

Université Pierre et Marie Curie -
Sorbonne Universités

MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »

MISE EN PLACE D'UNE VÉRIFICATION DE MÉTHODE :
RECHERCHE D'HÉMATIES FŒTALES DANS LE SANG MATERNEL
PAR LE TEST DE KLEIHAUER
DANS UN LABORATOIRE POLYVALENT

SAVALLE Caroline
2017-2018

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.



SAVALLE Caroline

Interne en Biologie Médicale, 5^{ème} semestre

Novembre 2017 - Avril 2018

Groupe Hospitalier Seclin Carvin – site de Seclin

Rue d'Apolda, 59113 SECLIN

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr ROLLAND qui m'a permis de suivre cette formation au cours de mon semestre, le Dr FORTIN qui m'a encadré tout au long de ce travail et tous les techniciens qui ont participé à ce projet.

Je remercie aussi tous les enseignants du DU pour la qualité de leurs cours.

Je remercie également tous les participants du DU pour leurs retours d'expérience.

Enfin, je tiens à remercier mes parents qui me soutiennent au quotidien ainsi que ma sœur pour son aide précieuse.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	6
1. INTRODUCTION	7
1.1. LE GROUPE HOSPITALIER SECLIN CARVIN	7
1.1.1. Présentation générale	7
1.1.2. Site de Seclin	8
1.1.3. Site de Carvin	9
1.2. LE LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE DU GHSC.....	10
1.2.1. Présentation générale - Activités	10
1.2.2. Organisation	11
1.2.3. Partenaires et clients.....	11
1.2.4. Le système de management de la qualité.....	12
1.3. LE TEST DE KLEIHAUER	14
1.3.1. Principe et indications	14
1.3.2. Technique	15
1.3.3. Limites	17
1.3.4. État des lieux des pratiques au laboratoire de Seclin	17
1.4. OBJECTIF ET DÉROULEMENT DU TRAVAIL.....	18
2. VÉRIFICATION SUR SITE DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE	19
2.1. DESCRIPTION DU PROCESSUS.....	19
2.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE	19
2.3. MISE EN ŒUVRE	20
2.4. MAÎTRISE DES RISQUES.....	20
2.5. IDENTIFICATION DES PERFORMANCES À ÉVALUER.....	21
2.6. VÉRIFICATION DES CRITÈRES DE PERFORMANCES	22
2.6.1. Évaluation des performances	22
a. Répétabilité	22
b. Fidélité intermédiaire	22
c. Justesse	23
d. Exactitude	24
e. Variabilité inter-opérateurs	24
f. Incertitude de mesure	26
g. Comparaison de méthodes	27
2.6.2. Vérification bibliographique	28
a. Intervalle de mesure	28
b. Interférences	28
c. Contamination entre échantillons	28
d. Robustesse	29
e. Stabilité des réactifs	29
f. Valeurs usuelles	29
2.7. AVIS D'APTITUDE	29
3. CONCLUSION	30
4. BIBLIOGRAPHIE	31
ANNEXES	33
RÉSUMÉ	43

GLOSSAIRE

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CMF : Cytométrie en Flux

CV : Coefficient de Variation

EEQ : Évaluation Externe de la Qualité

EFS : Établissement Français du Sang

EHPAD : Établissement d'Hébergement pour Personnes Âgées Dépendantes

ETP : Équivalent Temps Plein

GHSC : Groupe Hospitalier Seclin Carvin

GR : Globules Rouges

HA : Hématies Adultes

HbA : Hémoglobine A

HbF : Hémoglobine F

HF : Hématies Fœtales

HFM : Hémorragie Fœto-Maternelle

Ig : Immunoglobulines

MCO : Médecine-Chirurgie-Obstétrique

SSR : Soins de Suite et de Réadaptation

TK : Test de Kleihauer

1. INTRODUCTION

1.1. Le Groupe Hospitalier Seclin Carvin

1.1.1. Présentation générale

Le Groupe Hospitalier Seclin Carvin (GHSC) appartient au territoire de santé Lille métropole et dessert un bassin de population de plus de 200 000 habitants.

Le GHSC est né de la fusion administrative au 1^{er} janvier 2016 du Centre Hospitalier de Seclin et du Centre Hospitalier de Carvin.

Le GHSC est un établissement public de santé doté de la personnalité de droit public et de l'autonomie administrative et financière :

- Il assure les examens de diagnostic, la surveillance et le traitement des malades, des blessés et des femmes enceintes, en tenant compte des aspects psychologiques du patient.
- Il participe, conjointement avec les praticiens et les autres professionnels de santé, personnels et services concernés, à l'aide médicale urgente.
- Il contribue à l'enseignement universitaire et post-universitaire et concourt à la formation du personnel paramédical.

Voici quelques chiffres-clés du GHSC en 2016 :

- 151 médecins
- 300 lits et places en médecine-chirurgie-obstétrique (MCO) et 138 en Soins de Suite et de Réadaptation (SSR)
- 46 000 passages au sein des services d'accueil d'urgence
- 22 150 séjours en MCO
- Plus de 44 000 journées en SSR
- Plus de 90 000 consultations hors urgences
- 5 041 IRM et 14 815 scanners
- 2 066 naissances

L'hôpital est organisé en pôles d'activités cliniques et médico-techniques conformément au projet médical. L'organigramme de direction présenté en annexe I illustre cette organisation.

1.1.2. Site de Seclin



Figure 1 : Site de Seclin - Hôpital Général et Pavillon Roger Pratz

Le site de Seclin occupe une position géographique privilégiée : il allie ville et campagne dans un site classé, à proximité immédiate de grands axes de communication.

C'est un hôpital de proximité avec une capacité totale de 620 lits et places et une offre de soins polyvalente : médecine générale, interne et de spécialités, obstétrique et pédiatrie, chirurgie générale et de spécialités, urgences et filière gériatrique.

Le site de Seclin est un hôpital multi-sites. Il est composé de 5 établissements :

- l'Hôpital Général (MCO)

Il abrite les services de médecine, chirurgie, court séjour gériatrie, maternité-gynécologie, pédiatrie, les équipes mobiles de gériatrie et diabétologie, le service d'accueil des urgences, le service de soins intensifs et de surveillance continue et la prise en charge ambulatoire ainsi qu'un plateau technique regroupant l'imagerie médicale, le laboratoire, la pharmacie, la stérilisation, les blocs opératoires et le bloc obstétrical.

- le Pavillon Roger Pratz

Il comprend le service de SSR et les consultations externes.

- l'Établissement d'Hébergement pour Personnes Âgées Dépendantes (EHPAD) « Les Augustines » - Seclin

C'est un lieu d'accueil des personnes âgées et des personnes atteintes de troubles de la mémoire, d'une capacité de 126 lits.

- l'unité de soins de longue durée « Au Fil de l'Eau » - Seclin

Cette structure a une capacité d'accueil de 60 lits pour les personnes âgées.

- l'EHPAD « l'Arbre de Vie » - Wattignies

Cet établissement a une capacité de 64 lits pour l'accueil des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.

1.1.3. Site de Carvin



Figure 2 : Site de Carvin

C'est un hôpital de proximité avec une capacité totale de 226 lits et places et une offre de soins spécialisée en gériatrie, autonomie et addictologie.

Le site de Carvin dispose de services et d'établissements spécialisés :

- un SSR en gériatrie clinique de 30 lits
- un SSR en alcoologie et addictologie de 20 lits
- l'EHPAD « Les Orchidées » d'une capacité de 126 lits et places
- le foyer de vie « Les Genêts » pour adultes déficients intellectuels d'une capacité de 50 places
- un centre de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie

1.2. Le laboratoire de biologie médicale du GHSC

1.2.1. Présentation générale - Activités

Le laboratoire d'analyses médicales du GHSC se trouve sur le site de Seclin au sous-sol de l'Hôpital Général. Il fait partie du pôle d'activités médico-techniques avec la pharmacie à usage intérieur, la stérilisation, l'hygiène hospitalière, la cellule de bionettoyage et l'imagerie médicale.

C'est un laboratoire polyvalent qui regroupe des activités portant sur les sous-familles de paramètres biologiques suivants : Biochimie générale et spécialisée, Hémostase, Hématocytologie, Immuno-Hématologie, Bactériologie, Parasitologie-Mycoologie et Virologie. Environ 90% des actes sont réalisés sur site.

Le laboratoire est responsable des actes de biologie délocalisée de l'établissement. Le laboratoire a en charge également la gestion du dépôt de sang de l'établissement en accord avec l'Établissement Français du Sang (EFS) Nord de France. Il est qualifié comme étant « Dépôt relais » et « Dépôt d'Urgence vitale ». Il gère ainsi la commande et la délivrance des Produits Sanguins Labiles prescrits au GHSC sous le contrôle de l'EFS Nord de France.

Le laboratoire effectue environ 350 dossiers par jour. Il traite les bilans biologiques des patients hospitalisés dans les structures du GHSC et des patients reçus au GHSC dans un contexte de soins externes.

L'activité globale du laboratoire pour l'année 2016 a représenté près de 18 millions de B dont près de 16 millions de B en activité sur site, 2,2 millions de B en activité sous-traitée et 325 000 de BHN.

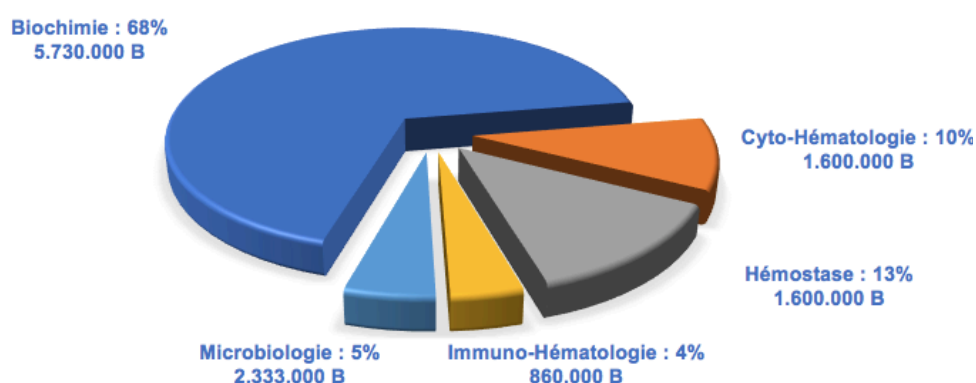


Figure 3 : Répartition des actes par secteur analytique (%) réalisés sur site en 2016 et activité en B

1.2.2. Organisation

Afin de répondre à ses missions de laboratoire de proximité et au regard des pôles d'activité cliniques de l'établissement, le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 365 jours par an. Ainsi, pendant les périodes de permanence des soins, il y a une garde technique sur place et une astreinte de sécurité est assurée par les biologistes médicaux. Cette organisation permet de répondre aux attentes et besoins des services et prescripteurs, en particulier pour la filière des urgences, soins intensifs/soins continus et vis-à-vis de l'activité du pôle Mère-Enfant-Gynécologie.

Le personnel du laboratoire du GHSC est composé de 24 personnes :

- 2 biologistes médicaux (soit 2 Équivalents Temps Plein (ETP))
- 1 cadre de santé (soit 0,4 ETP)
- 18 techniciens de laboratoire (soit 16 ETP)
- 3 agents d'accueil/secrétaires (soit 2,8 ETP)

L'organisation fonctionnelle établie au sein du laboratoire est schématisée par l'organigramme en annexe II.

1.2.3. Partenaires et clients

L'organigramme ci-dessous matérialise les liens du laboratoire du GHSC avec ses différents partenaires et clients.

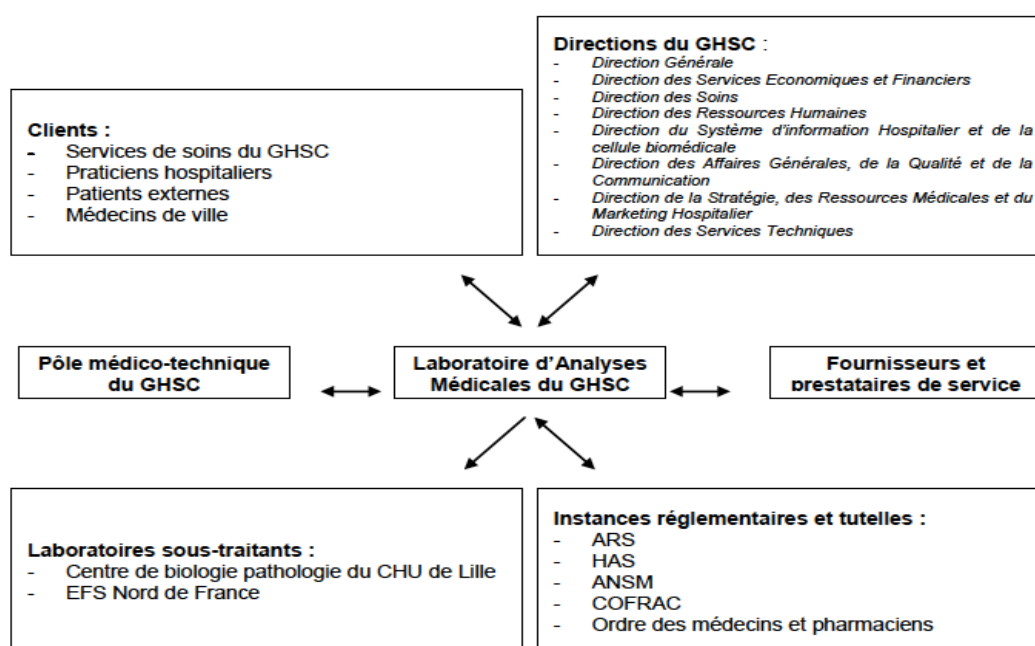


Figure 4 : Partenaires et clients du laboratoire du GHSC

1.2.4. Le système de management de la qualité

CARTOGRAPHIE DES PROCESSUS DU LABORATOIRE

L'élaboration du système de management de la qualité a été établie à partir d'une approche processus, schématisée par la cartographie des processus du laboratoire présentée en annexe III.

POLITIQUE QUALITÉ DU LABORATOIRE

La politique qualité du laboratoire s'articule autour de plusieurs objectifs :

* Orienter les axes de progrès et les projets de développement d'activité de manière à répondre aux attentes des clients (prescripteurs, patients) et partenaires du laboratoire, visant à leur donner satisfaction.

* Améliorer la qualité globale des prestations du laboratoire dans l'optique d'une prise en charge adaptée des patients, concernant notamment :

- la fiabilité des performances analytiques
- l'établissement d'un plan de continuité de l'activité
- la compétence des personnels du laboratoire
- le développement de la prestation de conseil et de la relation clinico-biologique
- la maîtrise des délais d'exécution des analyses et de transmissions des résultats
- la maîtrise et la mise en application du système de gestion documentaire

* Garantir la conformité des prestations du laboratoire vis-à-vis des bonnes pratiques professionnelles, des référentiels et des exigences réglementaires et normatives.

Le laboratoire s'est ainsi engagé dans une démarche visant à obtenir l'accréditation progressive de ses activités selon la norme NF EN ISO 15189 (1) afin de lui permettre d'optimiser ses prestations au service des prescripteurs et des patients.

ÉTAT D'AVANCEMENT DANS LA DÉMARCHE D'ACCREDITATION

Lors de la 1^{ère} évaluation COFRAC de décembre 2016, la portée d'accréditation déposée portait sur les sous-familles Biochimie générale et spécialisée (code BB1), Hémostase (code CB2) et Bactériologie (code BA7). L'activité couverte par cette portée représentait alors environ 65% de l'activité réalisée sur site. À l'issue de cette évaluation, 21 écarts ont été relevés, dont 4 écarts critiques. La notification d'accréditation initiale a été prononcée en avril 2017.

En décembre 2017 a eu lieu la 1^{ère} visite de surveillance (S1) du 1^{er} cycle d'accréditation (valable 5 ans au total) appliquée aux paramètres présentés en 2016. Les 2 évaluateurs ont ainsi passé en revue les plans d'action et ont vérifié leur mise en œuvre effective concernant les écarts mentionnés lors de la visite initiale.

De plus, une extension portant sur l'ouverture de la sous-famille Immuno-hématologie (codes IH1, IH2 et IH3) a été demandée, ce qui représente une part d'activité d'environ 4%. Il s'agissait d'une 1^{ère} expertise sur ce secteur technique, incluant l'examen des dossiers de vérification de méthodes présentés (Groupes sanguins, Recherche d'Agglutinines Irrégulières, test de Coombs direct).

Enfin, le COFRAC devait vérifier les conditions dans lesquelles avaient été gérés les changements significatifs depuis la dernière évaluation (mouvement de personnel, gestion de la portée flexible : changement d'analyseur et/ou de méthode).

Au total, les 2 évaluateurs ont valorisé le travail réalisé par toute l'équipe depuis la dernière évaluation de décembre 2016. Sur les 21 écarts précédents, 19 ont été soldés dont les 4 écarts critiques et 2 font l'objet d'une reconduction partielle. Plusieurs écarts sont devenus des points forts pour le laboratoire. Au cours de cette évaluation, 11 nouveaux écarts ont été mis en évidence mais aucun n'est critique.

La prochaine visite de surveillance (S2) aura lieu en décembre 2018. Elle portera sur le suivi des écarts de la visite de surveillance S1 et une extension de la sous-famille Hématocytologie sera demandée.

1.3. Le test de Kleihauer

1.3.1. Principe et indications

Décrit en 1957 par les allemands Enno Kleihauer et Klaus Betke, le test de Kleihauer (TK) est la technique de référence pour mettre en évidence la présence d'hématies fœtales dans le sang maternel. Son but est de détecter une hémorragie fœto-maternelle (HFM) et d'évaluer l'importance du saignement (2). Il doit être prescrit chez toutes les femmes Rh D négatives après la naissance d'un bébé Rh D positif et après tous les événements sensibilisants potentiels chez les femmes Rh D négatives après 20 semaines de grossesse, comme un traumatisme abdominal, un décollement placentaire, une amniocentèse...(3). Il peut aussi permettre d'évaluer l'importance du saignement chez les femmes Rh D positives (4).

En contexte post-natal, il permet d'adapter, en fonction de la quantité d'hématies fœtales passées dans la circulation maternelle, la posologie d'immunoglobulines (Ig) anti-D (Rhopylac®) chez les patientes Rh D négatives, dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-Rh D et de la maladie hémolytique du nouveau-né lors d'une grossesse ultérieure (5). Le tableau suivant décrit la dose de Rhophylac® à administrer en fonction du volume de l'HFM.

Kleihauer : HF/10.000HA	Dose de 200 µg	Dose de 300 µg	Voie d'administration
0-4	1	1	Intraveineuse directe
5-24 *	1	1	
25-44	2	1	
45-64	2	2	Perfusion sur 4 heures Dilué dans 250 ml de NaCl à 9 pour mille
65-84	3	2	
85-104	3	2	
105-124	4	3	
125-144	4	3	
145-164	5	3	
165-184	5	4	
185-204	6	4	
205-224	6	4	
225-244	7	5	
245-264	7	5	
265-284	8	5	
285-304	8	6	

* À l'accouchement, pour un passage > 8HF, il est préférable de faire une injection de 2 doses de 200 µg.

Figure 5 : Adaptation de la dose d'immunoglobuline anti-D en fonction du volume d'HFM estimé par le test de Kleihauer (6)

Le TK est indiqué également dans le suivi thérapeutique afin d'apprécier l'efficacité de l'injection préventive d'immunoglobulines anti-D.

Le prélèvement est à effectuer, en contexte diagnostique, immédiatement après l'accouchement ou immédiatement au décours d'un geste pendant la grossesse et, en suivi thérapeutique, 48 heures après l'injection des Ig anti-D.

1.3.2. Technique

Depuis 1957, la technique du TK a été peu modifiée et reste la référence malgré sa réalisation manuelle. C'est une méthode cytochimique qui permet de différencier, sur un frottis sanguin maternel, les hématies fœtales (HF) contenant de l'hémoglobine F (HbF) des hématies adultes (HA) contenant de l'hémoglobine A (HbA), sur la base d'une différence de solubilité entre l'HbF et l'HbA en conditions acides (5,7). En effet, l'HbF résiste à une élution à pH acide, ce qui fait que les hématies fœtales sont colorées en rose vif, tandis que l'HbA est éluée des hématies adultes qui apparaissent alors comme des cellules fantômes (7,8)

À partir de sang prélevé sur tube EDTA, un frottis très mince est réalisé dès réception du tube. La technique de Kleihauer nécessite la comparaison du sang à étudier à 2 sangs témoins. Ainsi, en parallèle, 2 autres frottis sont effectués pour valider la bonne réalisation des différentes étapes : un témoin négatif à partir de sang adulte prélevé sur EDTA et un témoin positif à partir de sang adulte prélevé sur EDTA mélangé au sang d'un nouveau-né (volume à volume). Les frottis sont séchés à l'air libre pendant environ 20 minutes.

Pour la technique, le laboratoire de Seclin utilise un kit Kleihauer de la société IMMUCOR®. Les lames sont fixées pendant 3 minutes avec la solution de fixation contenant du méthanol, lavées parfaitement en laissant couler l'eau de ville puis séchées à l'air libre. Ensuite, les frottis sanguins sont inondés avec le réactif d'élution acide pendant 30 secondes. Le réactif d'élution appliqué élimine l'HbA des hématies adultes sans éliminer l'HbF des hématies fœtales présentes. Après lavage à l'eau de ville, sans les laisser sécher, les frottis sont inondés avec le réactif de coloration de comptage (érythrosine) pendant 2 minutes. Cela rend l'HbF des hématies fœtales clairement visible. Enfin, un lavage à l'eau de ville puis un séchage à l'air libre des lames sont effectués.

Les frottis sanguins élués et colorés sont examinés au microscope à l'objectif x100 à immersion au niveau d'une zone où les hématies sont contiguës et non chevauchantes, en commençant par les lames témoins. Les hématies fœtales contenant de l'HbF sont colorées en rose foncé alors que les hématies adultes normales contenant de l'HbA apparaissent translucides. Le technicien compte le nombre d'hématies fœtales présentes dans 50 champs d'environ 200 hématies.

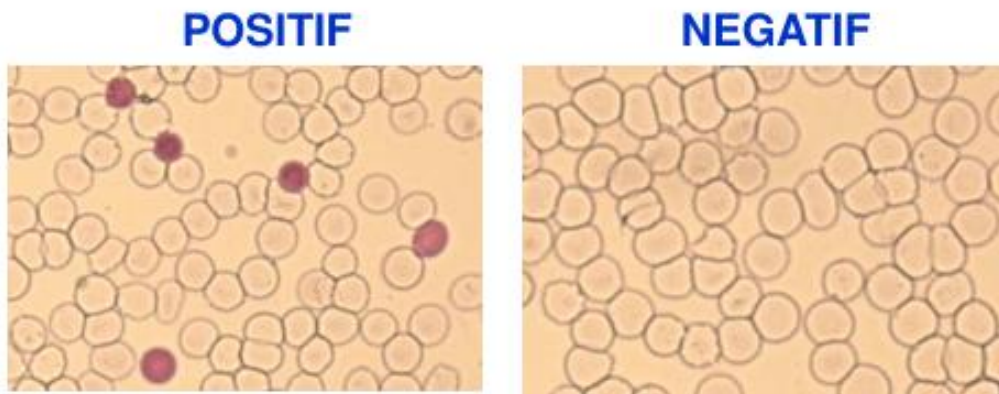


Figure 6 : Tests de Kleihauer positif et négatif (Agnès Mailloux, CNRHP, Hôpital Saint-Antoine)

S'il y a absence d'hématies fœtales, le test est rendu négatif.

S'il y a présence d'hématies fœtales, le test est rendu positif avec le nombre d'hématies fœtales observées pour 10 000 hématies adultes. Dans ce cas, il est très important de téléphoner le résultat au clinicien puisqu'il détermine la prise en charge de la mère et du bébé : surveillance accrue de la grossesse, adaptation des doses de Rhophylac®.

Après examen, les tubes sont conservés à +4°C pendant 48h.

Des contrôles de qualité pour le test de Kleihauer ont été mis en place au laboratoire :

- un contrôle interne de qualité (CIQ) FETALtroI™ de la société EUROCELL Diagnostics avec 3 niveaux qui est réalisé une fois par semaine
- une évaluation externe de la qualité (EEQ) RBC-F de la société EUROCELL Diagnostics avec 2 niveaux qui est réalisée deux fois par an

Ces contrôles sont traités de la même façon que les échantillons de patients.

En 2017, 328 tests de Kleihauer ont été effectués au laboratoire de Seclin.

1.3.3. Limites

Bien que le test de Kleihauer soit l'examen le plus sensible pour détecter une hémorragie foeto-maternelle (1 HF/10 000 HA), il souffre de son manque de spécificité (7).

En effet, des globules rouges (GR) adultes contenant de l'HbF (cellules F) sont mis en évidence chez les patientes présentant une hémoglobinopathie comme la persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale, les thalassémies alpha et bêta et dans certaines variantes de l'anémie falciforme. D'autre part, le nombre de cellules F augmente physiologiquement pendant la grossesse (5,8).

Ces cellules F de coloration rose pâle dite « intermédiaire » ou des petits lymphocytes peuvent être considérés à tort comme des cellules foetales (5). Cela peut conduire à des résultats faussement positifs ou surestimés (8).

Le TK nécessite de ce fait un opérateur expérimenté puisqu'il faut savoir faire la différence entre des dégradés de coloration rose (7).

De plus, il est nécessaire d'estimer correctement le nombre d'hématies observées sur chaque champ au microscope.

Ce test présente donc une forte variabilité inter-individuelle (4,5,7).

Bien que le résultat rendu soit opérateur-dépendant, on observe une tendance constante à la surestimation par rapport à la valeur attendue (7).

1.3.4. État des lieux des pratiques au laboratoire de Seclin

Afin de voir si les pratiques sont homogènes entre les différents techniciens, un état des lieux a été réalisé (cf annexe IV). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après. Il en ressort des disparités entre les techniciens dans leur façon de faire, soit parce que certains ne respectent pas ce qui est écrit dans la procédure test de Kleihauer PO.HEM.CYT.001, soit parce que des informations manquent dans la procédure. Il va donc falloir la revoir afin de standardiser les pratiques.

1.4. Objectif et déroulement du travail

L'objectif de ce travail est d'évaluer les performances du test de Kleihauer au laboratoire de Seclin qui utilise le kit Kleihauer de la société IMMUCOR®.

Pour ce faire, la méthode PDCA a été utilisée :

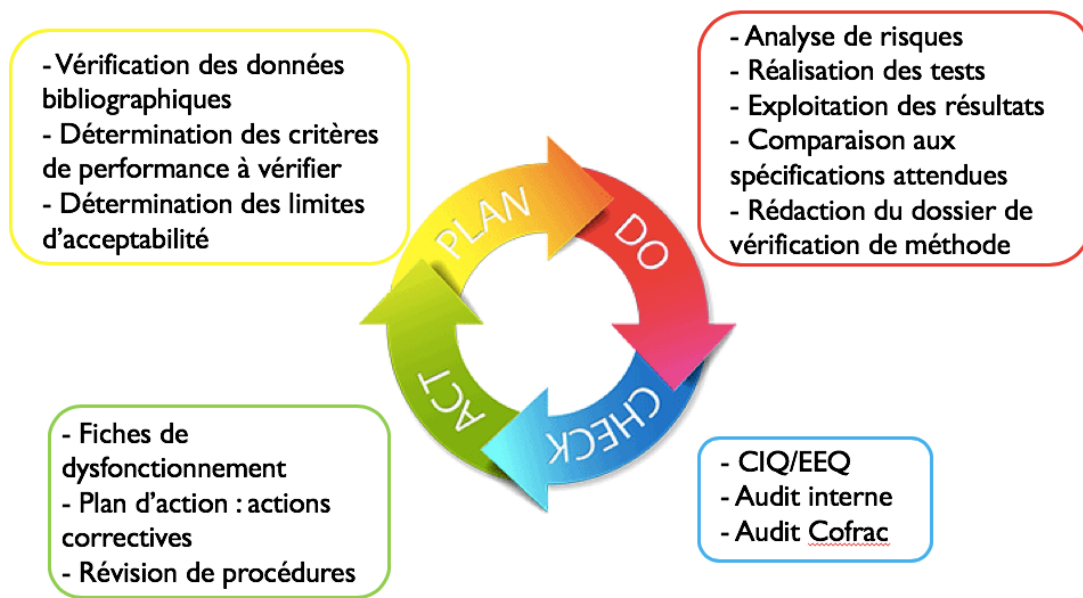


Figure 7 : Cycle PDCA

Le calendrier qui a été suivi pour ce travail est le suivant :

Février-Mars 2018

- Vérification des données bibliographiques
- Détermination des critères de performance à vérifier
- Détermination des limites d'acceptabilité
- Analyse de risques

Avril-Mai 2018

- Réalisation des tests

Juin-Juillet-Août 2018

- Exploitation des résultats
- Comparaison aux spécifications attendues
- Rédaction du dossier de vérification de méthode

2. VÉRIFICATION SUR SITE DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

Le SH FORM 43 (9) a servi de base pour ce travail.

2.1. Description du processus

Le test de Kleihauer est un processus simple car il est constitué d'une seule étape. Pour cet examen de la sous-famille Hématocytologie, le laboratoire a adopté une méthode reconnue, de portée A, car il utilise un dispositif médical de diagnostic in vitro marqué CE.

Ce test permet de mettre en évidence la présence d'hématies fœtales dans le sang maternel. Son but est donc de détecter une hémorragie fœto-maternelle et d'évaluer l'importance du saignement.

C'est une méthode cytochimique qui permet de différencier, sur un frottis sanguin maternel, les hématies fœtales contenant de l'HbF des hématies adultes contenant de l'HbA, sur la base d'une différence de solubilité entre l'HbF et l'HbA en conditions acides. En effet, le réactif d'éluion appliqué élimine l'HbA des hématies adultes sans éliminer l'HbF des hématies fœtales présentes. Après coloration, les hématies fœtales apparaissent rose foncé alors que les hématies adultes apparaissent translucides.

2.2. Description de la méthode

Analyte / Mesurande	Hématies fœtales
Principe de la méthode	Identification des hématies fœtales et numération au microscope optique
Type d'échantillon primaire	Sang total
Type de récipient, additifs	Tube EDTA-K2
Prétraitement de l'échantillon	Pas de prétraitement
Unités	Hématies fœtales / 10000 hématies adultes (1 HF / 10000 HA = 0.5 ml de sang fœtal)
Critères d'interprétation	< 1 HF / 10000 HA : résultat négatif ≥ 1 HF / 10000 HA : résultat positif
Marquage CE	Oui 600fr-5
Codage C.N.Q.	Non applicable
Équipement	Microscope Olympus Réf BX45
Référence du réactif	Kleihauer Kit IMMUCOR® Réf 0098100
Matériau d'étalonnage	Non applicable
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	Non applicable

2.3. Mise en œuvre

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode	Techniciens habilités Biologiste référent : LF Interne en biologie médicale : CS
Procédure de validation/mode opératoire	Réalisation conformément à la Procédure PG.ANA.004 v3 du 20/04/2016 "Validation de méthodes": dans le cas présent, application d'une vérification de méthode
Procédure de gestion de la portée flexible	Application de la procédure PG.QUA.011 v3 du 02/06/2016 "Gestion de la portée flexible" : dans le cas présent, portée A
Période d'étude	De Février 2018 à Mai 2018
Date de 1^{ère} utilisation	Septembre 2017

2.4. Maîtrise des risques

Avec un biologiste et un technicien référents en Hématologie, nous avons réfléchi ensemble aux différents problèmes que l'on peut rencontrer suite à la demande d'un test de Kleihauer qui aboutiraient à l'impossibilité de rendre un résultat ou au rendu d'un résultat erroné ou encore à la non-transmission du résultat au clinicien.

Un diagramme d'Ishikawa (cf annexe V), basé sur la méthode des 5M, a ainsi été construit.

Ensuite, à partir de ce travail, une analyse des risques identifiés (cf annexe VI) a été réalisée afin d'apporter des éléments de réponse visant à les maîtriser. Pour chaque risque, une estimation de la criticité a été effectuée. L'échelle de criticité utilisée comporte 5 niveaux, allant de 1 à 5.

Niveau	Criticité du risque
1	Non critique
2	Peu critique
3	Moyennement critique
4	Critique
5	Très critique

Figure 8 : Échelle de criticité

2.5. Identification des performances à évaluer

Le test de Kleihauer étant une méthode quantitative de portée A au laboratoire de Seclin, les performances à évaluer sont celles décrites dans le SH GTA 04 (10), comme indiqué ci-dessous.

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir ⁹ , EBMD) et analyse des discordances ¹⁰	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)	Bibliographie	/	Essai	/
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	/	Bibliographie	/	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	/	Bibliographie	/	Essai
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹¹ de la méthode ou du système analytique.				

Figure 9 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (selon NATA note n°17 – juin 2012)

2.6. Vérification des critères de performances

2.6.1. Évaluation des performances

a. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée le 18 avril 2018 sur le lot F18-02 du CIQ FETALtrol™ de la société EUROCELL Diagnostics.

Pour cela, 10 lames ont été faites pour chacun des 3 niveaux de contrôle et lues par une personne, le but étant de vérifier que l'étalement, la coloration et la lecture étaient homogènes entre les lames.

Niveau de CIQ	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeurs (nombre d'HF / 10000 HA)	0	34	349
	0	28	388
	0	35	325
	0	48	286
	0	31	246
	0	56	333
	0	28	292
	0	32	382
	0	34	331
	0	31	290

Échantillons	Nombre de valeurs	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
CIQ niveau 1	10	0	0	0	/	40	Conforme
CIQ niveau 2	10	35,70	9,10	25,50	/	40	Conforme
CIQ niveau 3	10	322,20	44,59	13,84	/	30	Conforme

Il n'existe pas de données fournisseur concernant les coefficients de variation (CV) acceptables. Le laboratoire a donc défini des CV d'après la bibliographie.

Pastoret et al, dans leur étude, ont trouvé comme CV pour les niveaux 1, 2 et 3 respectivement 40%, 40% et 30% (8). Ce sont donc les CV retenus par le laboratoire.

Conclusion : Les CV de répétabilité dans la littérature montrent des taux compris entre 30 et 40%. Le test de répétabilité est donc conforme aux résultats de la littérature.

b. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été évaluée sur la période du 5 septembre 2017 au 10 avril 2018 sur les 3 niveaux de CIQ FETALtrol™ de la société EUROCELL Diagnostics.

Les 3 niveaux de CIQ sont lus par un technicien au poste d'hématologie une fois par semaine.

Niveau de CIQ	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Date	Numéro de lot	Opérateur
Valeurs (Nombre d'HF / 10000 HA)	2	42	258	05/09/2017	F17-03	BT
	3	50	262	12/09/2017	F17-03	DH
	0	40	250	26/09/2017	F17-03	PD
	1	45	255	11/10/2017	F17-03	PD
	10	41	270	17/10/2017	F17-04	SA
	8	40	260	24/10/2017	F17-04	PD
	2	43	264	31/10/2017	F17-04	CC
	5	26	257	07/11/2017	F17-04	IR
	1	33	245	14/11/2017	F17-04	IR
	2	46	280	21/11/2017	F17-04	VA
	2	39	265	29/11/2017	F17-04	PD
	1	49	160	06/12/2017	F17-04	JS
	4	38	210	12/12/2017	F17-04	BT
	4	29	265	19/12/2017	F17-04	IR
	4	27	272	26/12/2017	F17-04	SVL
	2	33	250	03/01/2018	F17-04	CC
	1	42	275	09/01/2018	F17-04	CC
	1	48	220	16/01/2018	F17-04	CC
	1	28	250	23/01/2018	F17-04	DH
	2	25	240	06/02/2018	F18-01	PD
	1	21	268	13/02/2018	F18-01	CC
	3	19	240	20/02/2018	F18-01	DG
	4	17	260	27/02/2018	F18-01	DG
	10	40	230	13/03/2018	F18-01	IR
	10	50	217	20/03/2018	F18-01	SA
	10	30	253	04/04/2018	F18-01	PD
	7	35	260	10/04/2018	F18-01	PD

Échantillons	Nombre de valeurs	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
CIQ niveau 1	27	4,13	3,33	80,73	/	40	Non conforme
CIQ niveau 2	27	34,73	9,71	27,94	/	40	Conforme
CIQ niveau 3	27	248,30	26,96	10,86	/	30	Conforme

Il n'existe pas de données fournisseur concernant les CV acceptables.

Conclusion : Le CV du niveau 1 n'est pas conforme mais, si l'on regarde les résultats rendus, ils sont tous dans la fourchette attendue (0 à 10) donc c'est acceptable. Par ailleurs, les niveaux 2 et 3 sont conformes.

c. Justesse

Le laboratoire de Seclin n'externalise pas ses CIQ donc la justesse ne peut pas être évaluée.

Dans la bibliographie, il est montré que le TK surestime systématiquement le nombre d'hématies fœtales mais il n'y a pas de biais précis (7,8).

d. Exactitude

L'exactitude a été évaluée sur la période de mai 2015 à mai 2018 sur les 2 niveaux d'EEQ RBC-F de la société EUROCELL Diagnostics.

Échantillons	Niveau	Valeur labo	Moyenne groupe de pairs	Limites acceptables	Écart-type groupe de pairs	Biais	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) limite	Z-score	Conclusion Conforme si Z-score < 2
EEQ Mai 2015	E1	3	0	0-2	/	3	/	/	/	Non conforme
	E2	390	242	142-342	105,94	148	61,16	40	1,40	Conforme
EEQ Nov. 2015	E1	430	253	149-357	91,53	177	69,96	40	1,93	Conforme
	E2	129	113	67-159	42,85	16	14,16	40	0,37	Conforme
EEQ Mai 2016	E1	298	231	135-327	116,37	67	29,00	40	0,58	Conforme
	E2	465	387	227-547	189,45	78	20,16	40	0,41	Conforme
EEQ Nov. 2016	E1	210	228	134-322	102,55	-18	-7,90	40	-0,18	Conforme
	E2	0	0	0-3	/	0	/	/	/	Conforme
EEQ Mai 2017	E1	9	0	0-2	/	9	/	/	/	Non conforme
	E2	29	28	16-40	12,98	1	3,57	40	0,08	Conforme
EEQ Nov. 2017	E1	35	23	13-33	8,57	12	52,17	40	1,40	Conforme
	E2	200	188	110-266	54,98	12	6,38	40	0,22	Conforme
EEQ Mai 2018	E1	30	23	13-33	8,98	7	30,44	40	0,78	Conforme
	E2	190	203	119-287	65,04	-13	-6,40	40	-0,20	Conforme

Les valeurs qui ne sont pas comprises dans les intervalles sont indiquées en rouge.

Conclusion : 2 EEQ avec un résultat de TK négatif sont non conformes et les biais, pour 3 des valeurs, dépassent le biais limite. Cela est dû à une lecture rendue difficile par la qualité des EEQ. En effet, les hématies maternelles sont difficiles à voir et, de ce fait, il est compliqué d'estimer correctement le nombre d'hématies par champ. Mais, pour ces 3 valeurs, si l'on prend comme valeur de référence le Z-score qui doit être inférieur à 2, ces résultats sont corrects.

e. Variabilité inter-opérateurs

La variabilité inter-opérateurs a été évaluée entre avril et mai 2018 sur les 3 niveaux du lot F18-02 du CIQ FETALtro™ de la société EUROCELL Diagnostics. Chaque opérateur a lu en aveugle 6 lames, soit 2 lames pour chaque niveau de contrôle.

Niveau de CIQ		Niveau 1		Niveau 2		Niveau 3	
Nombre d'HF / 10000 HA		0-10		10-60		90-290	
Valeurs par opérateur	VA	7	0	19	16	210	220
	SA	1	3	20	12	119	125
	CC	6	0	38	23	321	121
	PD	0	0	31	42	311	377
	LF	0	0	12	23	162	146
	DG	0	0	46	40	318	474
	DH	10	0	12	15	220	103
	CH	2	0	24	24	218	253
	MP	2	3	18	17	85	47
	IR	2	2	18	17	166	150
	JS	11	2	42	19	263	194
	SVL	5	0	46	14	298	295

La variabilité inter-opérateurs a également été évaluée sur la période de mai 2015 à mai 2018 sur les 2 niveaux d'EEQ RBC-F de la société EUROCELL Diagnostics. Chaque EEQ a été lue par le plus d'opérateurs possibles.

EEQ RBC-F		Mai 2015		Nov. 2015		Mai 2016		Mai 2017		Nov. 2017		Mai 2018		
Niveaux		E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	
Nombre d'HF / 10000 HA	Moyenne groupe	0	242	253	113	231	387	0	28	23	188	23	203	
	Limites acceptables	0-2	142-342	149-357	67-159	135-327	227-547	0-2	16-40	13-33	110-266	13-33	119-287	
Valeurs par opérateur	VA	/	/	1050	100	/	/	/	/	17	380	25	268	
	SA	3	310	301	118	/	/	4	38	35	167	24	159	
	CC	/	/	488	128	370	556	7	38	32	280	/	/	
	AC	4	430	340	115	318	544	/	/	/	/	/	/	
	MCD	1	334	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	BD	0	372	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	PD	3	453	660	160	300	429	16	54	53	300	55	450	
	LF	3	339	430	129	240	389	9	29	35	200	30	190	
	DG	/	325	/	/	/	/	/	/	/	50	391	54	328
	DH	8	431	324	85	/	/	15	35	42	737	28	258	
	CH	/	/	440	200	/	/	10	35	50	200	27	330	
	CP	/	/	/	/	229	465	/	/	/	/	/	/	
	IR	2	308	/	/	/	/	1	31	30	365	/	/	
	JS	/	/	/	/	/	/	/	/	36	347	31	164	
BT	4	380	1100	150	333	486	10	51	35	570	/	/		
SVL	13	324	360	139	332	407	/	/	43	488	28	201		

Les valeurs qui ne sont pas comprises dans les intervalles sont indiquées en rouge.

Échantillons	Nombre de valeurs	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
CIQ niveau 1	24	2,33	3,23	138,25	/	40	Non conforme
CIQ niveau 2	24	24,50	11,47	46,82	/	40	Non conforme
CIQ niveau 3	24	216,50	102,13	47,17	/	30	Non conforme
EEQ mai 2015 niveau E1	10	4,10	3,78	92,30	/	40	Non conforme
EEQ mai 2015 niveau E2	11	364,18	52,71	14,47	/	30	Conforme
EEQ nov. 2015 niveau E1	10	549,30	295,94	53,88	/	30	Non conforme
EEQ nov. 2015 niveau E2	10	132,40	32,53	24,57	/	30	Conforme
EEQ mai 2016 niveau E1	7	303,14	51,49	16,99	/	30	Conforme
EEQ mai 2016 niveau E2	7	468,00	64,98	13,89	/	30	Conforme
EEQ mai 2017 niveau E1	8	9,00	5,07	56,34	/	40	Non conforme
EEQ mai 2017 niveau E2	8	38,88	9,00	23,15	/	40	Conforme
EEQ nov. 2017 niveau E1	12	38,17	10,12	26,50	/	40	Conforme
EEQ nov. 2017 niveau E2	12	368,75	165,61	44,91	/	30	Non conforme
EEQ mai 2018 niveau E1	9	33,56	12,07	35,98	/	40	Conforme
EEQ mai 2018 niveau E2	9	260,89	95,84	36,74	/	30	Non conforme

Il n'existe pas de données fournisseur concernant les CV acceptables.

Conclusion : Dans un peu plus de la moitié des cas, le CV est supérieur au CV retenu par le laboratoire, ce qui reflète une forte variabilité inter-opérateurs. Cela est en accord avec les données de la littérature (4,5,7). Pour pallier à ce problème, le laboratoire va acquérir un nouveau microscope avec une grille de comptage, ce qui permettra une estimation plus homogène du nombre d'hématies par champ.

f. Incertitude de mesure

Pour évaluer les incertitudes de mesure, la méthode choisie est la méthode « CIQ / EEQ ». Cette méthode repose sur l'exploitation des données internes (CIQ) et des données externes (EEQ). Les incertitudes de mesure sont calculées selon la formule suivante que l'on trouve dans le SH GTA 14 (11) :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

$$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2} + \hat{\sigma}_E^2$$

CIQ	Niveau 1 (0-10 HF / 10000 HA)	Niveau 2 (10-50 HF / 10000 HA)	Niveau 3 (100-260 HF / 10000 HA)
Moyenne	4,13	34,75	248,30
Écart-type	3,33	9,71	26,96
CV(%)	80,73	27,94	10,86
u(CIQ)	3,33	9,71	26,97

EEQ	Valeur faible Mai 2015 E1 Nov. 2016 E2 Mai 2017 E1	Valeur moyenne Mai 2017 E2 Nov. 2017 E1 Mai 2018 E1	Valeur haute Mai 2015 E2 Nov. 2015 E1 et E2 Mai 2016 E1 et E2 Nov. 2016 E1 Nov. 2017 E2 Mai 2018 E2
Moyenne des biais	4,00	6,67	58,38
Écart-type des biais	4,58	5,51	73,13
Effectif	3	3	8
u(EEQ)	5,13	6,72	80,52

	Valeur faible	Valeur moyenne	Valeur haute
u(C) composée (HF / 10000 HA)	6,12	11,81	84,92
u(C) composée élargie (= 2 u(C) composée) (HF / 10000 HA)	12,24	23,62	169,84
u(C) composée élargie (= 2 u(C) composée) (%)	296,26	67,97	68,40

	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul	Méthode « CIQ / EEQ »	CV acceptables
Quantification de l'incertitude Valeur faible	4,13 ± 12,24 HF / 10000 HA 4,13 ± 296,26 %	40%
Quantification de l'incertitude Valeur moyenne	34,75 ± 23,62 HF / 10000 HA 34,75 ± 67,97 %	40%
Quantification de l'incertitude Valeur haute	248,30 ± 169,84 HF / 10000 HA 248,30 ± 68,40 %	30%

Conclusion : Les incertitudes calculées sont très élevées, d'où l'importance de l'étude des risques dans ce cas. Le résultat rendu correspond plus à une estimation du nombre d'hématies fœtales. Il est donc important d'en informer le clinicien.

g. Comparaison de méthodes

La comparaison entre la méthode maison et la méthode utilisant un kit Kleihauer a été effectuée de mai à août 2017.

Échantillon	Méthode maison (X)	Kit Kleihauer (Y)	Moyenne	Différence (X-Y)
73419	6	6	6	0
56276	3	0	1,5	3
55689	4	0	2	4
58537	0	0	0	0
13291	0	0	0	0
18512	0	0	0	0
52891	0	0	0	0
58399	0	0	0	0
56810	0	0	0	0
78559	10	2	6	8
00337	4	2	3	2
1903	200	205	202,5	-5
596	0	0	0	0
10513	2	2	2	0
11223	88	42	65	46
CIQ F17-02 Niveau 1 (0-10 HF / 10000 HA)	3	1	2	2
CIQ F17-02 Niveau 2 (10-50 HF / 10000 HA)	40	20	30	20
CIQ F17-02 Niveau 3 (80-240 HF / 10000 HA)	300	160	230	140
83276	0	0	0	0
79670	0	0	0	0
18367	1	1	1	0
18247	0	0	0	0
87289	0	0	0	0
CIQ F17-03 Niveau 1 (0-10 HF / 10000 HA)	1	0	0,5	1
CIQ F17-03 Niveau 2 (10-50 HF / 10000 HA)	35	27	31	8
CIQ F17-03 Niveau 3 (100-260 HF / 10000 HA)	200	170	185	30
46843	GR intermédiaires +++	3	/	/
43568	0	0	0	0
50133	2	2	2	0
50180	0	0	0	0
50216	3	5	4	-2
50342	0	0	0	0
50685	0	0	0	0
53287	0	0	0	0

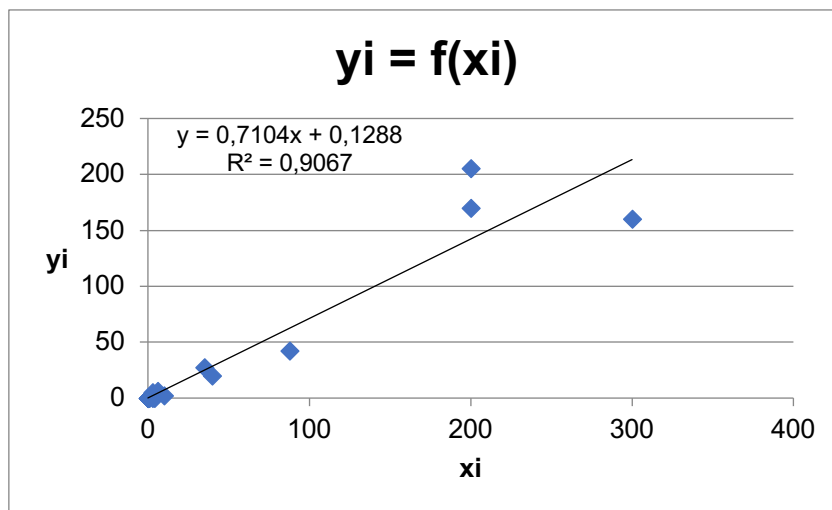


Figure 10 : Droite de Deming

Conclusion : Les 2 méthodes sont bien corrélées ($R^2 = 0,9067$). Avec la technique maison, pour les résultats positifs, on observe souvent des valeurs supérieures à celles obtenues avec le kit Kleihauer et on a davantage d'hématies intermédiaires, ce qui nous a conduit à adopter le kit Kleihauer à partir de septembre 2017.

2.6.2. Vérification bibliographique

a. Intervalle de mesure

Pour le TK, la limite de quantification est assimilable à la limite de détection. La nomenclature des actes de biologie médicale précise que le seuil de détection du TK doit être inférieur à 5 HF / 10000 HA (12). Avec le kit Kleihauer, la limite de détection est de 0 HF / 10000 HA.

b. Interférences

Les cellules F de coloration rose pâle dite « intermédiaire » ou des petits lymphocytes peuvent être considérés à tort comme des cellules fœtales (5). Cela peut conduire à des résultats faussement positifs ou surestimés (8).

c. Contamination entre échantillons

Au laboratoire de Seclin, il n'y a pas de risque de contamination entre échantillons car, pour chaque frottis, un nouveau cône et une nouvelle lame pour étaler sont utilisés.

d. Robustesse

Selon le SH GTA 04 (10), la robustesse peut être évaluée par 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.

CIQ	Moyenne Fidélité intermédiaire	Moyenne Répétabilité	Rapport Fidélité intermédiaire / Répétabilité
Niveau 1	4,13	0	/
Niveau 2	34,73	35,70	0,97
Niveau 3	248,30	322,20	0,77

Conclusion : Pour les niveaux 2 et 3 du CIQ, les rapports entre la fidélité intermédiaire et la répétabilité sont proches de 1, ce qui montre que la technique est assez robuste.

e. Stabilité des réactifs

Le laboratoire suit les recommandations du fournisseur. En effet, les réactifs prêts à l'emploi sont conservés à température ambiante entre 1 et 30°C (pas conservés congelés et pas exposés à des températures élevées), ils ne sont pas utilisés après la date de péremption et les réactifs de fixation et d'élution sont bien refermés après utilisation afin d'éviter l'évaporation du méthanol qui pourrait provoquer une coloration inconsistante.

f. Valeurs usuelles

Dans la notice du kit Kleihauer, le fournisseur indique que la quantité normale de cellules fœtales dans le sang de l'adulte est inférieure à 0,1‰.

2.7. Avis d'aptitude

Après avoir évalué les différentes performances du test de Kleihauer, nous concluons à la non-conformité de la technique car les résultats ne sont pas satisfaisants.

3. CONCLUSION

En l'état actuel, le test de Kleihauer ne sera pas présenté au COFRAC pour accréditation car il reste encore des améliorations à faire.

En effet, cette vérification de méthode a fait apparaître différents problèmes :

- les CIQ utilisés sont difficilement lisibles. Cependant, ce problème n'est pas retrouvé chez les patientes pour lesquelles les frottis présentent une belle coloration. Ce n'est donc pas un problème de coloration avec le kit Kleihauer. C'est pourquoi plusieurs laboratoires préparent eux-mêmes leurs différents niveaux de CIQ.

- les EEQ utilisées sont également difficiles à lire. Après concertation avec des confrères, le laboratoire de Seclin a choisi de changer de fournisseur d'EEQ l'année prochaine et a retenu le programme d'EEQ de l'association ASQUALAB. Les tests de vérification de méthode devront donc être refaits avec ce nouveau programme d'EEQ.

- il y a une grande variabilité inter-opérateurs et des incertitudes de mesure élevées. Cela s'explique par la difficulté d'estimer le nombre d'hématies maternelles par champ. Pour pallier à ce problème, le laboratoire va acquérir un nouveau microscope avec une cellule de comptage.

- les techniciens manquent d'expérience de part leur polyvalence (rotation sur tous les postes) et de part le faible nombre de demandes de tests de Kleihauer (environ 1 TK par jour). C'est pourquoi les techniciens sont régulièrement resensibilisés (formations).

Les nouvelles recommandations suggèrent d'utiliser le test de Kleihauer uniquement comme test de dépistage et, en cas de positivité du TK, d'avoir recours à la cytométrie en flux (CMF) pour confirmer et quantifier le volume de l'hémorragie fœto-maternelle de façon plus précise (3, 13). Cependant, le coût encore prohibitif de la CMF fait que cette technique n'est pas accessible à tous les laboratoires.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. NF EN ISO 15189 Déc 2012
2. Kleihauer E., Braun H., Betke K., Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. *Klin. Wochenschr.*, 1957;35(12):637-638
3. Austin E. et al, Guidelines for the estimation of fetomaternal haemorrhage, BCSH FMH Guidelines, 2009
4. Pelikan D.M. et al, Quantification of fetomaternal hemorrhage : a comparative study of the manual and automated microscopic Kleihauer-Betke tests and flow cytometry in clinical samples, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004;191:551-557
5. Pora V. et al, Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method : evaluation of the fetal cell count kit, *Transfusion*, 2007;47:1281-1289
6. Rigal D. et al, Les allo-immunisations fœto-maternelles anti-érythrocytaires : état de l'art en 2008, *Revue francophone des laboratoires*, 2008; 402:51-62
7. Bassan C., Mise au point technique d'une nouvelle méthode de quantification des hématies contenant de l'hémoglobine fœtale par cytométrie de flux. Comparaison avec le test de Kleihauer, 2013 [Internet]. [cité 17 mars 2018].
Disponible sur : <http://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/4d660699-5e76-43a3-9ea1-c31d352b8551>
8. Pastoret C., Le Priol J., Fest T., Roussel M., Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2013;84B:37-43
9. SH-FORM-43.doc [Internet]. [cité 25 févr 2018].
Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/documentation/SH-FORM-43>

10. SH-GTA-04.pdf [Internet]. [cité 22 févr 2018].

Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>

11. SH-GTA-14.pdf [Internet]. [cité 23 sept 2018].

Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>

12. Biologie Médicale – Nomenclature des Actes, 2018 [Internet]. [cité 23 févr 2018].

Disponible sur : http://www.codage.ext.cnamts.fr/f_mediam/fo/nabm/DOC.pdf

13. Iyer R. et al, False positive Kleihauer tests and unnecessary administration of anti-D immunoglobulin, Clin. Lab. Haem., 2003;25:405-408

ANNEXES

Annexe I	Organigramme de direction du GHSC.....	34
Annexe II	Organisation fonctionnelle au sein du laboratoire.....	35
Annexe III	Cartographie des processus du laboratoire.....	36
Annexe IV	État des lieux des pratiques du TK au laboratoire du GHSC.....	37
Annexe V	Diagramme d'Ishikawa.....	38
Annexe VI	Analyse de risques.....	39

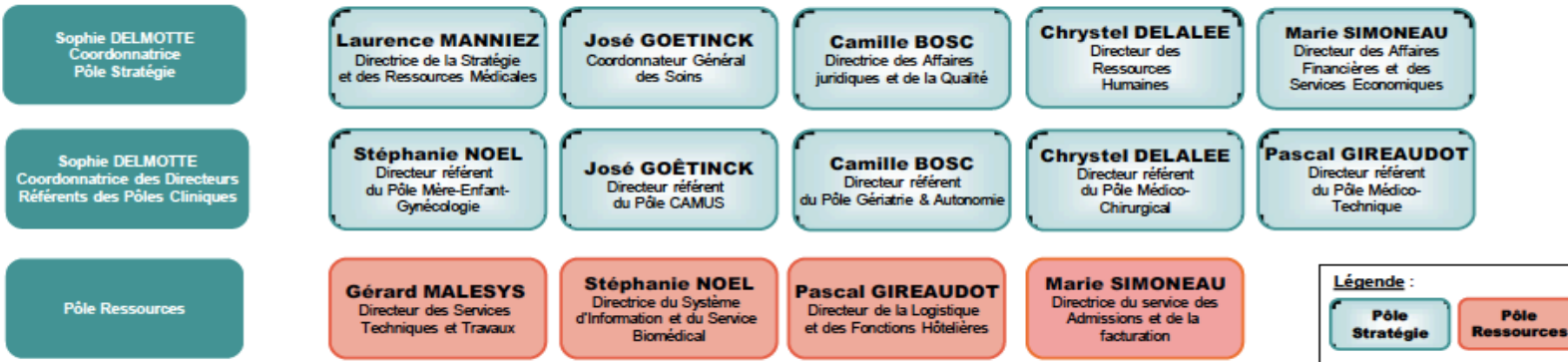
Annexe I

Organigramme de direction du GHSC

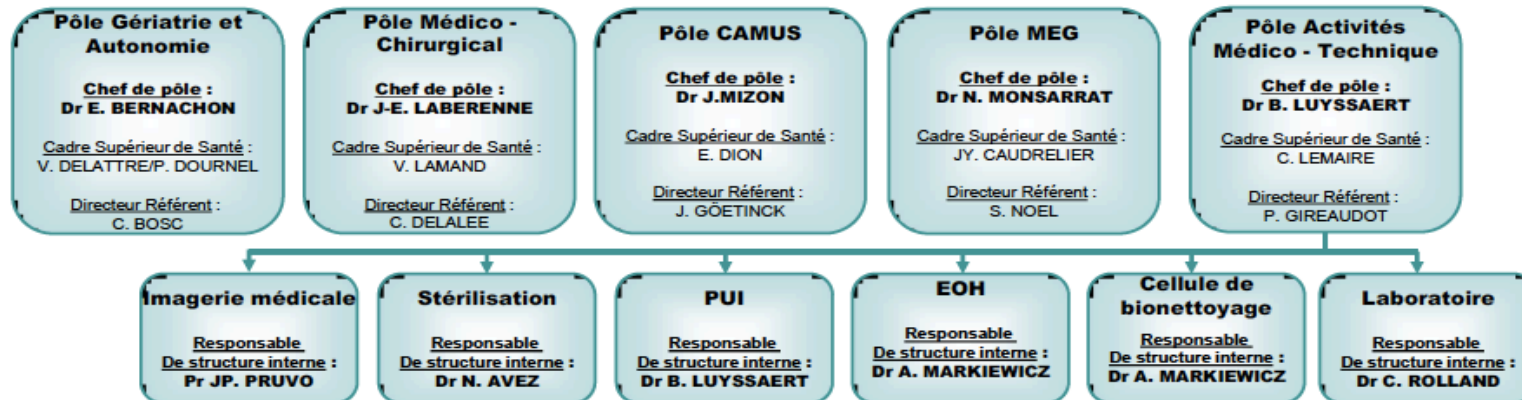
GOVERNANCE



Directions Fonctionnelles

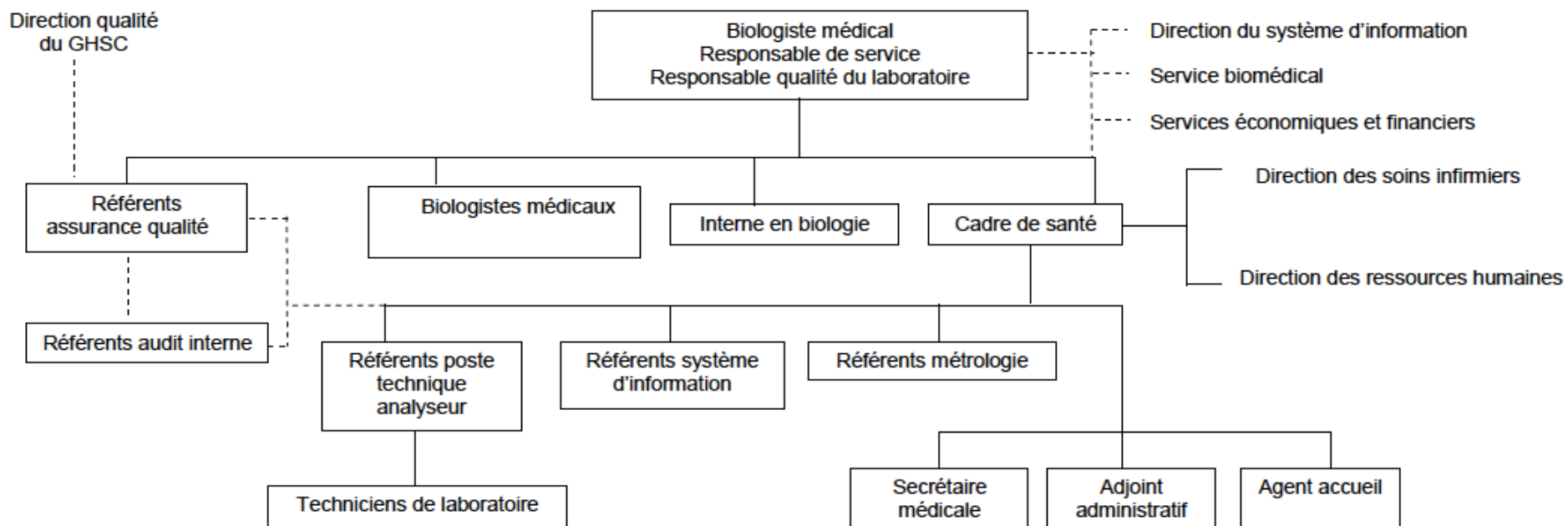


Pôles



Annexe II

Organisation fonctionnelle au sein du laboratoire

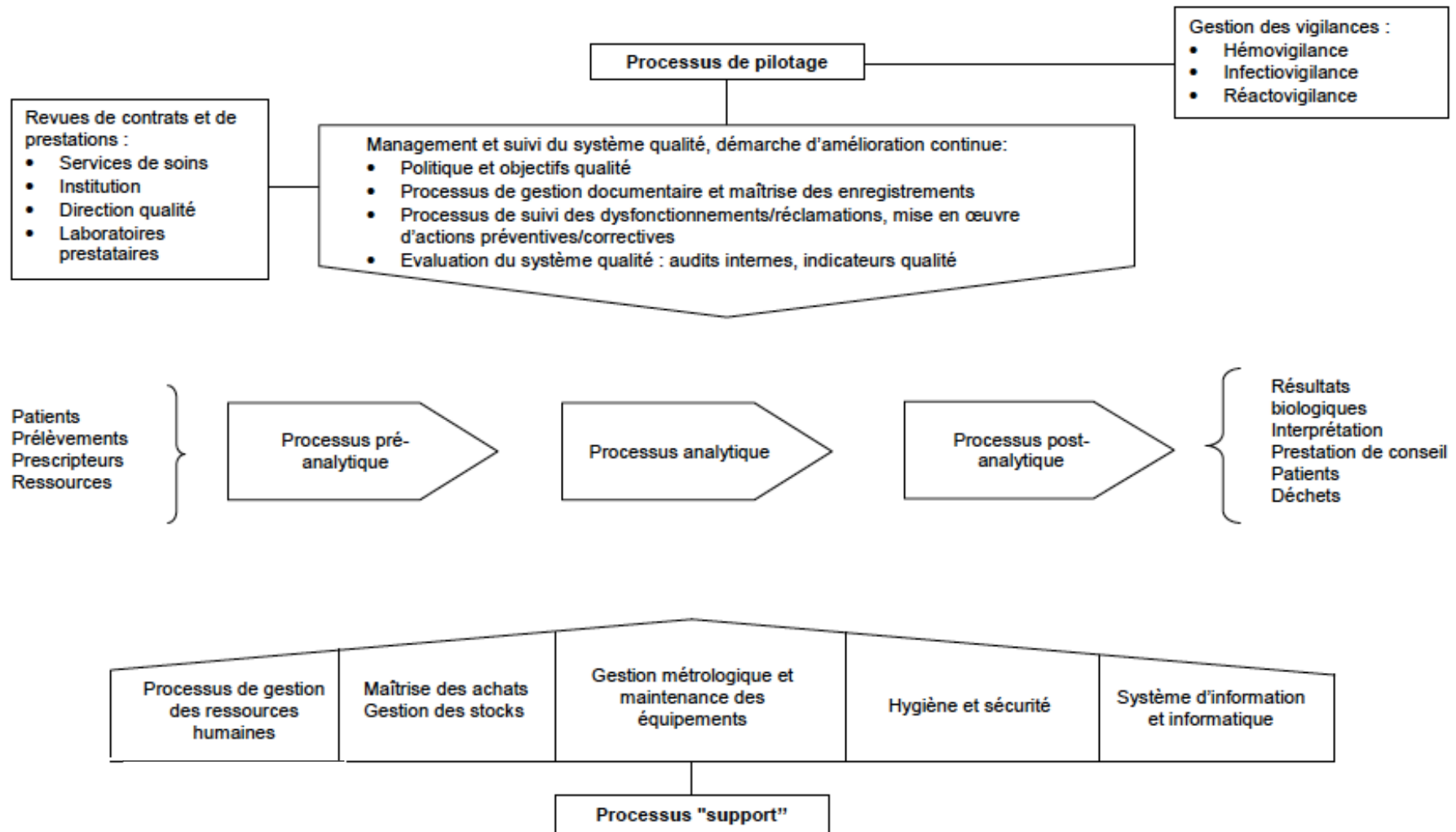


Légende : Lien hiérarchique : _____

Lien fonctionnel : - - - - -

Annexe III

Cartographie des processus du laboratoire



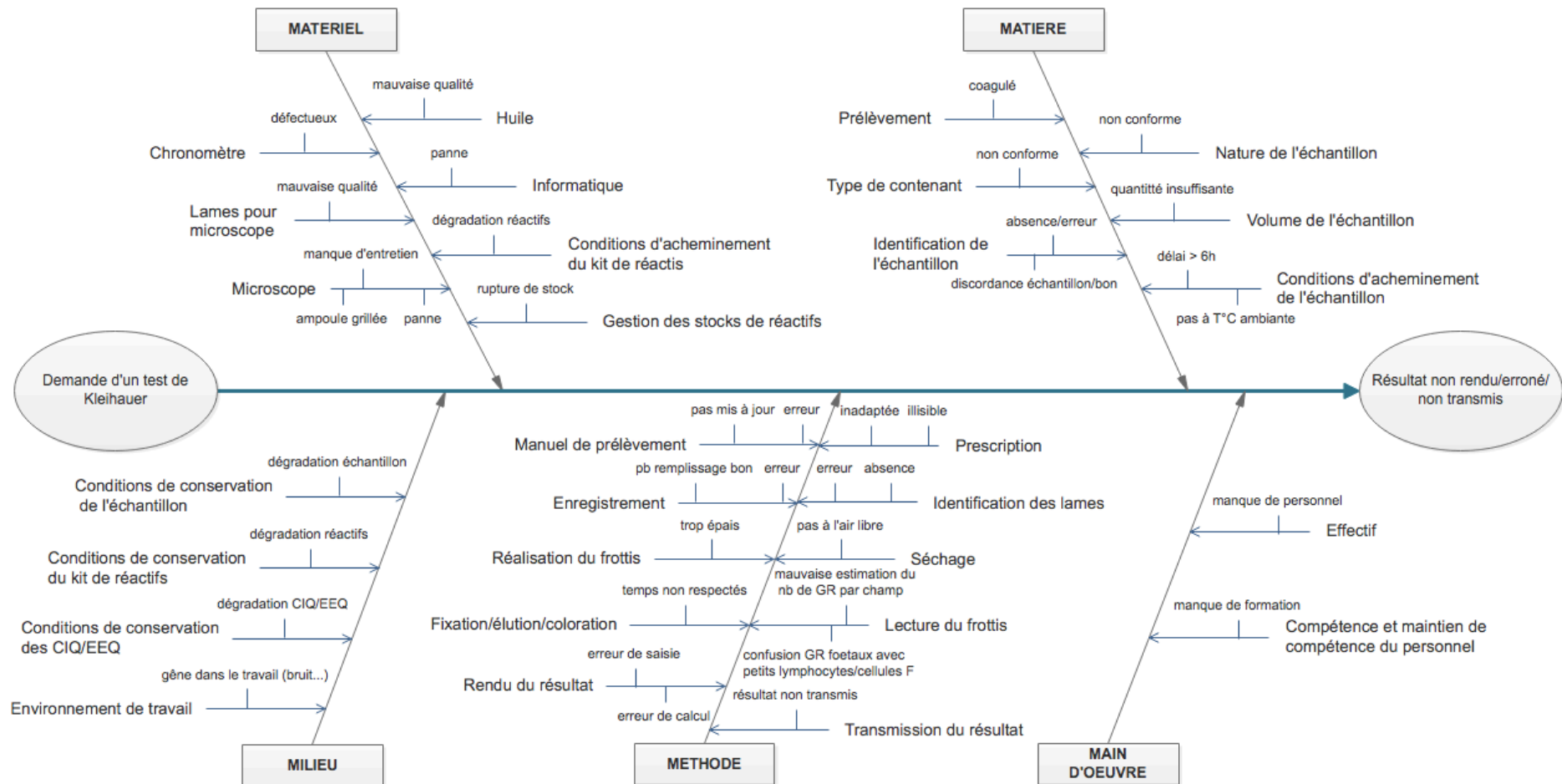
Annexe IV

État des lieux des pratiques du TK au laboratoire du GHSC

TLM	Dépôt de sang pour faire le frottis	Choix du témoin négatif	Choix du témoin positif	Fabrication du témoin positif	Mesure des temps de fixation - élution - coloration	Décompte du nombre d'hématies fœtales et maternelles
VA	Distributeur : petite goutte	Tube EDTA homme adulte	Tube EDTA bébé ≤ 3 j le plus récent possible	250 µL bébé 250 µL adulte (pipette Pasteur)	Téléphone portable	Objectif x100 dans une partie bien étalée : 50 champs (≈ 200 GR)
SA	Distributeur ou pipette Pasteur en plastique -> frottis fin	Tube EDTA patient pas anémié et pas une jeune femme	Tube EDTA bébé ≤ 3 j	Dilution sang bébé dans eau physiologique 60% bébé - 40% adulte (pipette Pasteur)	Élution : chronomètre Fixation/coloration : minuteur géant	Objectif x50 : pour les témoins, pour balayer les lames des patients Objectif x100 : 50 champs (≈ 200 GR)
CC	Distributeur -> frottis très fin	Tube EDTA du jour au hasard	Tube EDTA bébé	50% bébé 50% adulte (pipette automatique)	Chronomètre	Objectif x100 : - : balaie frottis sans compter nb de champs + : ≈ 50 champs homogènes (200-250 GR)
PD	Pipette automatique -> frottis fin	Tube EDTA adulte au hasard mais pas une dame jeune, bien rempli	Tube EDTA bébé ≤ 3 j	1 goutte bébé 10 gouttes adulte (soit 0,5 mL)	Fixation : tél fixe ou PC Élution/coloration : téléphone portable	Lame balayée Objectif x50 si - Objectif x100 si + : 40-50 champs (≈ 250 GR) ou plus puis produit en croix pour 10 000 GR
DG	Pipette automatique : la plus petite goutte possible	Tube EDTA adulte du jour ou de la veille, pas une jeune femme	Tube EDTA bébé ≤ 3 j	1 goutte bébé 9 gouttes adulte	Chronomètre	Objectif x50 : mise au point Objectif x100 : 1 champ (≈ 200 GR), 50 champs comptés dans la zone
DH	Pipette automatique ou pipette Pasteur en plastique -> frottis fin uniforme	Tube EDTA adulte au hasard	Tube EDTA bébé	Mélange au hasard	Téléphone portable	Objectif x50 pour voir l'ensemble Objectif x100 : 50 champs (≈ 200 GR)
CH	Pipette automatique -> frottis fin	Tube EDTA homme adulte	Tube EDTA bébé ≤ 5 j	2 gouttes bébé 4-5 gouttes adulte	Chronomètre	Objectif x50 : vision globale (+ ou -) Objectif x100 : estimation du nb de GR/champ (≈ 250-300), 35-40 champs comptés
MP	Pipette automatique : petite goutte	Tube EDTA homme adulte avec Hb = 12-13 g/dL	Tube EDTA bébé ≤ 3 j	10 µL bébé 4-5 gouttes adulte	Chronomètre	Objectif x10 : vision globale Objectif x100 : 50 champs (200 GR)
IR	Pipette automatique : petite goutte	Tube EDTA homme adulte	Tube EDTA bébé ≤ 3 j	1 goutte bébé 2 gouttes adulte	Chronomètre	Objectif x50 : vision globale (+ ou -) Objectif x100 : 50 champs homogènes (200 GR) Utilisation d'un compteur
JS	Pipette automatique : petite goutte	Tube EDTA homme adulte	Tube EDTA bébé ≤ 3 j	3 gouttes bébé 6 gouttes adulte	Chronomètre	Objectif x100 : 50 champs (200 GR)
SVL	Pipette automatique ou distributeur -> frottis le plus fin possible	Tube EDTA adulte du jour, de préférence un homme ou une dame âgée	Tube EDTA bébé ≤ 3 j du jour ou de la veille	2-3 gouttes bébé 5-6 gouttes adulte	Chronomètre	Objectif x100 : 50 champs (≈ 200 GR)

Annexe V

Diagramme d'Ishikawa



Annexe VI

Analyse de risques

5M	Points critiques	Risques identifiés	Criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matière (échantillons)	Identification de l'échantillon	Absence ou erreur d'identification	5	Formation/information du personnel à la réception et des préleveurs, Contrôle à réception	Identification des demandes d'examens biologiques BIO.PO.PRE.002, Erreur d'identité lors d'un bilan biologique PO.VIGI.001, Vérification de conformité des analyses à réception PO.PRE.006, Critères de conformité à réception des échantillons biologiques RI.PRE.030
		Discordance entre l'échantillon et le bon de demande			
	Prélèvement	Prélèvement coagulé	2	Formation/information des préleveurs	Choix du matériel pour la réalisation d'un acte de biologie BIO.RI.PRE.003
	Type de contenant	Contenant non conforme	1	Formation/information des préleveurs : sang total prélevé sur EDTA-K2, Contrôle à réception	Manuel de prélèvement BIO.RI.PRE.001, Choix du matériel pour la réalisation d'un acte de biologie BIO.RI.PRE.003, Vérification de conformité des analyses à réception PO.PRE.006, Critères de conformité à réception des échantillons biologiques RI.PRE.030
	Nature de l'échantillon	Échantillon non conforme	1		
	Volume de l'échantillon	Quantité insuffisante	1		
Conditions d'acheminement	Délai non respecté (>6h) Température non respectée (pas à T°C ambiante)	4	Contrôle à réception, Formation/information des coursiers et du personnel des services cliniques	Vérification de conformité des analyses à réception PO.PRE.006, Critères de conformité à réception des échantillons biologiques RI.PRE.030, Manuel de prélèvement BIO.RI.PRE.001, Acheminement des échantillons biologiques au laboratoire BIO.PO.PRE.001	
Milieu	Conditions de conservation pré-analytique de l'échantillon	Dégradation de l'échantillon -> élution incorrecte	5	Métrologie du réfrigérateur	Notice du fournisseur de réactifs, Enregistrements métrologiques des sondes de T°C : Procédure d'utilisation du logiciel Vigitemp et de la centrale de surveillance de températures PO.MET.010, Vérification journalière des températures PO.MET.011, Procédure TK PO.HEM.CYT.001, Procédure de conservation pré-analytique des échantillons biologiques PO.PRE.010
	Conditions de conservation du kit de réactifs	Dégradation des réactifs -> élution incorrecte, coloration inconsistante	5	Conditions environnementales de la pièce de travail	Notice du fournisseur de réactifs, Procédure TK PO.HEM.CYT.001, Enregistrements métrologiques des sondes de T°C : Procédure d'utilisation du logiciel Vigitemp et de la centrale de surveillance de températures PO.MET.010, Vérification journalière des températures PO.MET.011, Nettoyage/entretien du climatiseur

5M	Points critiques	Risques identifiés	Criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Milieu	Conditions de conservation des CIQ/EEQ	Dégradation des CIQ/EEQ -> mauvais suivi des performances du TK	4	Métrologie du réfrigérateur	Notice des fournisseurs de CIQ/EEQ, Procédure TK PO.HEM.CYT.001, Enregistrements métrologiques des sondes de T°C : Procédure d'utilisation du logiciel Vigitemp et de la centrale de surveillance de températures PO.MET.010, Vérification journalière des températures PO.MET.011
	Environnement de travail	Gêne dans le travail (paillasse encombrée, bruit, problème de luminosité)	2	Optimisation du poste de travail	« 5S » : paillasse rangée, endroit calme, lumière du jour
Matériel : équipements	Microscope optique	Panne, ampoule grillée, manque d'entretien -> lecture du frottis impossible ou difficile	5	Lecture du frottis	Intervention de la société, Recours à un microscope de secours, Bonne gestion des stocks (ampoule de rechange) : Procédure générale de réception et de gestion des stocks des réactifs et consommables de laboratoire PG.STOC.001, Enregistrements des maintenances, Nettoyages et réglages réguliers : Procédure opératoire d'utilisation et entretien des microscopes PO.PM.005
	Lames pour microscope	Mauvaise qualité	3	Qualité des lames	Bon choix du fournisseur : lames en verre dégraissées avec une marge dépolie
	Huile à immersion	Mauvaise qualité -> lecture du frottis difficile	1	Qualité de l'huile	Bon choix du fournisseur
	Chronomètre	Chronomètre défectueux -> temps de fixation/élution/ coloration non respectés	4	Suivi métrologique	Traçabilité métrologique (horloge parlante)
	Informatique	Panne -> impossibilité de saisir le résultat	2	Transmission du résultat	Organisation en mode dégradé suite à une panne du SGL PO.INF.SYN.007, Communication téléphonique du résultat
Matériel : réactifs	Gestion des stocks	Rupture de stock de kits Kleihauer au laboratoire	5	Stock minimal de kits Kleihauer	Procédure générale de réception et de gestion des stocks des réactifs et consommables de laboratoire PG.STOC.001
	Conditions d'acheminement du kit	Dégradation des réactifs	3	Contrôle à réception de l'intégrité du kit	
Méthode	Manuel de prélèvement	Erreur ou absence de mise à jour	2	Révisions régulières	Procédure générale de gestion et maîtrise documentaire PG.QUA.001
	Prescription	Illisible ou inadaptée	2	Contrôle à réception	Prescription connectée en cours de réflexion, appeler le médecin
	Prélèvement				Cf matière

5M	Points critiques	Risques identifiés	Criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Méthode	Acheminement	Cf matière			
	Enregistrement	Erreur ou problème de remplissage du bon de demande	4	Remplissage des bons de demande par le personnel soignant	Identification des demandes d'examen biologiques BIO.PO.PRE.002
	Conservation pré-analytique du prélèvement	Cf milieu			
	Identification des lames	Absence ou erreur d'identification	5	Formation/information du personnel	Erreur d'identité lors d'un bilan biologique PO.VIGI.001
	Réalisation du frottis	Frottis trop épais -> élution incorrecte	5	Épaisseur du frottis	Recommandations du fournisseur de réactifs, Procédure TK PO.HEM.CYT.001 : déposer 1 petite goutte de sang et abaisser suffisamment la lamelle pour faire un frottis fin
	Séchage à toutes les étapes	Séchage pas à l'air libre -> élution incorrecte	5	Conditions de séchage	Notice du fournisseur de réactifs, Procédure TK PO.HEM.CYT.001
	Fixation	Sur-fixation -> élution incorrecte	5	Temps	
	Élution	Élution trop courte/longue -> élution incorrecte	5		
	Coloration	Coloration trop courte/longue -> coloration incorrecte	5		Notice du fournisseur de réactifs, Procédure TK PO.HEM.CYT.001, Témoins positif et négatif à base de sang frais
	Lecture du frottis	Confusion des hématies fœtales avec les petits lymphocytes -> résultat surestimé/faux positif	5	Savoir reconnaître les hématies fœtales	Formation du personnel, Lecture des CIQ/EEQ
		Confusion des hématies fœtales avec les hématies intermédiaires (cellules F) -> résultat surestimé/faux positif			Formation du personnel, Lecture des CIQ/EEQ, Utilisation du kit Kleihauer à la place d'une coloration manuelle, Renseignements cliniques du patient obligatoires sur bon de demande
		Mauvaise estimation du nombre d'hématies par champ -> résultat sur/sous-estimé		Estimation du nombre d'hématies par champ	Commande d'un nouveau microscope avec une grille de comptage
Rendu du résultat	Erreur de saisie	5	Saisie manuelle du résultat	Saisie manuelle de résultats dans le SGL PO.INF.SYN.002, Impression de la feuille de travail après saisie (+/-) et vérification de la saisie du chiffre si +	

5M	Points critiques	Risques identifiés	Criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Méthode	Rendu du résultat	Erreur de calcul	5	Addition des hématies fœtales comptées dans chaque champ	Utilisation d'un compteur
	Transmission du résultat	Résultat non transmis au clinicien	5	Transmission informatique ou orale du résultat au clinicien	Connexion du SGL avec le serveur de résultats, Valeurs critiques de résultats à téléphoner en urgence RI.POST.005
Main d'œuvre (personnel)	Effectif	Manque de personnel	5	Polyvalence des TLM	Formation/Habilitation de la majorité des TLM au TK
	Compétence et maintien de compétence du personnel (TLM et biologistes)	Manque de formation	5	Formation du personnel à la technique	Procédure TK PO.HEM.CYT.001
				Formation du personnel à la lecture du frottis	Lecture en double avec un personnel habilité
				Habilitation	Lecture de lames
			Maintien des compétences	Lecture des CIQ/EEQ	

RÉSUMÉ

Le test de Kleihauer permet de mettre en évidence la présence d'hématies fœtales dans le sang maternel. Il repose sur le principe selon lequel l'hémoglobine F des hématies fœtales est plus résistante à l'élution à pH acide que l'hémoglobine A des hématies adultes. Le but de ce test est de détecter une hémorragie fœto-maternelle (HFM) et d'évaluer l'importance du saignement. Il permet également d'adapter la dose d'immunoglobulines anti-D (Rhophylac®) à injecter en fonction du volume de l'HFM en prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-Rh D chez les femmes Rh D négatives et de la maladie hémolytique du nouveau-né lors d'une grossesse ultérieure.

Au laboratoire de Seclin, le test de Kleihauer a fait l'objet d'une vérification de méthode (portée A). Une analyse de risques, une évaluation des performances et une vérification bibliographique ont donc été réalisées. Il en ressort différents problèmes : CIQ et EEQ difficiles à lire, grande variabilité inter-opérateurs, incertitudes de mesure élevées, manque d'expérience des techniciens.

En l'état actuel, le test de Kleihauer ne sera pas présenté au COFRAC pour accréditation car il reste encore des améliorations à faire.