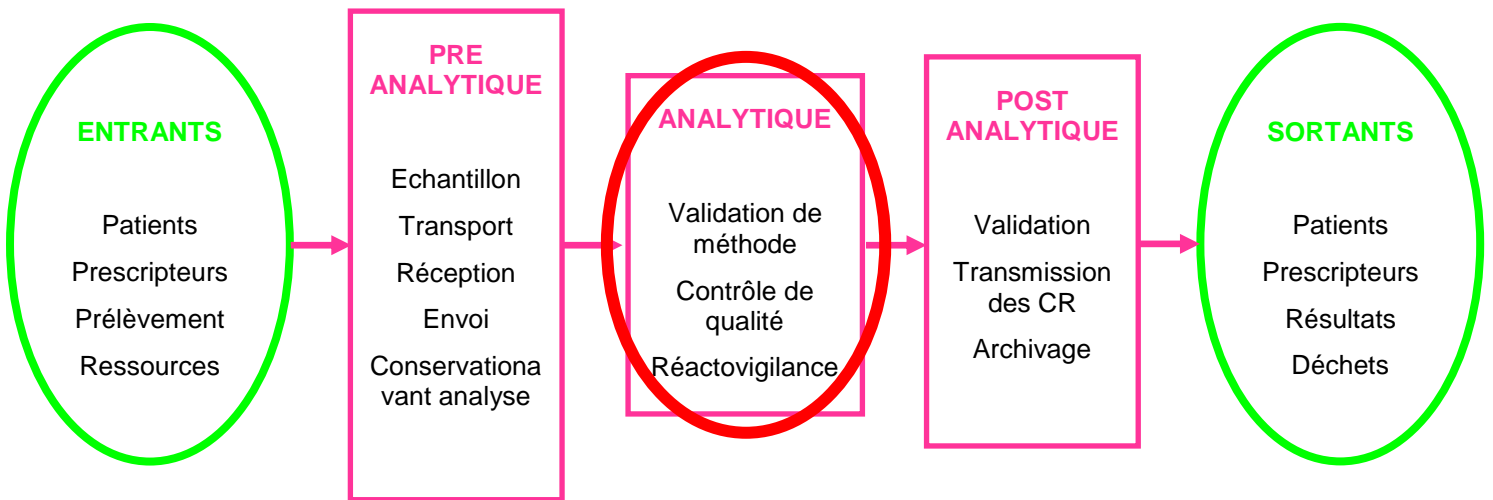
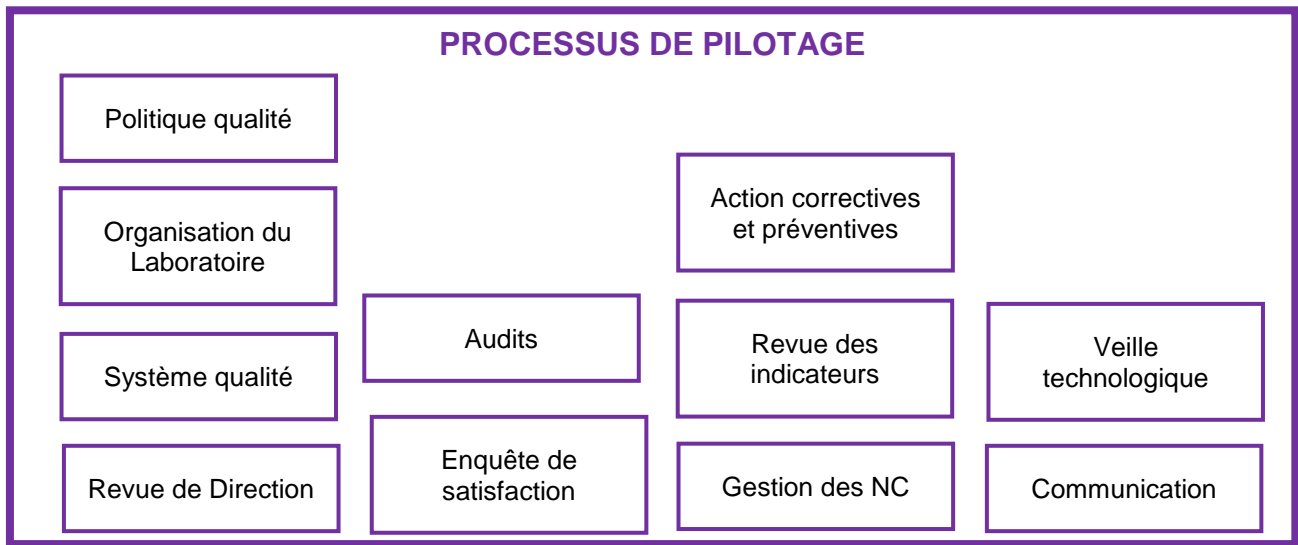
Aussi, le « découpage cellules normales / cellules anormales » est-il pertinent ? Pour l'évaluation d'une variabilité inter opérateur par exemple, un cas de LLC au diagnostic aurait probablement fourni de meilleurs résultats qu'un échantillon normal.

L'évaluation sur le mode qualitatif est, elle aussi, délicate et, par essence, incomplète. Toutefois, elle permet de bien analyser la maîtrise des risques et d'insister sur l'habilitation du personnel. La difficulté de la cytologie est la reconnaissance d'évènements rares, qui dépendent notamment de paramètres techniques comme la coloration, l'échantillonnage, mais aussi d'une solide formation en cytologie et d'un entretien de celle-ci. Ainsi, lorsque l'analyse de variance montre que la variabilité inter opérateur n'est acceptable que pour les seuls PN.N, elle traduit sans doute une vérité simple : la difficulté de différencier certains lymphocytes des monocytes, qui plus est, dans des conditions de coloration peu satisfaisantes, sachant que l'autre grande question de cytologie « différencier lymphocytes et blastes » n'est pas abordée. D'un point de vue pratique, c'est pourtant bien cela qui prime.

Ce mémoire n'aboutit pas selon moi, à un dossier en l'état d'être soumis. Il m'a néanmoins permis de décrire les actions menées et à mener, de poser des questions liées à l'amélioration de la qualité et à l'harmonisation des pratiques, sujet qui, appliqué à la cytologie, m'a toujours intéressée.

Ainsi, même en portée flexible, le dossier de vérification de méthode est assez complet pour mettre en exergue les points forts et les points faibles d'une méthode. Il doit aussi permettre, si ce n'est une harmonisation et une homogénéisation des pratiques, tout au moins des résultats, une problématique bien ancienne et non encore résolue en cytologie hématologique.

ANNEXE 1 : Processus « cœur du métier »



D'après. Vaubourdolle M. (15)

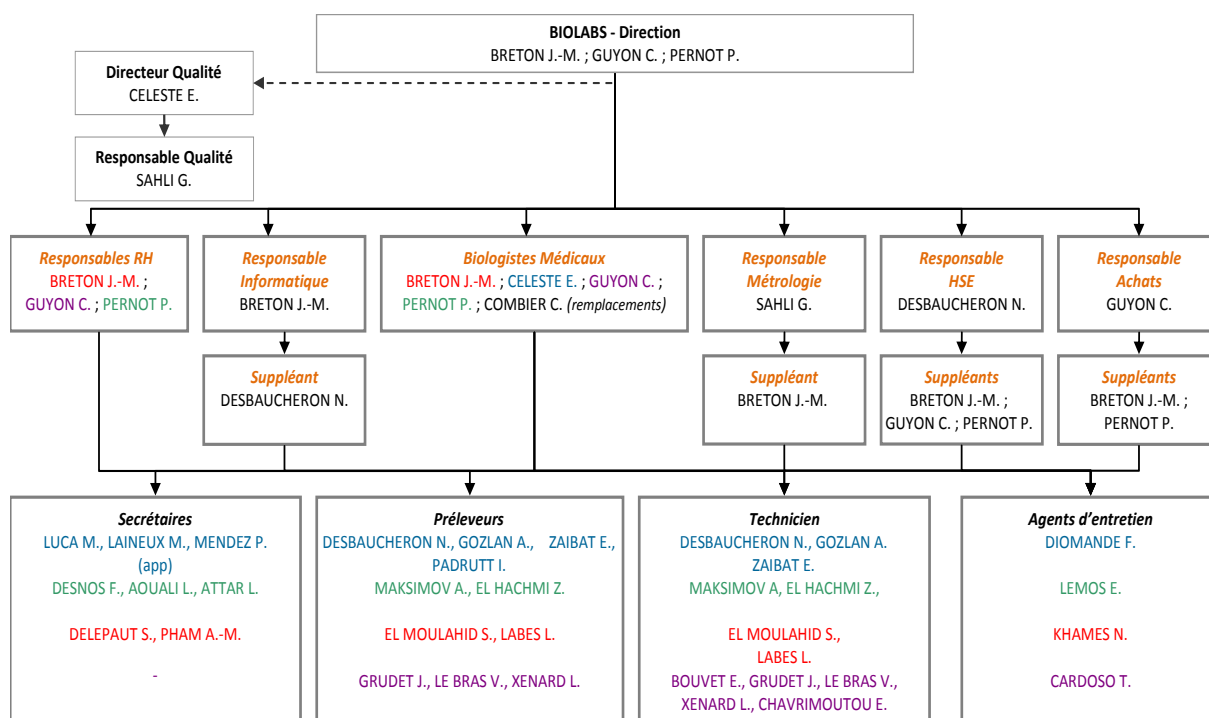
ANNEXE 2 : Tableau résumé des performances à évaluer

lors d'une vérification de méthode

Critères à évaluer	Vérification (portée A)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et reproductibilité)	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
Justesse/exactitude (approche)	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
Incertitude / facteurs de variabilité et évaluation	<i>Essai</i>	<i>Maîtrise des facteurs de variabilité</i>
Comparaison de méthode avec automate, inter-opérateur et analyse des discordances	<i>Essai</i>	/
Intervalle de mesure	<i>Bibliographie</i>	NA
Interférences (médicaments, ...)	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>
Contamination	<i>Bibliographie</i>	NA
Robustesse	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>
Stabilité réactifs	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>
Limite de détection	/	<i>Bibliographie</i>
Spécificité/sensibilité analytique	/	<i>Bibliographie</i>

Selon SH GTA 04

ANNEXE 3 : Organigramme du LBM Biolabs



LBM Dupont des Loges
 LBM Grande Armée
 LBM Lauriston
 LBM du Luxembourg

ANNEXE 4 : Portées types par sous famille

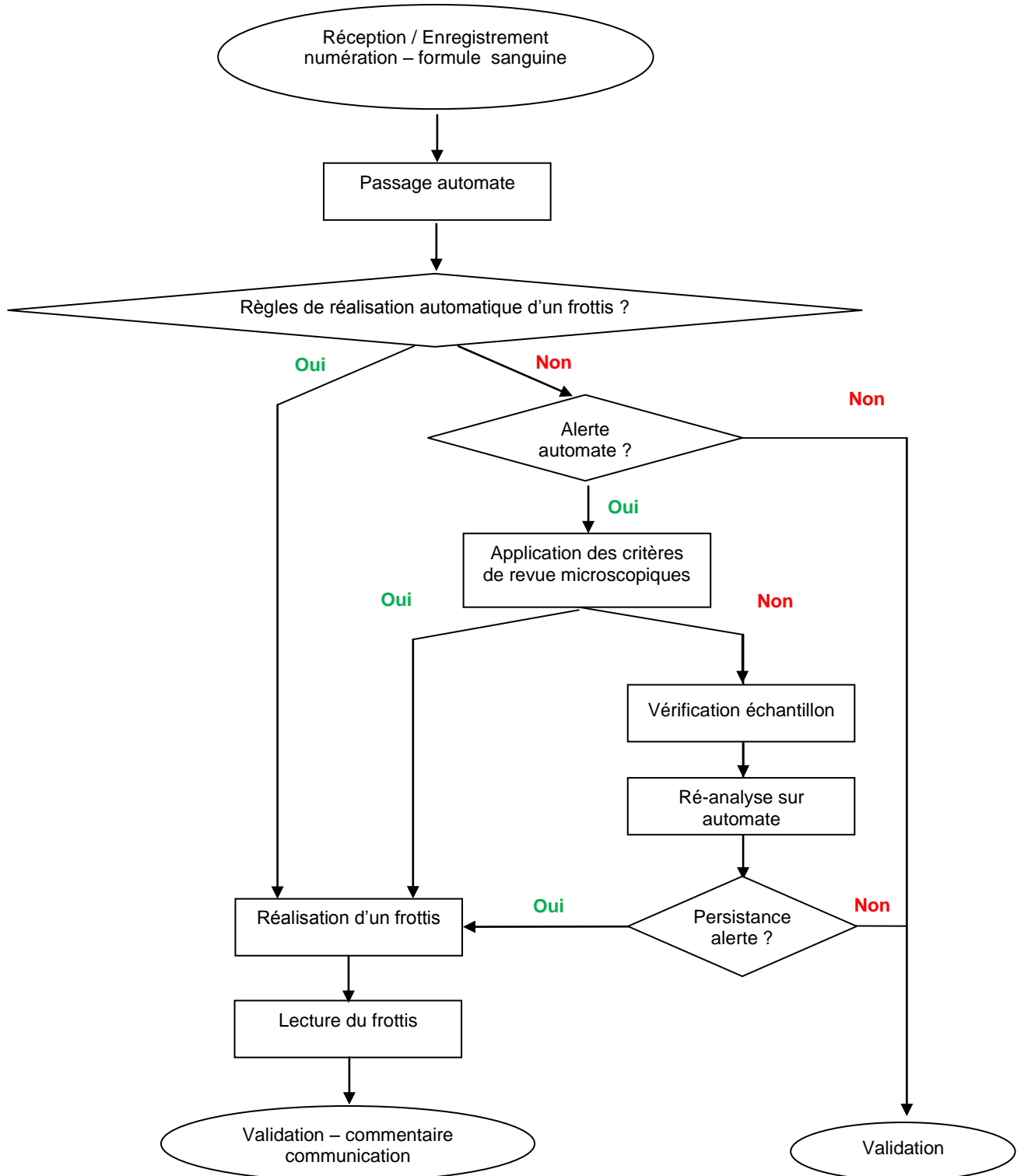
Domaine : Biologie médicale - Sous-domaine : Hématologie –

Sous-famille : Hématocytologie (HEMATOBM)

<u>Code</u>	<u>Nature de l'échantillon biologique</u>	<u>Nature de l'examen/analyse</u>	<u>Principe de la méthode</u>	<u>Référence de la méthode</u>	<u>Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)</u>
<u>HB1</u>	Liquides biologiques d'origine humaine	Hémogramme (Numération-formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés)	<p>Méthode de type qualitatif et/ou quantitatif</p> <p>Principe général des techniques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Impédancemétrie, - Cytométrie en flux, - Cytochimie, - Spectrophotométrie, - Fluorescence, - Radiofréquence, - Calcul <p>- Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique</p>	Méthodes reconnues (A)	

selon SH INF 50

ANNEXE 5 : Logigramme de révision de la formule sanguine au microscope



ANNEXE 6 : Fiche d'instruction décrivant les principes de réalisation d'un frottis sanguin

1. Objet et domaine d'application

Cette fiche d'instruction décrit les principes de réalisation d'un frottis sanguin. Elle s'applique aux analyses d'hématologie nécessitant un contrôle par l'étalement d'une lame, ainsi qu'aux recherches de parasites sanguins.

2. Documents associés

D2 - PR 01 « Validation analytique »

D3 - MO 23 « Utilisation de l'appareil - Penta XLR »

3. Responsabilités

Le technicien est responsable de la préparation des lames. Seules les personnes habilitées sont autorisées à lire les lames.

4. Déroulement de l'activité

4.1. Intérêt

Le frottis sanguin se réalise :

- suite à un résultat douteux donné par l'automate ou à une alarme concernant une anomalie de la formule, de morphologie des hématies, une suspicion d'agglutinines froides ; une suspicion d'agrégats plaquettaires.
- et dans tous les cas de recherche de parasites sanguins (plasmodium, microfilaire, trypanosome, etc.)

4.2. Matériel – Réactifs

- Lames, lamelles,
- Kit de coloration rapide des frottis sanguins,
- Microscope,
- Huile à immersion.

4.3. Echantillons utilisés

- Sang total EDTA

4.4. Prétraitement

Homogénéiser le tube par retournements.

4.5. Réalisation

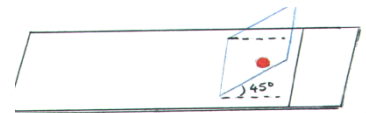
Pour obtenir un frottis très mince, il faut une lamelle mince, un angle faible inférieur à 45° et un étalement lent. (Remarque : en cas d'anémie, le frottis est plus prolongé qu'avec un sang normal. Pour avoir un frottis plus dense, il faut un mouvement plus rapide de la lamelle).



- Déposer une petite goutte de sang d'environ 1 à 3 μl avec une pipette pasteur de préférence bien effilée

Si la pipette n'est pas assez effilée l'incliner presque horizontalement pour déposer une petite goutte de sang

- Poser le petit bord de la lame au contact de la lame à gauche de la goutte de sang, l'angle formé à droite étant de 45° environ : plus l'angle est petit, plus le frottis est mince. Maintenir cet angle et ce contact avec une légère pression jusqu'à la fin de l'opération. (Inverser pour les gauchers)



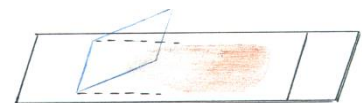
- Faire glisser la lame vers la goutte de sang : à son contact il va se répartir régulièrement par capillarité le long du bord de la lamelle en quelques secondes.



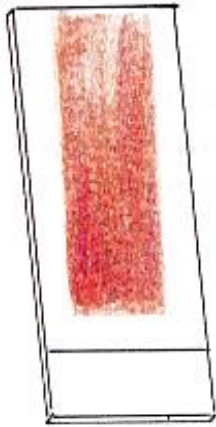
- Faire glisser alors la lame vers la gauche, jusqu'au bout, d'un mouvement assez lent et régulier en maintenant le contact et la pression nécessaire pour que le sang s'étale en une couche mince uniforme derrière la lame.



Un bon frottis doit être contenu entièrement sur la lame, bords et franges compris.

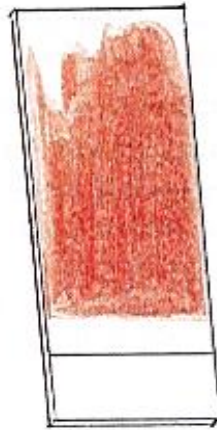


- Ne pas sécher le frottis pour les formules sanguines ; on peut sécher pour les recherches de paludisme en agitant la lame.
- Inscrire le nom et le numéro du dossier patient sur la lame.



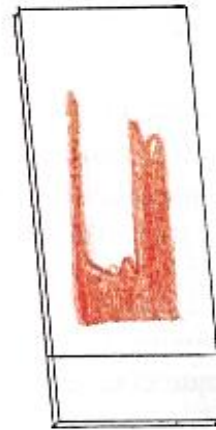
Frottis trop long
et trop épais

*Goutte de sang
trop grosse*



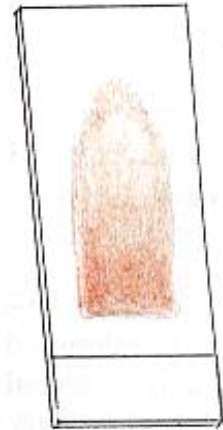
Frottis trop long
et trop épais

*Goutte de sang trop
grosse et lamelle trop
large*



Frottis trop effiloché
Mauvais contact

*de la lamelle
sur la lame*



Bon frottis

4.6. Coloration des lames

- Tremper la lame 5 fois 1 seconde dans le colorant 1 en essuyant l'excédent de façon intermédiaire avec du papier absorbant,
- Tremper la lame 5 fois 1 seconde dans le colorant 2 en essuyant l'excédent de façon intermédiaire avec du papier absorbant,
- Tremper la lame 5 fois 1 seconde dans le colorant 3,
- Rincer à l'eau et laisser sécher la lame à l'air libre.

4.7. Lecture au microscope

Une fois la lame sèche, le biologiste ou le technicien d'hématologie réalise un comptage visuel. Les annotations sont retranscrites sur la feuille de résultats de l'automate puis dans le système informatique du laboratoire. Le résultat rendu correspond à celui de la lecture microscopique.

Pour les recherches de parasites, il faut d'abord explorer la lame au faible grossissement, puis à l'objectif à immersion.

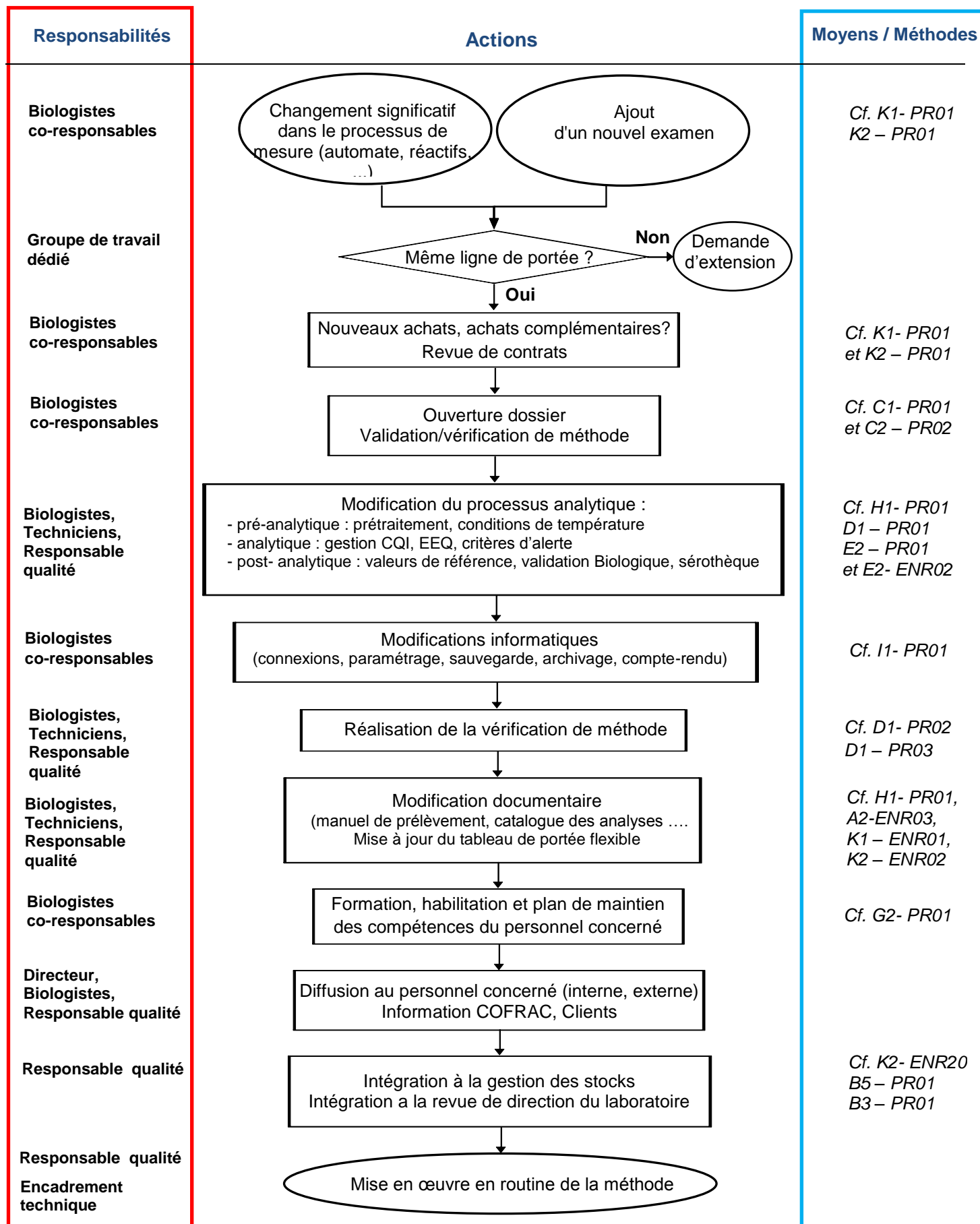
5. Classement et archivage

Documents introduits par la fiche d'instruction :

- Les feuilles de résultats de l'automate,
- Les feuilles de paillasse du poste parasitologie.

Les règles de classement et d'archivage sont décrites dans la procédure H2 - PR 02 « Gestion des enregistrements et archivage ».

ANNEXE 7 : Logigramme de portée flexible



ANNEXE 8 : Procédure de gestion de portée flexible

Actions	Responsable	Délai	Vérification de réalisation (Date et Visa)
ACHAT			
Achats des équipements nécessaires (les citer) : 1) lames 2) kit de coloration 3) huile à immersion			
Etablissement du cahier des charges et étude de faisabilité (dimension des locaux, élimination des déchets...)	NA		
MATERIEL ET REACTIF			
Enregistrement du matériel, des réactifs et des consommables sur le système de gestion des stocks	NA		
VERIFICATION DE METHODE			
Etude d'impact suite à un changement de version d'une fiche technique	NA		
Etude bibliographie			
Analyse de risque			
Test de répétabilité, reproductibilité, justesse selon procédure			
Traitement des données et conclusion sur la conformité			
Analyse des discordances			
Calcul des valeurs cibles du CIQ (quand nécessaire)			
Estimation des incertitudes			
VALEURS DE REFERENCE			
Mise à jour des valeurs de référence			
Mise à jour des CR de résultats et des critères d'alerte			
FORMATION ET COMPETENCES			
Besoins en formation :			
Planification et réalisation des formations et habilitations			
Choix des référents (suppléants)			
Mise à jour des dossiers du personnel			
INFORMATIQUE			
Paramétrage informatique	NA		
Connexion automate/SIL	NA		
Paramétrage des analyses dans le SIL			
Vérification de la transmission des données	NA		
Vérification des formules			
Vérification des feuilles de travail	NA		
Vérification des CR informatique et papier			
DOCUMENTATION QUALITE			
Mise à jour de la documentation qualité interne et externe			

Actions	Responsable	Délai	Vérification de réalisation (Date et Visa)
PHASE PREANALYTIQUE			
Changements de la phase pré analytique (à préciser) :	NA		
Révision des instructions relatives au prélèvement (tubes, stabilité, interférences...)	NA		
Mise à jour du manuel de prélèvement	NA		
Diffusion des changements en internes et externes	NA		

PHASE ANALYTIQUE			
Changements de la phase analytique (à préciser) :			
Rédaction des procédures techniques et des modes opératoires d'utilisation, de maintenance, de mode dégradé, de gestion des CIQ/EEQ, des calibrations et des critères de repasse			
CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES			
Identification et application des nouvelles conditions environnementales (t°, hygrométrie, emplacement, activité isolée...)			
BESOINS METROLOGIQUES			
Nouvelles exigences :	NA		
Application des nouvelles exigences (raccordement COFRAC...)			
VALIDATION BIOLOGIQUE			
Actions à réaliser et document(s) à modifier en matière de validation biologique :			
PHASE POST-ANALYTIQUE			
Modifications des conditions de conservation post-analytiques			
Modifications des CR (technique, automate, valeurs de référence, bornes et validation)			
CQI & EEQ			
Définition de la stratégie de passage des CIQ			
Choix des types de CQ (CIQ, CIQ externalisés...)			
Inscription au programme de CIQ externalisés			
Abonnement à un EEQ et inscription au CQN			
Paramétrage des CIQ dans le logiciel associé			
Paramétrage des CEQ dans le logiciel de gestion de la qualité			
ORGANISATION DE LA PERIODE DE MISE EN SERVICE			
Planification des installations	NA		
Possibilité d'utilisation d'un équipement de référence en parallèle et modalités de fonctionnement			
Si non envisageable : modalités de gestion de la routine et des urgences pendant la période de qualification/formation			
Durée de réalisation des tests de répétabilité, reproductibilité, etc....			

Actions	Responsable	Délai	Vérification de réalisation (Date et Visa)
Durées des formations sur site			
Moyens techniques et humains mis en place par le fournisseur	NA		
Moyens techniques et humains mis en place sur le plateau technique			
Information des clients (Patients, prescripteurs, correspondants...)	NA		
MISE EN SERVICE			
Gestion des commandes, mise en place éventuel d'un abonnement			
Exercices de traçabilité			
REVUE DE CONTRAT			
Contrats à modifier ou à créer :			
Diffusion des changements aux clients et signature d'avenant éventuel	NA		
AUTRE			
Mise à jour de la liste détaillée des analyses et des tableaux de portée d'accréditation COFRAC			
Envoi des informations nécessaires au COFRAC			
Communication aux clients	NA		
Intégration à la revue de direction			
Intégration au programme d'audits internes			

ANNEXE 9 : Fiche d'habilitation du personnel technique

G1-ENR12-02	V. 1 indice 1	Fiche d'habilitation - Hématologie	<i>Rédacteur L.Benattar</i>		<i>Valideur</i>	<i>Approbateur</i>		
				<i>Date de mise en application :</i>				
Paillasse / Cyto-hématologie			NOM - Prénom					
Niveau d'habilitatio n	Tache	Objectif de la formation	Critère d'habilitation	Période de formation	Satisfaisant A compléter	Date & visa personnel	Visa Formateur	Visa Biologiste (<i>si niveau partiel</i>)
1	Analyse des échantillons	Interpréter messages d'erreur, d'alerte, critères de ré-analyse, interprétation des graphes et des alarmes automate Savoir reconnaître un résultat critique, une alarme pour prévenir le formateur.	50 échantillons analysés sans problème.					
	Validation analytique	Savoir interpréter les scattergrammes Critère de validation d'une numération Connaître les alarmes analytiques Critère de déclenchement d'un frottis Validation technique sur Alysée Assimilation notion d'urgence CAT devant un résultat pathologique / critique	Sur 10 jours : - les échantillons devant être repassés l'ont été, - les résultats devant être communiqués l'ont été. - les lames ont bien été faites quand nécessaires					
	Réalisation de frottis sanguins	Savoir faire des lames correctes	Avoir fait 20 frottis correctement.					
	Réalisation de la	Savoir colorer des lames	20 frottis					

	coloration de May Grunwald Giemsa		colorés. Contrôle macroscopique					
Niveau d'habilitation	Tache	Objectif de la formation	Critère d'habilitation	Période de formation	S / AC	Date & visa personnel	Visa Formateur	Visa Biologiste (si niveau partiel)
2	Utilisation et entretien du microscope	Entretien et réglage du microscope						
	Lecture d'une lame de contrôle de la coloration	Vérifier la qualité de la coloration	Avoir coloré 10 frottis correctement.					
	Observation d'un frottis: recommandations	Zone de lecture, appréciation étalement, coloration, richesses	Observer au moins 10 lames					
	Lecture de frottis normaux (adulte, enfants)	Identification et comptage des types cellulaires, reconnaissance des cellules normales	50 échantillons sans alarme					
	Anomalie des hématies	Savoir repérer des hématies anormales, comptage schizocytes, identification des érythroblastes	A partir des lames d'archive et/ou de routine, au moins 10 lames pour type d'anomalie					
	Anomalie des plaquettes	Amas, macroplaquettes						
	Anomalie des PN.N	Dégranulés/hypergranuleux, pseudo-Pelger, myélémie						
	Anomalie des Ly	Lymphocytes activés, anormaux, plasmocytes, ombres de Gumprecht						
	Reconnaissance des cellules anormales	Blastes / pas blastes						

ANNEXE 10 : Fiche de maintien des compétences du personnel technique

G1-ENR12-01	V. 4 indice 1	Fiche de maintien d'habilitation - Hématologie	Rédacteur L.Benattar	Valideur	Approbateur
Paillasse / Cyto-hématologie			<i>Date de mise en application :</i>		
			NOM - Prénom		

Niveau de maintien	Tache	Objectif de la formation	Critère d'habilitation	Période de formation	Date & visa personnel	Visa Responsable
1	EEQ	Réf	3 derniers			
		Date de lecture				
		Formule correcte				
		Conclusion				
		Notation				
2	Programme de formation	E-learning				
		Autre				
3	Activité	Occupation du poste de cytologie sur les 12 derniers mois				

niveau de maintien	Etat	Date	Visa Biologiste
1	Partiel Total		
2	Partiel Total		
3	Partiel Total		

ANNEXE 11: Fiche d'habilitation du Biologiste Remplaçant

G1-ENRXX		V. XX indice 1	Fiche d'habilitation Biologiste Remplaçant - Hématologie	Rédacteur L.Benattar	Valideur	Approbateur
				<i>Date de mise en application :</i>		
Paillasse / Hématocytologie			NOM - Prénom			
Niveau	Tache	Objectif de la formation	Critère d'habilitation	Date & visa personnel	Visa Biologiste (si niveau partiel)	
Habilitation niveau 3	Reconnaissance des cellules anormales	blastés / pas blastés	Questionnaire et/ou lames test			
	Anomalie des hématies	vocabulaire				
	Anomalie des plaquettes	vérification				
	Anomalie des PN.N	quantification myélémie, SMP vs réactionnel				
	Anomalie des Ly	SLP				
	Participation au SMQ	Documentation qualité spécifique du secteur				
Maintien des compétences	EEQ	Réf	2 dernières participations			
		Date de lecture				
		Formule correcte				
		Conclusion				
		Notation				
et Activité	Programme de formation	E-learning				
		Autre				
	Activité diagnostic des 12 derniers mois	sang	Hématologie générale/ spécialisée?			
moelle, autre						
pathologies rencontrées						

ANNEXE 12 : Tableau récapitulatif des actions menées

Actions	Pertinence	Réalisation
MATERIEL ET REACTIF	non	/
VERIFICATION DE METHODE	oui	réalisation
VALEURS DE REFERENCE	oui	révision
FORMATION ET COMPETENCES	oui	propositions
INFORMATIQUE	oui	propositions
DOCUMENTATION QUALITE	oui	propositions
PHASE PREANALYTIQUE	oui	propositions
ACHAT	non	propositions
CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	non	propositions
BESOINS METROLOGIQUES	non	/
VALIDATION BIOLOGIQUE	oui	propositions
PHASE POST-ANALYTIQUE	oui	propositions
CQI & EEQ	oui	révision
ORGANISATION DE LA PERIODE DE MISE EN SERVICE	non	/
MISE EN SERVICE	non	/
REVUE DE CONTRAT	non	/
AUTRE (COFRAC, revue de Direction, audits internes)	oui	non réalisée

ANNEXE 13 : Tables de Rümke

	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1000	n = 10000
0	0 – 3.6	0 – 1.8	0 – 0.7	0 – 0.4	0 – 0.1
1	0 – 5.4	0.1 – 3.6	0.3 – 2.3	0.5 – 1.8	0.8 – 1.3
5	1.6 – 11.3	2.4 – 9.0	3.3 – 7.3	3.7 – 6.5	4.5 – 5.5
10	4.9 – 17.6	6.2 – 15.0	7.5 – 13.0	8.2 – 12.0	9.4 – 10.7
15	8.6 – 23.5	10.4 – 20.7	12.0 – 18.4	12.8 – 17.4	14.3 – 15.8
20	12.7 – 29.2	14.7 – 26.2	16.6 – 23.8	17.6 – 22.6	19.2 – 20.8
30	21.2 – 40.0	23.7 – 36.9	26.0 – 34.2	27.2 – 32.9	29.1 – 31.0
40	30.3 – 50.3	33.2 – 47.1	35.7 – 44.4	36.9 – 43.1	39.0 – 41.0
50	39.8 – 60.2	42.9 – 57.1	45.5 – 54.5	46.9 – 53.1	49.0 – 51.0
70	60.0 – 78.8	63.1 – 76.3	65.8 – 74.0	67.1 – 72.8	69.0 – 70.9
80	70.8 – 87.3	73.8 – 85.3	76.2 – 83.4	77.4 – 82.4	79.2 – 80.0
90	82.4 – 95.1	85.0 – 93.8	87.0 – 92.5	88.0 – 91.8	89.3 – 90.6
100	96.4 - 100	98.2 - 100	99.3 - 100	99.6 - 100	99.9 - 100

Table de Rümke (19)

% vrai	Cell comptées	
	Lim inf	Lim sup
0	0	3.6
1	0	5.3
2	0.3	7.1
3	0.7	8.6
4	1.1	10
5	1.6	11.4
6	2.2	12.6
7	2.8	13.9
8	3.4	15.1
9	4.1	16.3
10	4.7	17.5
11	5.4	18.7
12	6.1	19.8
13	6.9	21
14	7.6	22.1
15	8.4	23.2
16	9.2	24.4
17	10	25.5
18	10.8	26.6
19	11.6	27.7
20	12.4	28.8
21	13.2	29.9
22	14.1	32.1
23	14.9	32.1
24	15.8	33.2

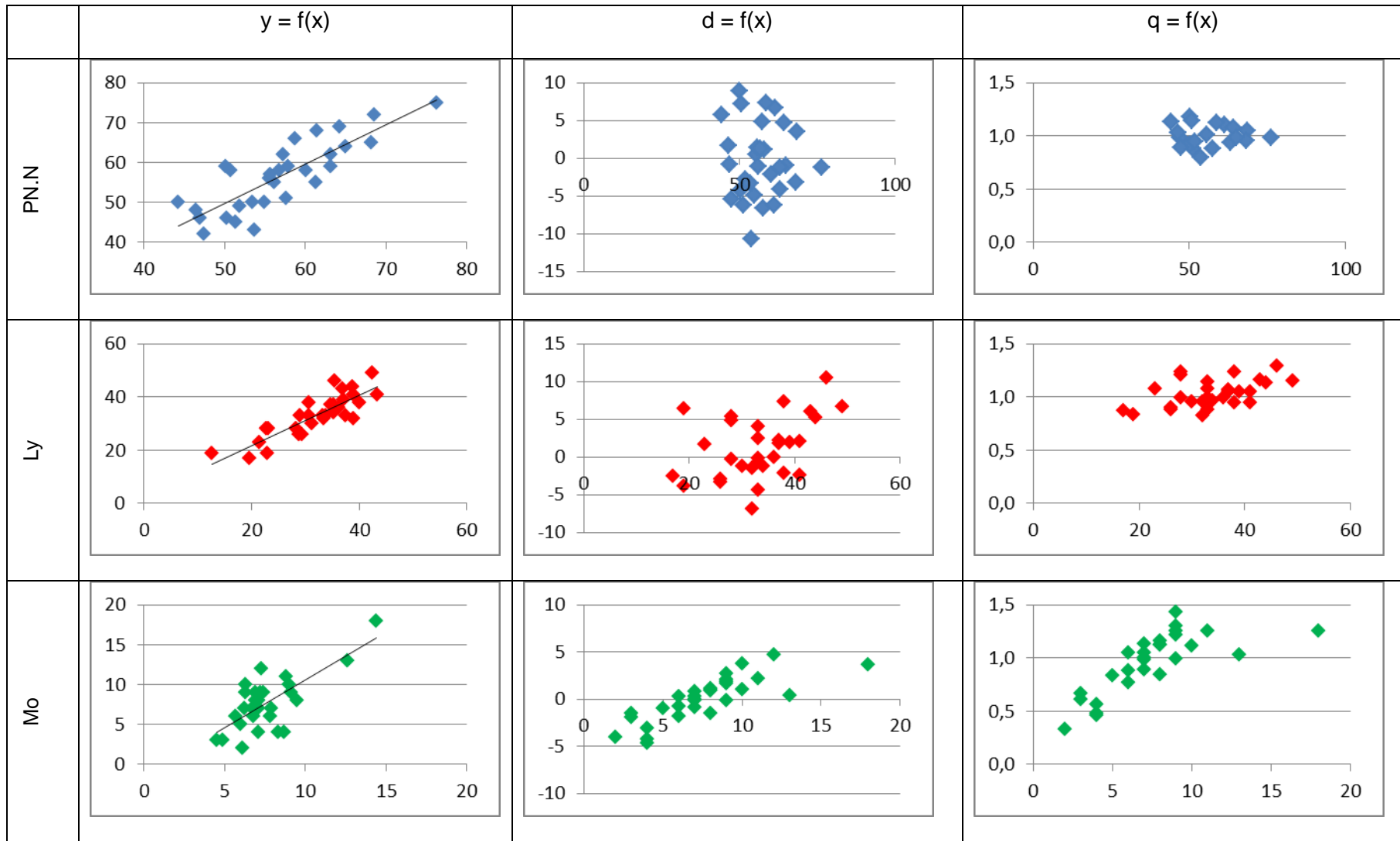
% vrai	Cell comptées	
	Lim inf	Lim sup
26	17.6	35.4
27	18.5	36.5
28	19.4	37.6
29	20.3	38.6
30	21.2	39.7
31	22.1	40.8
32	23	41.9
33	24	42.9
34	24.9	44
35	25.9	45.1
36	26.8	46.1
37	27.8	47.2
38	28.7	48.3
39	29.7	49.3
40	30.7	50.4
41	31.7	51.5
42	32.6	53.6
43	33.6	53.6
44	34.6	54.6
45	35.6	55.7
46	36.6	56.8
47	37.7	57.8
48	38.7	58.9
49	39.7	59.9
50	40.9	61

% vrai	Cell comptées	
	Lim inf	Lim sup
51	41.7	62
52	42.8	63.1
53	43.8	64.1
54	44.8	65.2
55	45.9	66.2
56	46.9	67.3
57	48	68.3
58	49	69.4
59	50.1	70.4
60	51.2	72.5
61	52.2	71.5
62	53.3	73.5
63	54.4	74.6
64	55.5	75.6
65	56.5	76.7
66	57.6	77.7
67	58.7	78.8
68	59.8	79.8
69	60.9	80.8
70	62	81.9
71	63.1	82.9
72	64.2	84
73	65.3	85
74	66.4	86
75	67.5	87.1

% vrai	Cell comptées	
	Lim inf	Lim sup
76	68.6	88.1
77	69.7	89.1
78	70.8	90.2
79	72	91.2
80	73.1	92.3
81	74.2	93.5
82	75.3	94.5
83	76.5	95.4
84	77.6	96.4
85	78.7	97.4
86	79.9	98.5
87	81	99.5
88	82.2	100
89	83.3	100
90	84.5	100
91	85.6	100
92	86.8	100
93	87.9	100
94	89.1	100
95	90.2	100
96	91.4	100
97	92.6	100
98	93.7	100
99	94.9	100
100	96.1	100

Table de Rümke extrapolée (20)

ANNEXE 14 : Présentation graphique de l'évaluation de la comparaison de méthode



BIBLIOGRAPHIE

- 1 L'œil de Leeuwenhoek et l'invention de la microscopie. Boutibonnes.P. *Alliage* 1999, 39 : 58-66
- 2 Malpighi and the discovery of capillaries. Pearce JMS. *Eur Neurol* 2007, 58, p. 253–255
- 3 William Hewson (1739-1774): the father of haematology » *British Journal of Haematology*,ol 133, Issue 4, May 2006 p 375–381
- 4 Leçons sur les maladies du sang, Hayem G. Masson (Paris), 1900
- 5 Le sang et les maladies du sang. Adaptation française de l'atlas des maladies du sang de Schleip – Champy C – Ed by Le François P.1913
- 6 Studies on leucocyte granules after staining with sudan black B and May-Grünwald Giemsa.BAILLIF RN, KIMBROUGH C.J *Lab Clin Med.* 1947 Feb;32(2):155-66.
- 7 On the nature of Romanowsky--Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. *Histochem J.* 1983 Oct;15(10):1029-47
- 8 HAS Lecture critique de l'hémogramme : valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques 2007 (9)
- 9 Critical values in Hematology McFarlane A, Aslan B, Raby A, Bourner G, Padmore R. *Int J Lab Hematol.* 2015 Feb;37(1):36-43.
- 10 Revue microscopique du frottis sanguin : Proposition du Groupe Francophone d'Hématologie cellulaire (GFHC).Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couaillac JP, Fossat C, Luce JC, Maldonado E, Siguret V, Tichet J, Lantieri O, Corberand J; Groupe francophone d'hématologie cellulaire (GFHC).*Ann Biol Clin (Paris).* 2014 Sep-Oct;72(5):561-81
- 11 Standardization of haematology critical results management in adults: an International Council for Standardization in Haematology, ICSH, survey and recommendations. Keng TB, De La Salle B, Bourner G, Merino A, Han JY, Kawai Y, Peng MT, McCafferty R; International Council for Standardization in Haematology (ICSH). *Int J Lab Hematol.* 2016 Jul 18
- 12 Automated detection of working area of peripheral blood smears using mathematical morphology. Angulo J, Flandrin G. *Anal Cell Pathol.* 2003;25(1):37-49.
- 13 Morphometry and quality control for a May-Grunwald Giemsa stained preparation. A 40 centers cooperative study. Benattar L, Flandrin G. *Leuk Lymphoma.* 1999 May;33(5-6):587-91.
- 14 Comparison of the classical manual pushed wedge films, with an improved automated method for making blood smears. Benattar L, Flandrin G. *Hematol Cell Ther.* 1999 Nov;41(5):211-5.
- 15 Validation de méthodes et écarts les plus fréquents Application à la biologie hormonale. Vaubourdolle M - 30ème Colloque ACORATA – Paris – 15 Mai 2014
- 16 Ordonnance n°2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la biologie médicale. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=id>
- 17 Frottis sanguin manuel. Freynet N, Badaoui B, Wagner-Ballon O. *EMC- Bio med.* 2015 ;11 (1) :1-5
- 18 <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (Ricos)
- 19 Variability of results in differential counts on blood smears. Rumke CL. *Triangle* 1959,4,154.
- 20 Contraintes et opportunités pour l'accréditation de la formule sanguine au microscope .Martin C, Thoinet S, Frebet E, Donnard M, Gachard N, Trimoreau F. *Spectra Biologie* Août 2013(202) 27-41.
- 21 Analyses de biologie médicale : spécification et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation technique. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J,. *Ann Biol Clin*, 1999 :57(6) : 685-95
- 22 Phase pré analytique en hématologie cellulaire de routine. Trimoreau F, Martin C, Gachard N, Feuillard J. *Journal de biologie médicale*, 2013, 2 : 20-26
- 23 Accréditation de la formule sanguine manuelle. Emile C. *Opt Bio* 2013 (484) : 22-24
- 24 The unavoidable error in the differential count of the leukocytes of the blood. Barnett CW¹. *J Clin Invest.* 1933 Jan; 12(1):77-85.