

Université de Limoges
Faculté de Médecine

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement
le 27 avril 2018
par

Marc LABRIFFE

né le 25 août 1989, à Angers

**Validation initiale des performances du microscope automatisé
DM1200 et application dans le suivi pronostique du sepsis**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Jean Feuillard
M. le Professeur Franck Saint-Marcoux
M. le Professeur Philippe Vignon
M. le Docteur David Rizzo
M^{me} le Docteur Estelle Guérin

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité





Université de Limoges
Faculté de Médecine

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement

le 27 avril 2018

par

Marc LABRIFFE

né le 25 août 1989, à Angers

**Validation initiale des performances du microscope automatisé
DM1200 et application dans le suivi pronostique du sepsis**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Jean Feuillard
M. le Professeur Franck Saint-Marcoux
M. le Professeur Philippe Vignon
M. le Docteur David Rizzo
M^{me} le Docteur Estelle Guérin

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité





Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 1^{er} septembre 2017

| | |
|-------------------------------|---|
| ABOYANS Victor | CARDIOLOGIE |
| ACHARD Jean-Michel | PHYSIOLOGIE |
| ALAIN Sophie | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| ARCHAMBEAUD Françoise | MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020) |
| AUBARD Yves | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| AUBRY Karine | O.R.L. |
| BEDANE Christophe | DERMATO-VENEREOLOGIE |
| BERTIN Philippe | THERAPEUTIQUE |
| BESSEDE Jean-Pierre | O.R.L. (Surnombre jusqu'au 31-08-2018) |
| BORDESSOULE Dominique | HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018) |
| CAIRE François | NEUROCHIRURGIE |
| CHARISSOUX Jean-Louis | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE |
| CLAVERE Pierre | RADIOTHERAPIE |
| CLEMENT Jean-Pierre | PSYCHIATRIE d'ADULTES |
| COGNE Michel | IMMUNOLOGIE |
| CORNU Elisabeth | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| COURATIER Philippe | NEUROLOGIE |
| DANTOINE Thierry | GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT |
| DARDE Marie-Laure | PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE |
| DAVIET Jean-Christophe | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| DESCAZEAUD Aurélien | UROLOGIE |



| | |
|------------------------------------|--|
| DES GUETZ Gaëtan | CANCEROLOGIE |
| DESSPORT Jean-Claude | NUTRITION |
| DRUET-CABANAC Michel | MEDECINE et SANTE au TRAVAIL |
| DUMAS Jean-Philippe | UROLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018) |
| DURAND-FONTANIER Sylvaine | ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE) |
| ESSIG Marie | NEPHROLOGIE |
| FAUCHAIS Anne-Laure | MEDECINE INTERNE |
| FAUCHER Jean-François | MALADIES INFECTIEUSES |
| FAVREAU Frédéric | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| FEUILLARD Jean | HEMATOLOGIE |
| FOURCADE Laurent | CHIRURGIE INFANTILE |
| GAUTHIER Tristan | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| GUIGONIS Vincent | PEDIATRIE |
| JACCARD Arnaud | HEMATOLOGIE |
| JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile | IMMUNOLOGIE |
| LABROUSSE François | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| LACROIX Philippe | MEDECINE VASCULAIRE |
| LAROCHE Marie-Laure | PHARMACOLOGIE CLINIQUE |
| LIENHARDT-ROUSSIE Anne | PEDIATRIE |
| LOUSTAUD-RATTI Véronique | HEPATOLOGIE |
| LY Kim | MEDECINE INTERNE |
| MABIT Christian | ANATOMIE |
| MAGY Laurent | NEUROLOGIE |
| MARIN Benoît | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| MARQUET Pierre | PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE |



| | |
|--------------------------------------|---|
| MATHONNET Muriel | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| MELLONI Boris | PNEUMOLOGIE |
| MOHTY Dania | CARDIOLOGIE |
| MONTEIL Jacques | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE |
| MOREAU Jean-Jacques | NEUROCHIRURGIE |
| MOUNAYER Charbel | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| NATHAN-DENIZOT Nathalie | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| NUBUKPO Philippe | ADDICTOLOGIE |
| PARAF François | MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE |
| PLOY Marie-Cécile | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| PREUX Pierre-Marie | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| ROBERT Pierre-Yves | OPHTALMOLOGIE |
| SALLE Jean-Yves | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| SAUTEREAU Denis | GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE |
| STURTZ Franck | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre | ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES |
| TREVES Richard | RHUMATOLOGIE |
| TUBIANA-MATHIEU Nicole | CANCEROLOGIE |
| VALLEIX Denis | ANATOMIE |
| VERGNENEGRE Alain | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| VERGNE-SALLE Pascale | THERAPEUTIQUE |
| VIGNON Philippe | REANIMATION |
| VINCENT François | PHYSIOLOGIE |
| WEINBRECK Pierre | MALADIES INFECTIEUSES |
| YARDIN Catherine | CYTOLOGIE et HISTOLOGIE |



PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

BARRAUD Olivier

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

BOURTHOUMIEU Sylvie

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

BOUTEILLE Bernard

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

CHABLE Hélène

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
(Retraite au 31-07-2018)

DURAND Karine

BIOLOGIE CELLULAIRE

ESCLAIRE Françoise

BIOLOGIE CELLULAIRE

HANTZ Sébastien

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

JACQUES Jérémie

GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE

JESUS Pierre

NUTRITION

LE GUYADER Alexandre

CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE

LIA Anne-Sophie

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

MURAT Jean-Benjamin

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

QUELVEN-BERTIN Isabelle

BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE

RIZZO David

HEMATOLOGIE

TCHALLA Achille

GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT

TERRO Faraj

BIOLOGIE CELLULAIRE

WOILLARD Jean-Baptiste

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS



PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel (Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019)

DUMOITIER Nathalie (Responsable du département de Médecine Générale)

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

MENARD Dominique (du 1^{er} septembre 2016 au 12 janvier 2018)

PREVOST Martine (du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan (du 1^{er} septembre 2016 au 31 août 2019)

LAUCHET Nadège (du 1^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule (du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01.09.2017 au 31.08.2019

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2016 au 31.08.2018

BONNAUD François du 01.09.2017 au 31.08.2019

DE LUMLEY WOODYEAR Lionel du 01.09.2017 au 31.08.2019

DENIS François du 01.09.2017 au 31.08.2019

GAINANT Alain du 01.09.2017 au 31.08.2019

MERLE Louis du 01.09.2017 au 31.08.2019

MOULIES Dominique du 01.09.2015 au 31.08.2018

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2014 au 31.08.2018

VIROT Patrice du 01.09.2016 au 31.08.2018



Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2017

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

| | |
|----------------------------|---|
| BASTIEN Frédéric | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE |
| BAUDRIER Fabien | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| CHARISSOUX Aurélie | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| CHARPENTIER Mathieu | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| DUCHESNE Mathilde | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| FAYE Piere-Antoine | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| GAUTHIER François | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| KONG Mélody | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| LARRADET Matthieu | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE (Démission à compter du 1 ^{er} janvier 2018) |
| LEGRAS Claire | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (Surnombre du 1 ^{er} novembre 2017 au 20 février 2018 inclus) |
| MARQUET Valentine | HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE |

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

| | |
|-------------------------------|---|
| AZAÏS Julie | MEDECINE INTERNE A |
| BAUDONNET Romain | OPHTALMOLOGIE |
| BIDAUT-GARNIER Mélanie | OPHTALMOLOGIE (A compter du 11 mai 2016) |
| BLOSSIER Jean-David | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| BOSETTI Anaïs | GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT |
| BOUKEFFA Nejma | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| BOUSQUET Pauline | PEDIATRIE (A compter du 09 janvier 2017) |



| | |
|------------------------------------|---|
| CHAMPIGNY Marie-Alexandrine | PEDIATRIE |
| CHRISTOU Niki | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| COLOMBIÉ Stéphanie | MEDECINE INTERNE A (A compter du 02 mai 2017) |
| COMPAGNAT Maxence | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| CROSSE Julien | PEDIATRIE |
| DANTHU Clément | NEPHROLOGIE |
| DARNIS Natacha | PEDOPSYCHIATRIE |
| DELUCHE Elise | CANCEROLOGIE |
| DE POUILLY-LACHATRE Anaïs | RHUMATOLOGIE (A compter du 02 mai 2017) |
| DIDOT Valérian | CARDIOLOGIE |
| DUSSAULT-JARLAN Lucile | CARDIOLOGIE |
| EVARD Bruno | REANIMATION |
| FAURE Bertrand | PSYCHIATRIE d'ADULTES |
| FAYEMENDY Charlotte | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| GARDIC Solène | UROLOGIE |
| GORDIENCO Alen | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE |
| GOUDELIN Marine | REANIMATION |
| HARDY Jérémy | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| KRETZSCHMAR Tristan | PSYCHIATRE d'ADULTES |
| LACHATRE Denis | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| LACOSTE Marie | MALADIES INFECTIEUSES |
| GSCHWIND Marion | MEDECINE INTERNE B |
| LAFON Thomas | MEDECINE d'URGENCE |
| LAHMADI Sanae | NEUROLOGIE |



| | |
|------------------------------|---|
| LATHIERE Thomas | OPHTALMOLOGIE |
| LEHMAN Lauriane | GASTROENTEROLOGIE |
| LEPETIT Hugo | GASTROENTEROLOGIE |
| MARGUERITTE François | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| MARTINS Elie | CARDIOLOGIE |
| PRUD'HOMME Romain | DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE |
| RAMIN Lionel | ORL |
| ROUCHAUD Aymeric | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI) |
| ROUSSELLET Olivier | NEUROLOGIE |
| SAINT PAUL Aude | PNEUMOLOGIE (Démission à compter du 23 décembre 2017) |
| SALLE Henri | NEUROCHIRURGIE |
| SANGLIER Florian | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| TAÏBI Abdelkader | ANATOMIE |
| USSEGLIO-GROSSO Julie | CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE |
| VAYSSE VIC Mathieu | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| VITAL Pauline | MEDECINE INTERNE B |
| VITALE Gaetano | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE |

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

DOIN Corinne

RUDELLE Karen

SEVE Léa



PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin

CHIRURGIE INFANTILE

(du 1^{er} mai 2015 au 30 avril 2019)

CROS Jérôme

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

(du 1^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)

LERAT Justine

O.R.L. (du 1^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)

MATHIEU Pierre-Alain

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE

(du 1^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)





A mes deux frères,

Matthieu et Martin,

Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent,

Ce travail est un témoignage de mon attachement.





*« La science, c'est ce que le père enseigne à son fils.
La technologie, c'est ce que le fils enseigne à son papa. »*
Michel Serres.¹

¹ *Interview dans Le Monde du 18 juin 2001.*





Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean Feuillard. Vous me faites le grand honneur d'accepter d'être le président de ce jury. Pour votre accueil au sein du service, et vos conseils avisés, veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Estelle Guérin. Tu m'as accordé ta confiance dans ce beau projet. Pour ton soutien, ta disponibilité tout au long de ce travail. Reçois ici mes remerciements les plus sincères. Trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur David Rizzo. Par ta patience et ton immense savoir, tu as su me faire découvrir l'hématocytologie. Reçois ici l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux. Tu me fais l'honneur d'accepter de juger ce travail. Trouve dans celui-ci le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Philippe Vignon. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Franck Trimoreau. Ton aide, au cours de la réalisation de cette validation de méthode, m'a été très précieuse. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse.

A Sophie Dupuy, Claire Bernard, Alexia Marcillou et à l'ensemble du personnel du service d'hématologie biologique, pour votre accueil, votre sympathie, votre disponibilité et pour avoir partagé vos connaissances au cours des deux stages réalisés pendant mon internat.

Un grand merci à mes co-internes Sébastien et Malika qui m'ont bien aidé en validant des frottis sanguins parfois difficiles sur le DM !

A mes parents, merci pour votre patience et votre indéfectible soutien pendant ces longues études !

A mes amis de Vannes, avec lesquels je partage mes histoires d'hôpital, voyager avec vous est toujours une aventure périlleuse !

A mes « grandes sœurs de biologie », Marie-Fleur et Audrey ! Qui m'ont accueilli au labo la veille même de mon premier jour de stage ! Et qui n'ont cessé de m'accompagner pendant tout l'internat.





Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





Table des matières

| | |
|--|----|
| Liste des abréviations..... | 31 |
| Introduction | 33 |
| I. Mise en place du DM en routine | 35 |
| I.1. Généralités | 35 |
| I.1.1. Définition d'une validation/vérification de méthode | 35 |
| I.1.2. Guides Cofrac nécessaires pour une validation-vérification de méthode | 35 |
| I.1.2.1 SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale » [7] et SH REF02 révision 05 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 » [8]..... | 36 |
| I.1.2.2 SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » [9] et SH INF 50 « Portée type d'accréditation » [10] | 36 |
| I.1.2.3 SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) - validation (portée B) des méthodes en biologie médicale [11]..... | 37 |
| I.1.2.4 SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale » [12] | 37 |
| I.1.2.5 SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale » [13]..... | 37 |
| I.1.3. Présentation des étapes d'une validation de méthode initiale | 38 |
| I.1.3.1 Expression de la portée d'accréditation..... | 38 |
| I.1.3.2 Choix de la portée : A ou B | 40 |
| I.1.3.3 Choix d'une portée flexible | 41 |
| I.1.3.4 Analyses quantitatives/qualitatives et choix du processus..... | 42 |
| I.1.3.5 Contenu d'un dossier de vérification/validation de méthode | 42 |
| I.1.3.5.1. Description de la méthode | 43 |
| I.1.3.5.2. Définitions des besoins du laboratoire | 43 |
| I.1.3.5.2.1. Recommandations des sociétés savantes | 44 |
| I.1.3.5.2.2. Pour les autres paramètres | 44 |
| I.1.3.5.3. Vérification bibliographique et expérimentale..... | 45 |
| I.1.3.5.4. Conclusion : déclaration d'aptitude de la méthode..... | 46 |
| I.1.3.6 Vérification expérimentale d'une méthode (portée A)..... | 47 |
| I.1.3.6.1. Fidélité..... | 47 |
| I.1.3.6.1.1. Répétabilité | 47 |
| I.1.3.6.1.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire | 48 |
| I.1.3.6.2. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude | 48 |
| I.1.3.6.3. Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure | 50 |
| I.1.3.6.4. Comparaison de méthodes..... | 53 |
| I.1.3.7 Vérification bibliographique d'une validation de méthode (portée A) | 54 |
| I.1.3.7.1. Evaluation de la contamination | 54 |
| I.1.3.7.2. Robustesse | 55 |
| I.1.3.7.3. Vérifications des intervalles de référence biologique (valeurs usuelles) ... | 55 |
| I.1.3.7.4. Sensibilité et spécificité analytique..... | 55 |
| I.1.4. Confirmation des performances en routine | 55 |
| I.1.4.1 Les contrôles de qualité en biologie médicale | 56 |
| I.1.4.1.1. Exploitation des CIQ..... | 56 |
| I.1.4.1.2. Exploitation des EEQ et des CIQ externalisés | 56 |

| | | |
|----------------|---|----|
| I.1.4.2 | Suivi des performances pour les méthodes de type quantitatif | 57 |
| I.1.4.2.1. | Exploitation des CIQ..... | 57 |
| I.1.4.2.2. | Exploitation des EEQ..... | 57 |
| I.1.4.2.3. | Incertitude de mesure..... | 58 |
| I.1.4.2.4. | Intervalle de référence..... | 58 |
| I.1.4.3 | Suivi des performances pour les méthodes de type qualitatif | 58 |
| I.1.4.3.1. | Exploitation des CIQ..... | 58 |
| I.1.4.3.2. | Exploitation des EEQ..... | 58 |
| I.1.4.3.3. | Maintien des compétences des opérateurs..... | 59 |
| I.1.4.3.4. | Maîtrise des conditions environnementales | 59 |
| I.1.4.3.5. | Maîtrise continue des équipements | 59 |
| I.1.4.3.6. | Maîtrise de l'échantillon primaire | 59 |
| I.1.4.3.7. | Maîtrise de la méthode et des réactifs | 59 |
| I.1.5. | Principes de fonctionnement du DM1200 | 60 |
| I.1.5.1 | Préparation des frottis sanguins | 60 |
| I.1.5.2 | Pré-classification..... | 61 |
| I.2. | Objectifs..... | 63 |
| I.3. | Méthodes et résultats..... | 65 |
| I.3.1. | Validation d'une méthode relative à une formule automatisée | 65 |
| I.3.1.1 | Situations au cours desquelles une formule au microscope (automatisé ou non) est réalisée | 65 |
| I.3.1.2 | Méthode qualitative ou quantitative ? | 65 |
| I.3.1.3 | Portée A ou B ?..... | 66 |
| I.3.2. | Validations de méthodes : paramètres quantitatifs | 66 |
| I.3.2.1 | Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier | 66 |
| I.3.2.2 | Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier | 67 |
| I.3.2.3 | Vérifications bibliographiques..... | 67 |
| I.3.2.4 | Plan d'expérience et mise en œuvre au laboratoire | 69 |
| I.3.2.5 | Résultats, interprétation | 69 |
| I.3.2.5.1. | Analyse de risques | 70 |
| I.3.2.5.1.1. | Étape pré-analytique | 70 |
| I.3.2.5.1.2. | Etape analytique | 71 |
| I.3.2.5.2. | Qualification/habilitation du personnel | 73 |
| I.3.2.5.3. | Suivi des confrontations internes cytomorphologiques et des EEQ..... | 73 |
| I.3.2.5.3.1. | Présentation des confrontations internes | 74 |
| I.3.2.5.3.2. | Présentation de l'EEQ | 75 |
| I.3.2.5.4. | Résultats | 76 |
| I.3.2.5.4.1. | PNN | 76 |
| I.3.2.5.4.1.1. | Tableau récapitulatif | 76 |
| I.3.2.5.4.1.2. | Conclusion..... | 76 |
| I.3.2.5.4.2. | PNE | 77 |
| I.3.2.5.4.2.1. | Tableau récapitulatif | 77 |
| I.3.2.5.4.2.2. | Conclusion..... | 77 |
| I.3.2.5.4.3. | PNB | 77 |
| I.3.2.5.4.3.1. | Tableau récapitulatif | 77 |
| I.3.2.5.4.3.2. | Conclusion..... | 77 |
| I.3.2.5.4.4. | Lymphocytes..... | 78 |
| I.3.2.5.4.4.1. | Tableau récapitulatif | 78 |



| | |
|--|-----|
| I.3.2.5.4.4.2. Conclusion..... | 78 |
| I.3.2.5.4.5. Monocytes | 79 |
| I.3.2.5.4.5.1. Tableau récapitulatif | 79 |
| I.3.2.5.4.5.2. Conclusion..... | 79 |
| I.3.2.5.4.6. Cellules atypiques..... | 79 |
| I.3.2.5.4.6.1. Tableau récapitulatif | 79 |
| I.3.2.5.4.6.2. Conclusion..... | 79 |
| I.3.2.5.4.7. Métamyélocytes | 80 |
| I.3.2.5.4.7.1. Tableau récapitulatif | 80 |
| I.3.2.5.4.7.2. Conclusion..... | 80 |
| I.3.2.5.4.8. Myélocytes | 80 |
| I.3.2.5.4.8.1. Tableau récapitulatif | 80 |
| I.3.2.5.4.8.2. Conclusion..... | 80 |
| I.3.2.5.4.9. Erythroblastes | 81 |
| I.3.2.5.4.9.1. Tableau récapitulatif | 81 |
| I.3.2.5.4.9.2. Conclusion..... | 81 |
| I.3.3. Validations de méthodes : paramètres qualitatifs..... | 82 |
| I.3.3.1 Tableau récapitulatif..... | 82 |
| I.3.3.2 Conclusion | 82 |
| I.3.4. Confirmation des performances en pratique quotidienne..... | 82 |
| I.4. Discussion | 85 |
| I.5. Conclusion | 89 |
| II. Immatures granuleux du sepsis : comparaison avec la CMF | 91 |
| II.1. Généralités | 91 |
| II.1.1. Sepsis | 91 |
| II.1.1.1 Epidémiologie | 91 |
| II.1.1.1.1. En France..... | 91 |
| II.1.1.1.2. Aux États-Unis..... | 91 |
| II.1.1.2 Enjeux du sepsis..... | 91 |
| II.1.1.3 Définitions du sepsis | 92 |
| II.1.1.3.1. Premières définitions | 92 |
| II.1.1.3.2. Nouvelles définitions..... | 93 |
| II.1.2. Physiopathologie des granuleux..... | 94 |
| II.1.3. Augmentation des immatures granuleux dans la phase aiguë du sepsis | 95 |
| II.1.3.1 Etude Septiflux 1 | 95 |
| II.1.3.2 Etude Septiflux 2..... | 96 |
| II.1.4. Limites en routine et objectifs | 97 |
| II.2. Matériel et méthodes | 99 |
| II.2.1. Passage des lames | 99 |
| II.2.2. Reclassement et validation des formules sanguines..... | 99 |
| II.3. Résultats..... | 101 |
| II.3.1. Exemples de photos prises par le DM1200 | 101 |
| II.3.2. Proportions de granuleux mal/non classés | 102 |
| II.3.3. Proportions de myélémies | 104 |
| II.3.4. Myélémie en fonction de l'évolution des patients | 104 |
| II.3.5. Corrélation des IG rendus par le DM avec les résultats de CD10dim/CD16dim en CMF | 105 |
| II.4. Discussion | 107 |



| | |
|---|-----|
| II.4.1. Corrélation myélémie et CD10dim/CD16dim | 107 |
| II.4.2. Granuleux mal et non classés | 107 |
| II.4.3. Anomalies morphologiques | 107 |
| II.4.4. Automate de CMF utilisable 24/7 : Aquios | 107 |
| II.4.5. Automatisation de la biologie médicale..... | 109 |
| II.4.6. Matériel connecté et partage | 109 |
| II.4.7. Sepsis : autres moyens d'évaluation pronostique | 110 |
| Conclusion | 111 |
| Références bibliographiques | 113 |
| Annexes | 117 |
| Serment d'Hippocrate..... | 131 |



Table des illustrations

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Microscope automatique DM1200 de Cellavision®..... | 34 |
| Figure 2 : Représentation de la fidélité (d'après le SH GTA 06)..... | 47 |
| Figure 3 : Représentation du biais et de l'inexactitude (d'après le SH GTA 06) | 49 |
| Figure 4 : Diagramme des 5M (d'après le SH GTA 14)..... | 50 |
| Figure 5 : Graphiques utilisés lors des études de comparaisons (d'après le SH GTA 04)..... | 54 |
| Figure 6 : Rangement des lames dans un magasin, et chargement du magasin dans l'automate..... | 60 |
| Figure 7 : Lecture des codes-barres du magasin et du frottis sanguin..... | 60 |
| Figure 8 : Repérage de la monocouche cellulaire et localisation des cellules nucléées au faible grossissement (objectif x10) ; capture des images cellulaires au fort grossissement (objectif x100)..... | 61 |
| Figure 9 : Affichage de la pré-classification des éléments figurés du sang (ici, PNN et lymphocytes), pour revue et vérification par un opérateur. | 62 |
| Figure 10 : Test de localisation cellulaire : une cellule « oubliée » par le DM (non encadrée en vert) est signalée par l'opérateur. | 73 |
| Figure 11 : Microscopie manuelle à l'objectif x100 : pour une numération à environ 7G/L, seulement 2 cellules sont ici visualisables dans un même champ (à gauche, blaste avec corps d'Auer ; à droite, lymphocyte). | 85 |
| Figure 12 : Définition du sepsis en 4 stades. | 92 |
| Figure 13 : Définition du sepsis selon Bone. MOF : Multi-Organe Failure durant le choc septique. | 93 |
| Figure 14 : Modèle en pipeline de la moelle osseuse, pour la production et le relargage de neutrophiles. Flèche A : pendant le recrutement actif des neutrophiles, ce point de libération peut remonter le pipeline avec une vitesse qui décrit l'âge de sortie des neutrophiles. PMN : polymorphonuclear neutrophils (PNN)..... | 94 |
| Figure 15 : Septiflux 1 : courbes de survie de Kaplan-Meier..... | 95 |
| Figure 16 : Expression du CD10 et du CD16 par groupe de patients..... | 96 |
| Figure 17 : Septiflux 2 : courbes de survie de Kaplan-Meier..... | 97 |
| Figure 18 : Lames incluses dans l'étude..... | 99 |
| Figure 19 : PNN contrôles. | 101 |
| Figure 20 : Souffrance des granuleux..... | 102 |
| Figure 21 : Pourcentages de granuleux mal/non classés par groupe..... | 103 |
| Figure 22 : Granuleux mal/non classés en fonction de la myélémie..... | 103 |
| Figure 23 : Pourcentages de myélémie par groupe. | 104 |
| Figure 24 : Pourcentages de myélémie par rapport à l'évolution clinique à J2, chez les 139 patients septiques. | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figure 25 : Myélémie du DM par rapport au CD10dim..... | 106 |
| Figure 26 : Myélémie du DM par rapport au CD16dim..... | 106 |
| Figure 27 : Automate de CMF Aquios CL de Beckman Coulter ; réactifs suivis par codes barres 2D situés en dessous des flacons de mix..... | 108 |



Table des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Portées-types d'accréditation en hématocytologie (d'après le SH INF 50). | 39 |
| Tableau 2 : Paramètres à valider/vérifier pour les méthodes quantitatives et qualitatives (d'après le SH GTA 04) | 46 |
| Tableau 3 : Valeurs normales de l'hémogramme du nouveau-né jusqu'à l'âge adulte..... | 68 |
| Tableau 4 : Résultats de la validation des PNN. | 76 |
| Tableau 5 : Résultats de la validation des PNE | 77 |
| Tableau 6 : Résultats de la validation des PNB. | 77 |
| Tableau 7 : Résultats de la validation des lymphocytes..... | 78 |
| Tableau 8 : Résultats de la validation des monocytes. | 79 |
| Tableau 9 : Résultats de la validation des cellules atypiques..... | 79 |
| Tableau 10 : Résultats de la validation des métamyélocytes..... | 80 |
| Tableau 11 : Résultats de la validation des myélocytes..... | 80 |
| Tableau 12 : Résultats de la validation des érythroblastes. | 81 |
| Tableau 13 : Résultats qualitatifs de l'identification des cellules atypiques. | 82 |
| Tableau 14 : Score SOFA. | 93 |
| Tableau 15 : Exemples de reclassement (G. : Granuleux)..... | 100 |
| Tableau 16 : Moyennes des granuleux mal/non classés par groupe..... | 102 |
| Tableau 17 : Moyennes de myélémie par groupe..... | 104 |





Liste des abréviations

ABP : association de biologie praticienne
ACCP : American college of chest physicians
AFC : association française de cytométrie
CE : conformité européenne
CFU-GM : colony forming unit granulocytaire monocytaire
CIL : comparaison inter-laboratoire
CIQ : contrôle interne de qualité
CMF : cytométrie de flux
CNQ : contrôle national de qualité
Cofrac : comité français d'accréditation
CV : coefficient de variation
DM : digital cell morphology system
DM-DIV : dispositif médical de diagnostic *in vitro*
EEQ : évaluation externe de la qualité
Env : environ
FI : fidélité intermédiaire
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
HAS : haute autorité de santé
IG : immatures granuleux
Inf : inférieur
LA : limite acceptable
LBM : laboratoire de biologie médicale
LMC : leucémie myéloïde chronique
MGG : May-Grünwald-Giemsa
MOF : multi-organe failure
MRC : matériaux de référence certifiés
NA : non applicable
PAM : pression artérielle moyenne
PNB : polynucléaire basophile
PNE : polynucléaire éosinophile
PNN : polynucléaire neutrophile
qSOFA : quick sequential organ failure assessment



SCCP : society of critical care medicine

SFBC : société française de biologie clinique

SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique

SMQ : système de management de la qualité

SOFA : sequential organ failure assessment

SPILF : société de pathologie infectieuse de langue française

Sup : supérieur

VIM : vocabulaire international de métrologie



Introduction

La cytologie a récemment connu une révolution avec l'apparition de la microscopie automatisée. Avant cela, la cytologie était limitée par l'absence de traçabilité (les frottis sanguins n'étaient pas mémorisés), la dépendance de l'expertise de l'opérateur, et surtout son caractère chronophage. Par la numérisation des images cellulaires, la pré-classification en catégories leucocytaires, et son automatisation, l'imagerie numérique permet ainsi de répondre aux nouvelles attentes des LBM (laboratoires de biologie médicale). Cette nouvelle technologie trouve également sa place devant les restrictions de personnel, de budget et l'augmentation du volume des analyses biologiques (regroupements de laboratoires). Et Siemens fait partie des compagnies qui fournissent ce matériel innovant, dont le Cellavision® DM1200 (digital cell morphology system) fait partie. Le DM propose une analyse morphologique du frottis sanguin, laissant au cytologiste le contrôle du résultat qu'il visualise à l'écran afin de le corriger et de le valider.

L'installation de ce nouveau matériel au sein d'un LBM s'inscrit dans la démarche d'accréditation. Et cette dernière permet une reconnaissance de la compétence du laboratoire, conformément à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [1]. Elle est régie selon la norme NF EN ISO 15189 version 2012 qui est le référentiel normatif [2]. Son objectif est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et la qualité de la prestation médicale offerte par le laboratoire [3], dans le seul intérêt du patient.

Nous avons testé ce matériel pendant la période de vérification de méthode, puis nous l'avons comparé à la CMF dans l'identification des IG (immatures granuleux) chez des patients septiques. En effet, le sepsis est une situation bien connue d'augmentation des «band-cells» et de la myélémie, équivalents cytologiques des immatures granuleux CD10dim et CD16dim en CMF. Au plan cytologique, ces situations sont mal codifiées et peu reproductibles. Par contre en CMF, dans une étude monocentrique [4], nous avons déjà montré le rôle majeur de la quantification précise des IG afin d'évaluer le risque de mortalité. Ces résultats sont confirmés dans une étude multicentrique en cours de publication [5]. Cette comparaison nous a ainsi permis d'évaluer directement les performances du DM, sa praticabilité et son intérêt potentiel dans les laboratoires de cytologie, et ce notamment dans des situations d'urgence.

Cette thèse présente la démarche et les résultats de la vérification de méthode et son application dans l'évaluation pronostique au cours du sepsis.



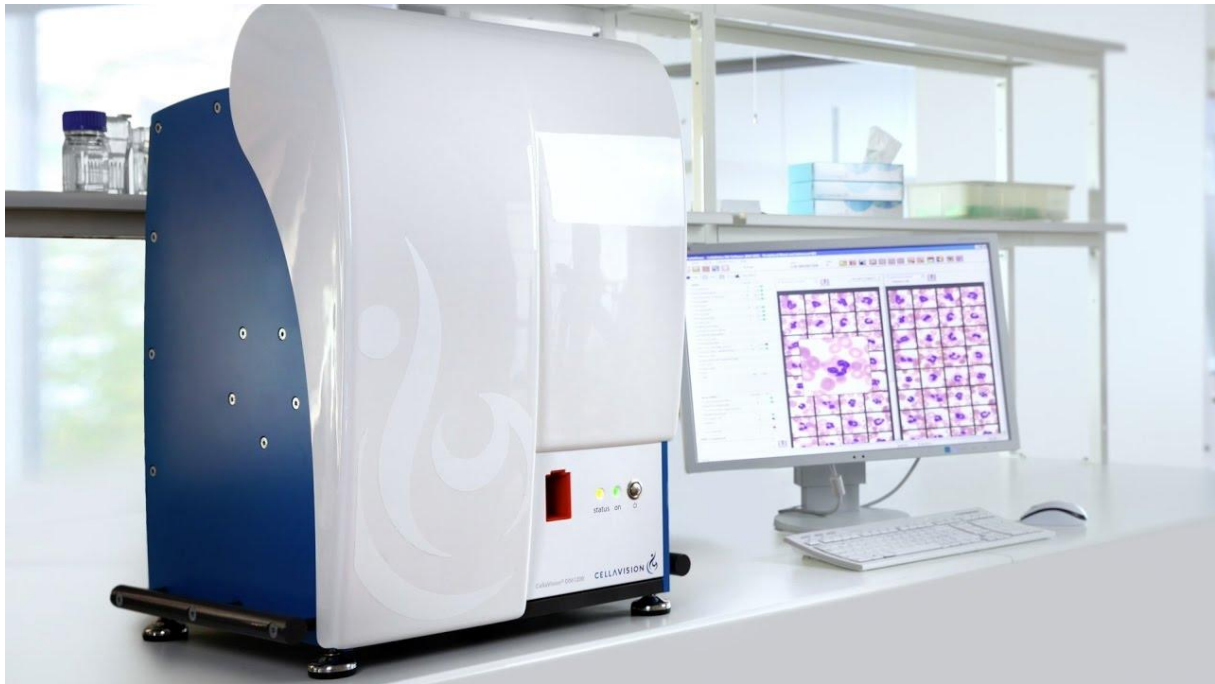


Figure 1 : Microscope automatique DM1200 de Cellavision®

Source : vidéo Youtube promotionnelle

I. Mise en place du DM en routine

I.1. Généralités

I.1.1. Définition d'une validation/vérification de méthode

Une **validation** de méthode correspond à la « confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites » [6].

Une **vérification** de méthode correspond à la « confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites » [6].

Pour la plupart des analyses, les LBM devront réaliser des **vérifications** de méthode. En effet, on **adopte** des méthodes reconnues ou normalisées qui sont considérées comme validées (DM-DIV marqué CE ou méthodes « fournisseur » utilisées dans leur domaine d'application). Il s'agit de s'assurer que les performances attendues par le laboratoire et annoncées par le fournisseur sont atteintes.

Dans le cas d'une **validation** de méthode, le laboratoire utilise :

- une méthode normalisée ou reconnue mais employée hors de son domaine d'application (méthode adaptée par rapport aux recommandations du fournisseur) ;

ou

- une méthode non reconnue développée ou mise en œuvre par l'équipe du LBM. Les recherches bibliographiques ainsi que les études expérimentales devront être plus approfondies.

I.1.2. Guides Cofrac nécessaires pour une validation-vérification de méthode

Les documents utiles à l'accréditation sont disponibles sur le site internet du Cofrac² dans la section « santé humaine ». Il s'agit :

- des documents de référence (REF)
- des guides techniques d'accréditation (GTA)
- des formulaires (FORM)
- des documents d'information (INF)

Ces documents sont mis à jour régulièrement et seule la version électronique fait foi.

Il faut savoir que les GTA sont les principaux documents nécessaires pour la réalisation des vérifications/validations de méthode en biologie médicale. Les recommandations présentées dans ces guides sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Toutefois, l'application des recommandations des GTA n'est pas obligatoire. En effet, le LBM garde la possibilité de répondre

² <http://www.cofrac.fr>



d'une autre manière aux exigences du référentiel mais toute autre démarche doit être argumentée et documentée [7]. Dans tous les cas, le laboratoire devra démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire les exigences de la norme.

Ces guides s'adressent aux LBM mais aussi aux auditeurs du Cofrac en tant que base d'harmonisation, aux membres des instances du Cofrac et aux fournisseurs afin de les aider à comprendre et accompagner les laboratoires dans leur démarche.

Nous allons évoquer de façon succincte les documents nécessaires pour notre validation de méthode.

I.1.2.1 SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale » [7] et SH REF02 révision 05 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 » [8]

Ces deux documents sont primordiaux pour un LBM en démarche d'accréditation. Ils donnent une vision d'ensemble sur l'accréditation en biologie médicale.

Le SH REF 02, révisé en juin 2016, a pour objet de préciser les exigences organisationnelles et techniques générales nécessaires pour la réalisation des examens de biologie médicale.

Des dispositions législatives et réglementaires citées dans ce guide concernant la qualité des pratiques en biologie médicale complètent les exigences de la norme NF EN ISO 15189 (version 2012). La satisfaction de ces exigences est la condition de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. Leur non-respect constitue un écart.

Le plan et la numérotation du plus grand chapitre de ce document sont ceux de la norme NF EN ISO 15189.

Le SH GTA 01, révisé en avril 2015, présente un état des lieux des bonnes pratiques et établit certaines recommandations préconisées par le Cofrac pour l'accréditation en biologie médicale.

I.1.2.2 SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » [9] et SH INF 50 « Portée type d'accréditation » [10]

Ces documents se situent en amont d'une validation de méthode. En effet, avant d'effectuer cette étape, il est nécessaire de définir quelles sont les méthodes à valider. Les analyses sont regroupées en « portées d'accréditation », c'est à dire à un « énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité » [10].

Le document SH REF 08, applicable depuis le 3 mars 2017, a pour objet de présenter le mode d'expression de la portée d'accréditation des LBM et leurs modalités d'évaluation par le Cofrac.



Le document SH INF 50, applicable depuis mars 2017, présente les portées-types (ou nomenclature) recensant les examens de biologie médicale. Ces examens sont classés selon la thématique de la section santé humaine (domaines - sous-domaines - familles) dans le but de faciliter et d'harmoniser l'expression des portées d'accréditation.

En cas de demande d'accréditation sur un examen non répertorié, le laboratoire doit prendre contact auprès du Cofrac « pour avis et étude, le cas échéant, de sa recevabilité » [10].

I.1.2.3 SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) - validation (portée B) des méthodes en biologie médicale [11]

Les recommandations présentées dans ce guide sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme concernant la vérification sur site/validation des méthodes. L'accréditation d'un LBM passe forcément par cette étape qui permet d'avoir une bonne connaissance des méthodes d'analyses, de ses performances et de ses limites.

L'objectif est de s'assurer que ces performances sont suffisantes pour assurer la fiabilité des résultats d'analyses et par conséquent des interprétations cliniques du prescripteur.

Ce guide, applicable depuis avril 2015, décrit les deux phases d'une validation de méthode : la phase initiale, avant sa mise en œuvre effective en routine, puis la phase de vérification continue et de confirmation des performances, dans le cadre du fonctionnement quotidien du laboratoire. La première phase correspond à la validation/vérification de méthode et la seconde phase est relative à la gestion des contrôles de qualité. La démarche à suivre est entièrement détaillée dans ce document.

I.1.2.4 SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale » [12]

Le SH GTA 06, applicable depuis le 1er juillet 2012, constitue un guide pratique d'aide à la mise en place des contrôles qualités. Le contrôle de qualité constitue un moyen de vérification de la maîtrise en continu du processus analytique. L'objectif est d'apporter une confirmation et une preuve permanente de la validité des résultats rendus.

Le guide décrit les critères de performances évaluables grâce aux résultats des contrôles de qualité, ainsi que les modalités de choix des critères d'acceptabilité. On présente ensuite les différents types de contrôles de qualité pour les méthodes quantitatives et qualitatives, avec les modalités de leur mise en place dans le laboratoire.

I.1.2.5 SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale » [13]

Ce guide indique que « le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est pertinent et possible ». Le vocabulaire international de métrologie (VIM) définit



l'incertitude de mesure comme un « paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande³, à partir des informations utilisées. » [14].

Applicable depuis octobre 2011, il définit la méthodologie permettant de démontrer que la maîtrise de la qualité des résultats d'analyses quantitatives passe par l'évaluation de l'incertitude de mesure (les résultats qualitatifs ne sont pas abordés pour l'instant dans ce document). L'incertitude est donc un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder. Associée à tout résultat de mesure, elle constitue une aide pour le clinicien dans sa prise de décision diagnostique ou thérapeutique. Elle apporte aussi au biologiste médical un élément important pour l'interprétation du résultat.

I.1.3. Présentation des étapes d'une validation de méthode initiale

Comme présenté précédemment, une validation de méthode comprend une phase initiale puis une phase de vérification continue des performances. Si la phase initiale est à effectuer avant la mise en œuvre effective de la méthode, il est admis qu'un laboratoire puisse l'effectuer en différé, procédant alors à une confirmation « a posteriori des performances d'une technique déjà en cours d'utilisation » [11].

Nous allons présenter dans ce chapitre l'ensemble des étapes permettant d'effectuer la validation initiale d'une méthode.

I.1.3.1 Expression de la portée d'accréditation

Il faut savoir que le laboratoire est accrédité sous la forme d'une portée d'accréditation : celle-ci s'exprime sous la forme d'une **liste de compétences** ou « **champs de possibilités** ». Le Cofrac a mis à la disposition des laboratoires l'ensemble des portées-types d'accréditation dans le SH INF 50. L'expression de la portée d'accréditation demandée par le LBM, dépend des compétences que ce dernier est capable de démontrer et de l'utilisation qu'il compte en faire.

³ Le « mesurande » est un terme défini dans le Vocabulaire International de Métrologie comme étant la grandeur que l'on veut mesurer.



Par exemple pour l'hématocytologie, « **Domaine** : Biologie médicale - **Sous-domaine** : Hématologie – **Famille** : Hématocytologie (HEMATOBM) » [10] :

| Code | Nature de l'échantillon biologique | Nature de l'examen/analyse | Principe de la méthode | Référence de la méthode | Remarques (limitations, paramètres critiques...) |
|------|--|---|---|--|--|
| HB1 | Liquides biologiques d'origine humaine | Hémogramme (numération-formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés) | <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, - Calcul - Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique | <p>Méthodes reconnues (A)</p> <p>Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B)</p> | # |
| HB2 | Échantillons biologiques d'origine humaine | <p>Recherche, identification et/ou numération de cellules (thrombocytes, cellules hématopoïétiques, cellules anormales, blastes, neuroblastes, histiocytes, ...)</p> <p>Recherches d'anomalies cellulaires (recherche d'hématies fœtales, coloration de Perls, corps de Heinz, ...)</p> | <p>Méthode de type qualitatif et/ou quantitatif</p> <p>Principe général des techniques :</p> <p>Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique</p> | <p>Méthodes reconnues (A)</p> <p>Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B)</p> | <p>(myélogramme, adénogramme, splénogramme)</p> <p>(test de Kleihauer, coloration de Perls, ...)</p> |

Tableau 1 : Portées-types d'accréditation en hématocytologie (d'après le SH INF 50).



Les lignes de portées (correspondant à la phase analytique) sont donc regroupées au sein de tableaux et sont définies **suivant 4 champs-clés** nécessaires pour décrire la compétence mise en œuvre à la réalisation des examens :

- 1) Nature de l'échantillon biologique, un astérisque (*) correspond à la possibilité de retirer certains types de nature d'échantillon et/ou de types d'examens proposés, ou d'en mentionner d'autres
- 2) Nature de l'examen/analyse : il s'agit aussi bien d'un résultat quantitatif que d'un résultat qualitatif. Le laboratoire choisit parmi les mentions proposées entre chaque virgule (","), en conservant l'intégralité de la mention proposée
- 3) Principe de la méthode : il est défini par le type de méthode (quantitatif ou qualitatif), le caractère manuel ou automatisé et les techniques employées
- 4) Référence de la méthode : portée A ou B

Le laboratoire peut mentionner toute autre information pertinente dans un dernier champ-clé « Remarques (limitations, paramètres critiques...) » qui est facultatif.

Le laboratoire choisit donc sa portée d'accréditation à partir des portées-types d'accréditation du SH INF 50 sur lesquelles il effectue les ajustements nécessaires. Une fois la portée d'accréditation définie, le laboratoire se base sur le document SH FORM 06 pour rédiger la liste détaillée des examens en vigueur, correspondant à sa portée d'accréditation. Cette liste, gérée par le système de management de la qualité (SMQ) du laboratoire, doit comprendre a minima la nature de l'échantillon, la nature de l'examen, le principe de la méthode et la référence de la méthode.

I.1.3.2 Choix de la portée : A ou B

Les demandes d'accréditation d'un laboratoire sont classées en 2 catégories.

En **portée A**, la validation des méthodes pour un LBM sera réduite à une « vérification » sur site. Celle-ci aura pour objectif de montrer que des **performances** suffisantes sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire (conditions ambiantes, personnel, équipements, etc.). En effet, la grande majorité des LBM adopte des méthodes reconnues (DM-DIV marqués CE ou méthodes « fournisseur ») qui sont a priori validées dans leur domaine d'application.

La majorité des analyses sera accréditée selon ce type de portée.

En **portée B**, une « validation » de la méthode adaptée ou développée sera nécessaire.

Dans ce cas, le laboratoire établit l'ensemble des critères de la qualité de la méthode afin d'en démontrer la maîtrise afin d'assurer la validation.

Pour les laboratoires pratiquant des méthodes amenées à évoluer, une accréditation en **portée flexible** s'impose [9].



I.1.3.3 Choix d'une portée flexible

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

Une **portée flexible standard** (A) permet au laboratoire d'utiliser sous accréditation, entre deux évaluations Cofrac, les révisions successives des méthodes normalisées ou reconnues dès lors qu'elles n'impliquent pas de nouvelles compétences (p. ex : révision des fiches techniques par le fournisseur correspondant à un DM-DIV marqué CE).

L'accréditation selon ce type de portée permet aux LBM :

- de changer d'équipement (d'appareil) ou de trousse (kits) réactifs fournisseur en fonction de l'évolution technologique et de continuer à mettre en œuvre sous accréditation les méthodes, pourvu que le principe de la méthode reste semblable.
- d'adopter de nouvelles méthodes lorsqu'elles sont comprises dans la portée d'accréditation du LBM. En effet, le laboratoire est accrédité non pas sur un ensemble d'examens mais selon sa portée d'accréditation. Comme nous l'avons dit précédemment, une portée d'accréditation regroupe un ensemble défini de natures d'échantillons biologiques, de natures d'examens et de principes de méthodes. On peut donc appliquer la même méthode sur de nouveaux types d'échantillons biologiques ou effectuer de nouveaux examens. Dans ce cas là, il s'agit de l'adoption de compétences ne différant pas significativement de celles mises en jeu lors des examens accrédités par le LBM.

Une **portée flexible étendue** (B) permet au laboratoire de rendre sous accréditation, entre 2 visites d'évaluation Cofrac, des résultats avec une méthode qu'il a lui-même développée ou adaptée. Il est évident que ce type de portée doit correspondre à une réalité d'utilisation pour le laboratoire en fonction de son activité et de son contexte.

Si la portée flexible n'est pas choisie, le laboratoire ne pourra pas utiliser une autre méthode que celle pour laquelle il est accrédité et dans ce cas, il n'y a pas de révision possible de la méthode qu'il a validée. Tout changement ne pourra être effectué que suite à une réponse positive lors d'une visite d'évaluation Cofrac.

L'adoption d'une portée flexible permet donc au laboratoire d'appliquer un nombre restreint de modifications sur ses examens, et ce, sans avoir à se soumettre préalablement à une évaluation Cofrac. Le laboratoire doit rédiger une procédure dite de « **gestion de la portée flexible** » listant les opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement de méthode ou de réactif ne faisant pas intervenir de nouvelles compétences [11].

La portée d'accréditation peut présenter une partie de la demande en portée flexible standard (A) et une autre en portée flexible étendue (B), entre familles ou au sein d'une même famille d'examens.



I.1.3.4 Analyses quantitatives/qualitatives et choix du processus

Pour la validation-vérification des méthodes, il est nécessaire de distinguer 2 types de méthodes [11] :

- les méthodes de type **quantitatif** : elles fournissent une information sur la quantité d'un mesurande grâce à la mesure d'un signal sur une échelle continue.

P. ex : la majorité des examens d'hémostase, biochimie ou d'hormonologie ;

- les méthodes de type **qualitatif** : le résultat n'apporte aucune information sur la quantité mais seulement sur la présence ou l'absence d'un analyte (cellule ou organisme), ou l'identification de la caractéristique recherchée.

P. ex : examens d'identification de germes en microbiologie ou de cellules en hématocytologie.

Les résultats de méthodes assimilées comme semi-quantitatives ou semi-qualitatives sont à considérer comme étant des méthodes quantitatives.

De plus, le GTA 04 a développé une nouvelle notion : la distinction entre processus analytique simple et processus analytique complexe.

Un processus analytique correspond à l'ensemble des méthodes permettant l'obtention de résultats d'examens aboutissant au diagnostic biologique. Les examens de biologie médicale peuvent être constitués d'une seule méthode/étape/processus (appelée « processus simple » comme le dosage des électrolytes dans le sérum) ou de l'enchaînement de plusieurs méthodes/étapes/sous-processus, faisant appel à des méthodes quantitatives et/ou qualitatives (appelé « processus complexe » comme pour la NFS).

Le rôle du biologiste consistera à identifier la nature des processus puis à vérifier/valider chacune des étapes identifiées.

I.1.3.5 Contenu d'un dossier de vérification/validation de méthode

Comme nous l'avons vu précédemment, le LBM doit s'appuyer sur une **procédure de vérification/validation de méthode**, réaliser les différentes étapes et formaliser les résultats dans un enregistrement nommé « dossier de vérification de méthode ».

Un dossier doit être réalisé pour chacun des paramètres mesurés par le laboratoire.

Chaque dossier doit comporter généralement cinq parties :

- Description de la méthode (processus analytique, maîtrise des risques)
- Définition des critères de performances à évaluer et des limites acceptables
- Vérification bibliographique
- Vérification expérimentale
- Conclusion – Déclaration d'aptitude de la méthode



Pour la rédaction d'un dossier de validation et vérification de méthodes, le LBM pouvait s'appuyer sur les formulaires types suivant proposés par le Cofrac :

- le SH FORM 43 (méthode de type quantitatif)
- le SH FORM 44 (méthode de type qualitatif)

Dans un objectif d'adaptation à l'approche processus de la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189, il ne subsiste qu'un formulaire unique, le SH FORM 43 [15] qui synthétise l'ensemble des items nécessaires. Il permet de formaliser les renseignements relatifs à la description de la méthode, la mise en œuvre de la validation, l'évaluation/maîtrise des risques et aux informations pertinentes de la vérification/validation sur site (bibliographie, limites d'acceptabilité, résultat, etc.).

Dans le cas des services du pôle Biologie-Pharmacie du CHU de Limoges, chaque dossier de validation de méthode doit faire référence aux procédures du pôle suivantes :

- « Vérification (portée A)/Validation (portée B) des méthodes en Santé Humaine » (PBH A 0001) ;
- « Gestion de la portée flexible (PBH A 0005) ;
- « Evaluation internes et externes de la qualité-organisation et gestion des contrôles » (PBH A 0002) ;
- « Estimation des incertitudes de mesure » (PBH 0003).

I.1.3.5.1. Description de la méthode

La première partie du dossier de vérification/validation sera consacrée à la description de la méthode. Le laboratoire devra collecter les informations pertinentes à connaître sur le système analytique (méthode/équipements/réactif) et les consigner dans cette première partie. L'ensemble de ces informations est en général disponible et facilement accessible sur les documents du fournisseur (manuels d'utilisation, fiches techniques, notices, fiches réactifs, contrôles internes, etc.).

I.1.3.5.2. Définitions des besoins du laboratoire

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



I.1.3.5.2.1. Recommandations des sociétés savantes

Les limites d'acceptabilité peuvent reposer sur différentes approches :

- l'intervalle des valeurs de référence (prise en compte de la variation biologique interindividuelle et de la variation analytique),
- les variations biologiques inter-individuelles et intra-individuelles,
- l'opinion des cliniciens,
- l'état de l'art (établi à partir des résultats de contrôle interne de qualité et/ou des évaluations externes de la qualité).

En résumé, ce sont les critères selon lesquels les performances d'une technique sont jugées satisfaisantes dans les conditions d'emploi définies par l'utilisateur.

Afin de définir ces limites acceptables, le LBM pourra aussi s'appuyer sur des recommandations fournies par la haute autorité de santé (HAS) ou textes réglementaires et sur les critères de performances annoncés par les sociétés savantes. Dans tous les cas, le choix sera confronté aux données du fournisseur.

Les deux principales références sont :

- *Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques* [16].

Les limites d'acceptabilité de cet article sont proposées sur la base des données expérimentales du protocole de validation de techniques de la société française de biologie clinique (SFBC) et de l'exploitation des résultats de contrôle de qualité externes.

- *Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation* [17].

Les critères proposés par Ricos reposent sur l'étude des coefficients de variation intra et inter-individuels de chaque analyte.

Autre différence importante entre ces deux références, l'article de la SFBC est paru en 1999 alors que les objectifs analytiques de Ricos sont remis à jour régulièrement et tiennent donc compte des nouvelles générations d'automates et des nouvelles méthodes arrivées sur le marché. De plus, les tables Ricos renferment plus de paramètres que l'article de la SFBC.

I.1.3.5.2.2. Pour les autres paramètres

Les bases de données élaborées par les sociétés savantes ne contiennent pas la totalité des paramètres de biologie médicale. C'est le cas de notre validation de méthode.

Dans ce cas, le laboratoire pourra s'appuyer sur toutes autres publications externes, sur les performances annoncées par le fournisseur ou sur des limites qu'il a lui-même définies.



I.1.3.5.3. Vérification bibliographique et expérimentale

Afin d'améliorer les connaissances du laboratoire sur les performances de sa méthode, il est nécessaire d'effectuer une recherche bibliographique dont les résultats sont consignés dans le dossier de vérification. Cette étape de la vérification de la méthode doit permettre de s'assurer que les performances annoncées par le fournisseur ou évaluées lors d'études indépendantes, sont suffisantes et adaptées aux besoins préalablement définis par le laboratoire.

Les critères de performances évoqués ci-dessous peuvent être recherchés dans des documents du fournisseur (manuel d'utilisation, fiches techniques, fiches réactifs), dans des ouvrages de référence ou dans des publications scientifiques réalisées par des experts indépendants.

La vérification expérimentale consiste à réaliser les essais nécessaires et en exploiter les résultats afin d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire. Il s'agit de s'assurer que la méthode est apte par rapport aux besoins définis par le laboratoire.



| Critères à évaluer | 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 et analyses des discordances | Essai | Essai | Essai | Essai |
| Intervalle de mesure (limite de quantification et limites de linéarité) | Bibliographie | - | Essai | Essai |
| Interférences | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Contamination entre échantillons (s'il y a lieu) | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Robustesse | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Stabilité réactifs | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Intervalle de référence (valeurs usuelles) | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Limite de détection | - | Bibliographie | - | Essai |
| Spécificité/sensibilité analytique | - | Bibliographie | - | Essai |

Tableau 2 : Paramètres à valider/vérifier pour les méthodes quantitatives et qualitatives (d'après le SH GTA 04)

1.1.3.5.4. Conclusion : déclaration d'aptitude de la méthode

Le dossier de vérification de méthode doit conclure par une déclaration d'aptitude de la méthode. Pour cela, il sera nécessaire de comparer les résultats obtenus lors des vérifications bibliographiques et expérimentales par rapport aux limites acceptables définies préalablement par le laboratoire. Le biologiste responsable de la validation signe le dossier et s'engage sur la mise en service de la méthode au sein du laboratoire.



I.1.3.6 Vérification expérimentale d'une méthode (portée A)

Nous allons aborder point par point les critères de performances qui nous intéresseront par la suite pour notre validation de méthode.

I.1.3.6.1. Fidélité

La fidélité représente l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même échantillon dans des conditions spécifiées. Elle caractérise donc la dispersion des résultats, sans relation avec la valeur vraie.

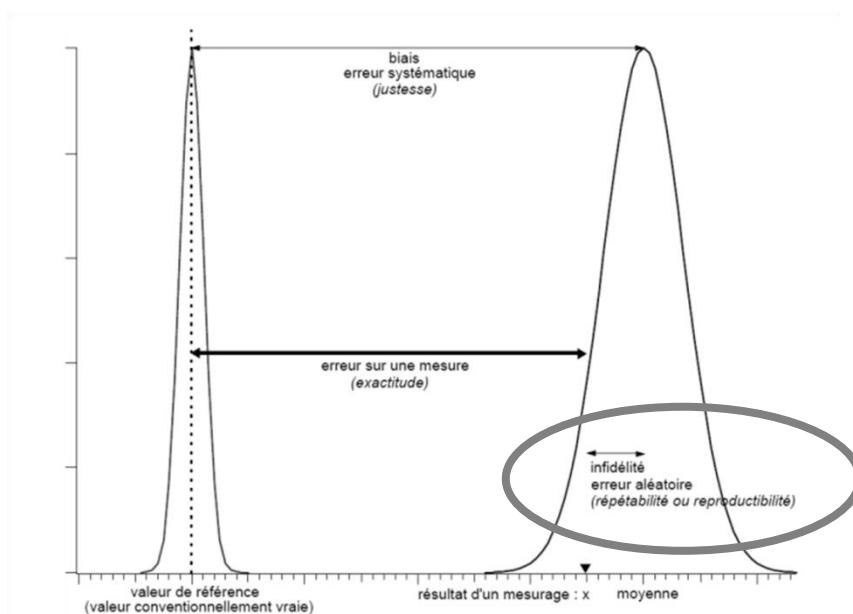


Figure 2 : Représentation de la fidélité (d'après le SH GTA 06)

I.1.3.6.1.1. Répétabilité

Ce critère consiste à répéter plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon dans un intervalle de temps, le plus court possible, et dans des conditions strictement identiques (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage).

L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour le paramètre concerné [11].

Les mesures peuvent être réalisées sur les échantillons de contrôle **interne de la qualité** (CIQ) ou des échantillons patients au préalable anonymisés. La répétabilité est évaluée sur au moins 2 niveaux, ceux-ci doivent être choisis proches des seuils de décision. Le nombre de détermination idéal est de 30 pour chaque niveau afin d'obtenir une bonne représentativité statistique. Cependant, un nombre d'essais inférieur pourra être réalisé si ce choix est justifié par une argumentation pertinente (coût des analyses, durée).

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart type (s) et le coefficient de variation (CV) pour chaque série selon la formule suivante :

$$CV(\%) = \frac{s}{m} \times 100$$

Le CV expérimental devra être comparé au CV limite admissible choisi au préalable.

I.1.3.6.1.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire

Cet essai consiste à effectuer plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon en faisant varier les conditions opératoires. Il est nécessaire de faire varier tous les paramètres susceptibles de changer lors de l'utilisation de la méthode en routine (opérateurs, conditions ambiantes, lots de réactifs, etc.).

L'essai est en général réalisé sur les CIQ, avec 30 déterminations sur 2 niveaux minimum, choisis en fonction des seuils de décision et sur au moins 15 jours. Une autre stratégie pourra être employée, mais justifiée par le laboratoire [11].

L'exploitation des résultats est similaire à celle de la répétabilité avec le calcul de la moyenne (m), de l'écart type (s) et du coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage (%).

Le CV expérimental sera comparé aux limites d'acceptabilité préalablement fixées.

I.1.3.6.2. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude

La justesse est définie comme étant « l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence » [12].

L'essai de justesse a pour objectif d'évaluer le biais de la méthode (également appelé erreur de justesse ou erreur systématique). Par définition, ce biais doit être évalué en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon et la valeur vraie du mesurande.

En biologie médicale, il existe peu de matériaux de référence certifiés (MRC). Il est donc difficile de parler de **valeur vraie**. Le biais de la méthode sera donc évalué par rapport à une « valeur cible » et non « une valeur vraie ».

Une étude de justesse nécessite donc la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une **valeur cible**. L'écart observé correspond au biais.



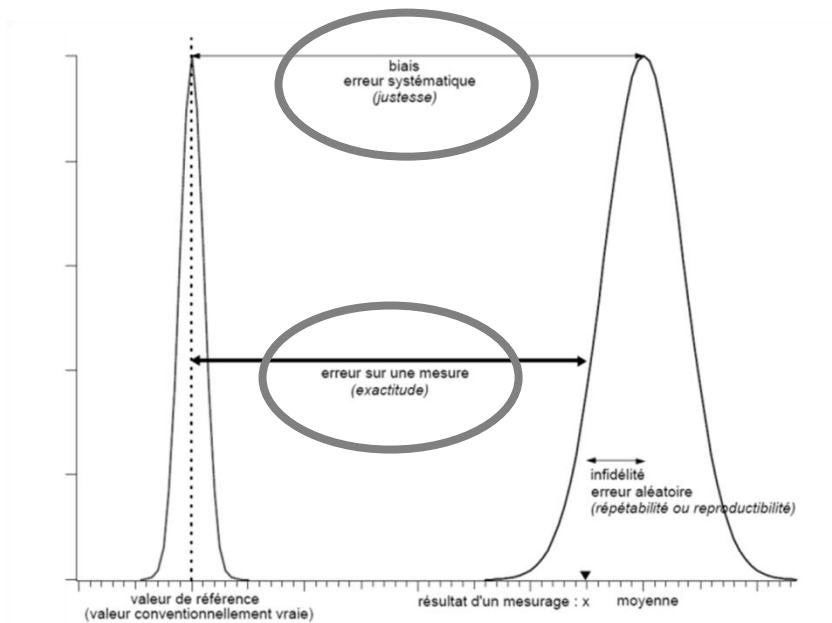


Figure 3 : Représentation du biais et de l'inexactitude (d'après le SH GTA 06)

Le biais ne peut être établi qu'à l'aide de l'externalisation des CIQ.

La justesse est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire, établie sur des échantillons de CIQ, à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur vraie (v) de l'échantillon testé.

La valeur cible retenue est :

- la moyenne des résultats obtenus avec la même méthode (groupe de pairs) ;

ou

- la moyenne de l'ensemble des participants si les seuils de décision pour le paramètre sont standardisés (HAS, consensus)

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

En l'absence de CIQ externalisés, on établit l'inexactitude de la méthode. C'est le cas de notre validation de méthode.

L'exactitude d'une mesure correspond à « l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande » [12]. Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle. L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude).



A ce jour, le laboratoire évalue l'inexactitude à partir des données des EEQ selon la formule suivante :

$$\text{Inexactitude (\%)} = \frac{(x-v)}{v} \times 100$$

x : valeur trouvée pour un échantillon d'EEQ

v : valeur cible

Le biais et l'inexactitude expérimentaux seront comparés aux limites acceptables préalablement fixées (recommandations de la SFBC ou tables de Ricos le plus souvent).

I.1.3.6.3. Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure

Pour l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses, le laboratoire peut se reporter au guide SH GTA 14.

Cette étape comprend à la fois l'étude des risques (qui consiste à lister les paramètres d'influence et les moyens de maîtrise associés) et l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses pour au minimum 2 niveaux.

Dans le cas des méthodes quantitatives (et qualitatives), le laboratoire doit tout d'abord :

- Définir le mesurande, c'est à dire ce que l'on veut mesurer avec le maximum d'informations ayant un impact sur la mesure. Il faut prendre en compte l'analyte, le type de grandeur, la matrice et l'unité (p. ex pour la glycosurie, la définition du mesurande est « Concentration en glucose urinaire exprimée en mmol/L ou en g/L, l'analyte étant le glucose »).
- Analyser le processus de mesure (pré-analytique et analytique) afin d'identifier les facteurs d'influence susceptibles d'introduire une variation sur le résultat. L'objectif est de connaître les risques de la méthode pour pouvoir agir en conséquence et donc optimiser la fiabilité des résultats rendus.

Le diagramme des 5M (diagramme d'Ishikawa) peut être utilisé pour identifier les principaux facteurs d'incertitude susceptibles d'influencer le résultat. Il s'agit d'un outil d'aide à l'analyse du processus de mesure avec 5 éléments (moyens, milieu, méthode, main d'œuvre, matière).

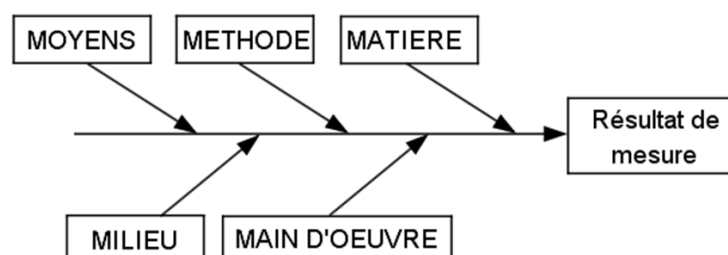


Figure 4 : Diagramme des 5M (d'après le SH GTA 14)



Exemple de facteurs d'influence :

- Pré-analytiques :

- Moyens : seringue, aiguille épicroânienne ;
- Milieu : types de tubes, conditions et durée de transport des échantillons prélevés, conditionnement avant analyse (centrifugation, conservation,...) ;
- Méthode de prélèvement : pli du coude, ordre des tubes, durée de mise en place du garrot ;
- Main d'œuvre : qualification/habilitation des préleveurs internes et externes ;
- Matière : préparation du patient/qualité de l'échantillon (lipémique, ictérique, hémolysé, médicaments,...).

- Analytiques :

- Moyens : pipette, automate, informatique,...;
- Milieu : conditions ambiantes (température, pression atmosphérique...), conditions de stockage des prélèvements, conditions de stockage des réactifs,...;
- Méthode : mode opératoire de l'analyse,...;
- Main d'œuvre : qualification/habilitation du personnel ;
- Matière : lots de réactifs, stabilité des échantillons,...

La norme précise que l'incertitude des résultats doit être déterminée dans les cas où cela est « pertinent et possible ». Ainsi, dans le SH GTA 01, le Cofrac accepte que l'incertitude des méthodes quantitatives et qualitatives soit évaluée uniquement par une analyse de risque grâce à la méthode des 5M.

Concernant les méthodes quantitatives, de nombreuses approches pour la détermination de l'incertitude de mesure sont proposées.

Au CHU de Limoges, nous utilisons la méthode « CIQ /EEQ ». Cette méthode est fondée sur l'exploitation des données de contrôles internes de la qualité et des données d'évaluation externe de la qualité. Nous développerons ici uniquement cette méthode.

Le calcul s'effectue en quatre temps :

- Calcul de l'incertitude liée à la fidélité intermédiaire, à partir des résultats des CIQ :

$$u^2(CIQ) = \left(\frac{CV \text{ du CIQ} \times \text{moyenne du CIQ}}{100} \right)^2$$



- Calcul de l'incertitude $u^2(EEQ)$, liée à la justesse, à partir des résultats des EEQ :

$$u^2(EEQ) = \left(\frac{|E|}{\sqrt{3}} \right)^2 + \hat{\sigma}_E^2$$

$$\text{Avec } \bar{E} = \frac{\sum_i (x_{lab} - x_{ref})_i}{n} \text{ et } \hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n-1}}$$

\bar{E} : écart entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

x_{lab} : résultat du laboratoire

x_{ref} : valeur assignée de la comparaison

n : nombre de valeurs d'EEQ

$\hat{\sigma}_E$: écart type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

- Calcul de l'incertitude type $u(C)$, la résultante des deux incertitudes précédemment calculées :

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

- Calcul de l'incertitude élargie $U(C)$ après application d'un facteur d'élargissement k égal à 2 permettant un intervalle de confiance pour l'incertitude finale d'au moins 95%. Il s'agit du résultat final :

$$U(C) = 2 \times u(C)$$

Une fois l'incertitude estimée, les résultats doivent être comparés aux limites acceptables définies par le laboratoire.

Bien entendu, aucun calcul d'incertitude ne pourra être réalisé dans le cas d'une validation de méthode qualitative, mais il est demandé au laboratoire de procéder à une analyse de risques. Le laboratoire devra lister l'ensemble des paramètres d'influence sur les résultats d'analyses pour chacune des trois phases préanalytique, analytique et post-analytique en utilisant la méthode des 5M.

Cette analyse de risques permettra de mettre en évidence les points critiques à maîtriser dans le laboratoire afin d'assurer la fiabilité des résultats. Pour chaque paramètre d'influence jugé significatif, des moyens de maîtrise adaptés devront être mis en place.



I.1.3.6.4. Comparaison de méthodes

Il s'agit du dernier paramètre à évaluer, il concerne les méthodes quantitatives.

Le Cofrac [11] conseille d'analyser au moins 30 échantillons de patients « couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré ». Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés une fois pour chaque méthode et dans le délai le plus court possible.

Les limites de suivi ci-dessous sont préalablement établies, elles permettent de détecter le nombre d'échantillons discordants (comparé à un seuil maximal fixé avant l'étude) :

$$\text{Limites de suivi} = \pm \sqrt{(3\sigma_{FI \text{ technique testée}})^2 + (3\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}})^2}$$

Avec :

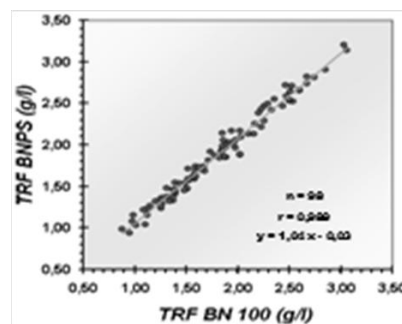
$\sigma_{FI \text{ technique testée}}$ = écart-type de la fidélité intermédiaire de la technique testée, obtenu à l'aide des CIQ.

$\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}}$ = écart-type de la fidélité intermédiaire de la technique de comparaison, obtenu à l'aide des CIQ.

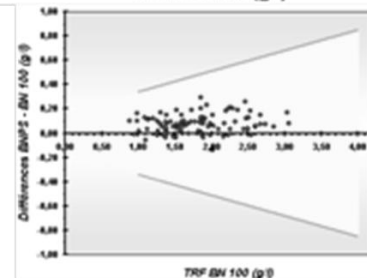
Trois graphiques sont réalisés et analysés, ils permettent d'obtenir les données pertinentes à évaluer :



Graphique représentant les résultats de la méthode Y par rapport à ceux de la méthode X (y_i en fonction de x_i) : la droite de corrélation calculée doit avoir une équation la plus proche possible de $y = x$ (coefficient directeur proche de 1 et ordonnée à l'origine proche de 0).



Graphique représentant les différences ($y_i - x_i$) en fonction de x_i : appliquer sur ce graphique les limites de suivi.



Graphique représentant les rapports y_i/x_i en fonction de x_i : appliquer sur ce graphique les limites de suivi en valeurs relatives.

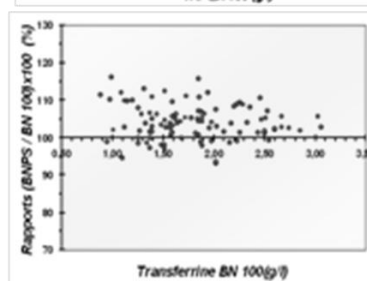


Figure 5 : Graphiques utilisés lors des études de comparaisons (d'après le SH GTA 04)

Le laboratoire compare le nombre de discordances identifiées à la limite préétablie et recherche leur cause si elles subsistent après vérification.

Si des différences significatives sont observées, le biologiste médical formalise la conduite à tenir telle que l'adaptation des valeurs de référence, l'information des cliniciens prescripteurs et/ou l'utilisation « transitoire et documentée » d'un facteur de correction.

I.1.3.7 Vérification bibliographique d'une validation de méthode (portée A)

I.1.3.7.1. Evaluation de la contamination

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques [11]. Ils peuvent affecter les échantillons à analyser (contamination inter-échantillon) ou les réactifs (contamination inter-réactifs).

L'étude de la contamination inter-échantillon est à réaliser seulement sur les paramètres sensibles à ce genre d'influence (p. ex : les paramètres où le domaine de mesure est étendu). La conséquence sur la fiabilité des résultats peut alors s'avérer importante. En effet, le passage d'un échantillon contenant une forte concentration de la substance à doser peut engendrer une surévaluation de la concentration de l'échantillon suivant.

Le phénomène de contamination inter-réactif peut se produire par exemple sur un analyseur lorsque le système de distribution est commun à tous les réactifs.

Nous ne rentrerons pas dans les détails du calcul d'une contamination inter-échantillon et inter-réactif car pour notre validation de méthode, cette étude n'est pas applicable.

I.1.3.7.2. Robustesse

La robustesse d'une méthode est définie comme étant la capacité de la méthode à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées des différents paramètres du processus analytique. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Le laboratoire doit donc prendre en compte l'ensemble des paramètres pouvant varier dans le laboratoire et vérifier que les résultats n'en sont pas affectés (p. ex : température d'incubation, opérateurs, volume de colorant distribué etc.).

Le Cofrac indique que des résultats proches entre la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont une manifestation de la robustesse de la méthode [11]. En effet, la répétabilité caractérise la meilleure performance possible (conditions optimales), tandis que la fidélité intermédiaire est une mesure lors de conditions variables (opérateurs, lots de réactifs...).

Un essai inter-opérateurs sera indispensable dans le cas d'une technique manuelle où l'effet opérateur est significatif.

I.1.3.7.3. Vérifications des intervalles de référence biologique (valeurs usuelles)

Les valeurs de référence sont vérifiées le cas échéant et si possible par la bibliographie ou par le calcul statistique [11]. Dans notre cas, nous nous baserons sur la bibliographie.

I.1.3.7.4. Sensibilité et spécificité analytique

La sensibilité et la spécificité diagnostique sont les critères de performance les plus importants pour une analyse de type qualitatif.

Ils représentent respectivement le pourcentage de « vrais positifs » parmi une population pathologique et les « vrais négatifs » parmi une population saine. Il est souvent difficile d'obtenir des échantillons connus et en nombre suffisant pour la vérification expérimentale (*a priori* 30 au minimum). La vérification bibliographique prend ici toute son importance. La vérification expérimentale s'appuiera surtout sur l'étude des performances aux EEQ.

I.1.4. Confirmation des performances en routine

Comme nous l'avons déjà évoqué, la vérification de/ validation d'une méthode d'analyse se déroule en deux phases principales. Après la phase de vérification/validation initiale dont les résultats sont consignés dans un dossier, on effectue la confirmation des performances en routine. Ce suivi est indispensable afin de s'assurer que les performances de la méthode restent conformes aux besoins du laboratoire au cours du temps.

Cette vérification en continu du processus analytique est assurée par l'utilisation de contrôles de qualité, les échantillons de contrôle utilisés devant avoir un comportement le plus proche possible des échantillons de patients.



Il faut aussi rappeler que le choix des indicateurs de performances et limites d'acceptabilité associées doit se faire préalablement à la mise en place du contrôle de qualité [12]. Celles-ci doivent être notifiées pour chaque niveau et pour chacun des analytes sous contrôle. Le choix est du ressort du biologiste médical et doit refléter l'état de l'art et la pertinence de l'interprétation clinique des résultats. Pour son choix, le biologiste médical peut s'appuyer sur les recommandations de l'HAS, des sociétés savantes ou de conférences de consensus, sur des publications scientifiques ou par défaut, sur les règles d'interprétation des organisateurs des EEQ.

I.1.4.1 Les contrôles de qualité en biologie médicale

I.1.4.1.1. Exploitation des CIQ

Ils sont réalisés au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôles lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients. L'objectif est de vérifier la maîtrise du processus analytique. Il s'agit d'un autocontrôle dont les valeurs cibles sont connues de l'opérateur et l'interprétation des résultats est effectuée en fonction des limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli [18].

Idéalement, les CIQ portent sur différents niveaux de concentration (au moins deux) proches si possible des seuils de décision clinique. Les résultats des patients ne peuvent être libérés qu'après vérification de la conformité d'au moins un échantillon de contrôle interne. La notion de série et de fréquence des contrôles relève d'une analyse de risque, chaque laboratoire définit pour chaque type d'examen la fréquence optimale.

Il existe différents types d'échantillons de contrôle interne de qualité [12] :

- les CIQ « dépendant » du fournisseur du couple réactif/analyseur, c'est-à-dire distribués par le fournisseur du système analytique
- les CIQ « indépendant » du fournisseur du couple réactif /analyseur mis au point et fabriqués indépendamment de toute trousse d'un DM-DIV et fournis séparément.
- les pools d'échantillons biologiques. L'interprétation des pools sera basée sur les mêmes règles que celles des CIQ précités. Le laboratoire doit définir la méthode de fabrication des pools et s'assurer de leur stabilité dans le temps. Ces matériaux de contrôles peuvent être utilisés en l'absence de CIQ commercialisés ou en complément de ceux-ci.

Il est recommandé aux LBM d'utiliser ces 3 types d'échantillons de contrôles.

Pour notre validation de méthode, il n'existait pas de CIQ, mais un test de localisation cellulaire (expliqué dans les principes du fonctionnement du DM1200).

I.1.4.1.2. Exploitation des EEQ et des CIQ externalisés

Conformément à la norme NF EN ISO 15189, le laboratoire doit participer à des comparaisons inter-laboratoires (CIL). Il s'agit de « l'organisation, l'exécution et l'évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées » [12].



Il existe deux types de CIL :

- L'EEQ est une « procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison interlaboratoire réalisée par un organisateur à l'aide d'échantillons de contrôles inconnus ».

Pour l'évaluation externe de la qualité, la participation au Contrôle National de Qualité (CNQ) est obligatoire. La participation à d'autres essais interlaboratoires organisés par des associations de contrôle de qualité ou par des industriels complète l'évaluation par le CNQ. Une liste des organisateurs est disponible dans le document SH INF 19 [19].

Conformément au document SH REF 02, le laboratoire établit un planning de participation qui tient compte de la disponibilité et de la pertinence des programmes adaptés. Une participation a minima annuelle voire trimestrielle est souhaitable.

Dans tous les cas, cette fréquence fera l'objet d'une politique définie par le laboratoire sous réserve des obligations réglementaires. De plus, les résultats obtenus, les commentaires, les écarts et les éventuelles mesures correctives sont systématiquement tracés.

- Les CIQ externalisés sont « des contrôles internes réalisés par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles confrontés entre eux par établissement périodique des moyennes et estimation de la justesse (biais) » [12].

Le CIQ externalisé n'est pas considéré comme un EEQ puisque la valeur cible du fournisseur est connue de l'expérimentateur.

Le suivi des résultats d'EEQ et des programmes de CIQ externalisés permet de suivre la justesse et l'inexactitude de la méthode dans le temps.

I.1.4.2 Suivi des performances pour les méthodes de type quantitatif

I.1.4.2.1. Exploitation des CIQ

Le passage régulier des échantillons de CIQ permet d'anticiper la dérive du système analytique dans le temps (vérification des performances de la méthode). Ces résultats sont également utiles pour suivre la fidélité intermédiaire de la méthode. En effet, un calcul périodique du CV permet de visualiser si la fidélité du processus de mesure s'améliore ou se dégrade dans le temps.

I.1.4.2.2. Exploitation des EEQ

L'exactitude de la méthode, par l'analyse des EEQ, doit être suivie. Le positionnement obtenu dans le cadre de ces opérations (par rapport aux pairs) doit être revu par le personnel technique et biologique du laboratoire. Ces revues doivent permettre de décider des mesures correctives si nécessaire ou des commentaires à apporter en cas d'anomalies.

Dans le cas d'échanges inter-laboratoires, le laboratoire formalise les limites acceptables de l'évaluation de l'exactitude en tenant compte des exigences analytiques et clinico-biologiques.



I.1.4.2.3. Incertitude de mesure

Il est préconisé de réévaluer l'incertitude tous les ans en tenant compte des nouveaux résultats de CIQ et EEQ. Ceci permet de suivre les performances du laboratoire d'un point de vue global, l'incertitude prenant en compte les deux caractéristiques du processus analytique : la justesse et la fidélité.

I.1.4.2.4. Intervalle de référence

Les valeurs de référence doivent être revues périodiquement afin de vérifier qu'elles sont toujours pertinentes par rapport à la population des patients du laboratoire.

I.1.4.3 Suivi des performances pour les méthodes de type qualitatif

Pour les examens qualitatifs, la maîtrise des résultats et du processus analytique peut être plus complexe que pour les examens de type quantitatifs et nécessitera la mise en œuvre de moyens divers, autre que les CIQ et les EEQ. Les sources de variations sont nombreuses et les différentes étapes du processus seront à maîtriser.

I.1.4.3.1. Exploitation des CIQ

Le passage régulier d'échantillons de CIQ est nécessaire pour anticiper une dérive du processus analytique. La fréquence de passage et le nombre d'échantillons doivent être déterminés en fonction du coût de l'analyse et des risques encourus.

Les indicateurs de performances et les limites d'acceptabilité associées sont choisis préalablement à la mise en place du contrôle de qualité.

I.1.4.3.2. Exploitation des EEQ

Les EEQ sont moins fréquents que pour les examens quantitatifs [12]. Les résultats permettent de suivre la sensibilité et la spécificité diagnostique de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire. Ces résultats doivent être exploités et des actions préventives et/ou correctives doivent être mises en place en cas de discordance mineure ou majeure. La formation du personnel réalisée au travers d'évaluation et d'harmonisation des pratiques de lecture peut être considérée comme une évaluation externe de la qualité pour la réalisation manuelle des examens de lecture.

A défaut d'EEQ, les échanges de gré à gré sont nécessaires. Le rythme d'une confrontation trimestrielle semble approprié.



I.1.4.3.3. Maintien des compétences des opérateurs

La maîtrise de la qualité passe obligatoirement par la qualification/habilitation du personnel. Pour les techniques manuelles ou semi-automatisées et si l'effet opérateur est considéré comme significatif, il est important de réaliser régulièrement des essais inter-opérateurs. En hématocytologie, il s'agira de lectures de lames.

Ces tests permettent de vérifier les performances de la méthode dans le temps et de formaliser le maintien des compétences des différents opérateurs habilités du laboratoire. On parle de formation continue. Cette compétence doit être réévaluée périodiquement selon un planning défini pour chaque laboratoire en fonction de la criticité de l'analyse.

I.1.4.3.4. Maîtrise des conditions environnementales

L'évaluation de la maîtrise des conditions environnementales porte sur les conditions ambiantes (température, hygrométrie, poussières...). Le laboratoire doit respecter la logique des circuits de flux (échantillons, boîtes, personnels..), les conditions de climatisation, de stérilité des paillasse ainsi que la législation en vigueur.

I.1.4.3.5. Maîtrise continue des équipements

Le laboratoire s'assure de la maîtrise de ses équipements :

- Système analytique/analyseur : données métrologiques, maintenance
- Equipements de type intermédiaire : appareils qui interviennent dans le processus analytique mais qui n'interviennent pas dans la mesure (ex : appareil de coloration)
- Logiciels informatiques
- Equipements de mesure : thermomètres, pipettes, balances,...

I.1.4.3.6. Maîtrise de l'échantillon primaire

Le laboratoire doit s'assurer de la maîtrise de la préparation de l'échantillon. Dans notre cas par exemple, la qualité de l'étalement en hématocytologie.

I.1.4.3.7. Maîtrise de la méthode et des réactifs

De manière générale, le laboratoire assure la traçabilité des consommables critiques. Les réactifs (DM-DIV marqués CE) doivent être employés scrupuleusement selon les recommandations écrites du fournisseur, notamment pour la stabilité et le délai d'utilisation après ouverture. Le LBM doit tester les réactifs à chaque nouveau lot et/ou chaque livraison d'un même lot afin de vérifier qu'ils sont conformes aux spécifications définies par le laboratoire. La date de réception au laboratoire, la date et l'heure de reconstitution ainsi que les dates de péremption avant et après ouverture sont à enregistrer. Toutes ces informations sont tracées et disponibles.



I.1.5. Principes de fonctionnement du DM1200

I.1.5.1 Préparation des frottis sanguins

Après agitation par retournement du tube EDTA, le frottis sanguin est tiré selon les recommandations du constructeur Cellavision® (Annexe 5). La lame est ensuite identifiée avec une étiquette adhésive avec nom, prénom, date de naissance, numéro de dossier, et code-barres 2D. Ce dernier est indispensable, une fois le code-barres lu par l'automate, le DM commence à traiter le frottis.

Le frottis est ensuite disposé horizontalement dans un « magasin » capable d'en contenir 12 (les frottis sont lus successivement). Puis le magasin est rentré dans l'automate (Figure 6).

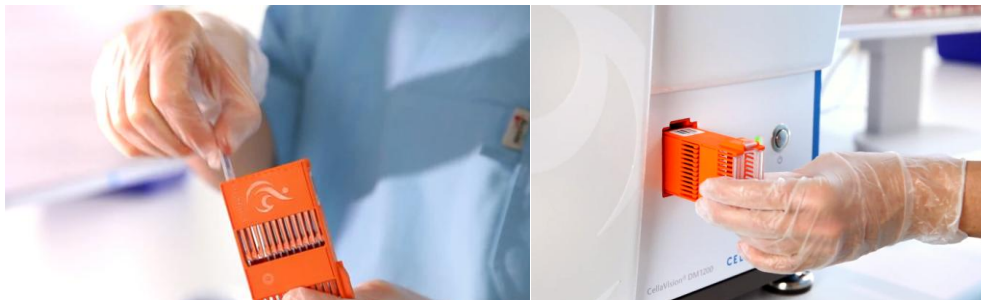


Figure 6 : Rangement des lames dans un magasin, et chargement du magasin dans l'automate.

Source : vidéo Youtube promotionnelle

A l'intérieur du DM, le code-barres identifiant le magasin est lu, puis vient le tour de celui de la lame (Figure 7). L'étape suivante est la pré-classification (voir point suivant).

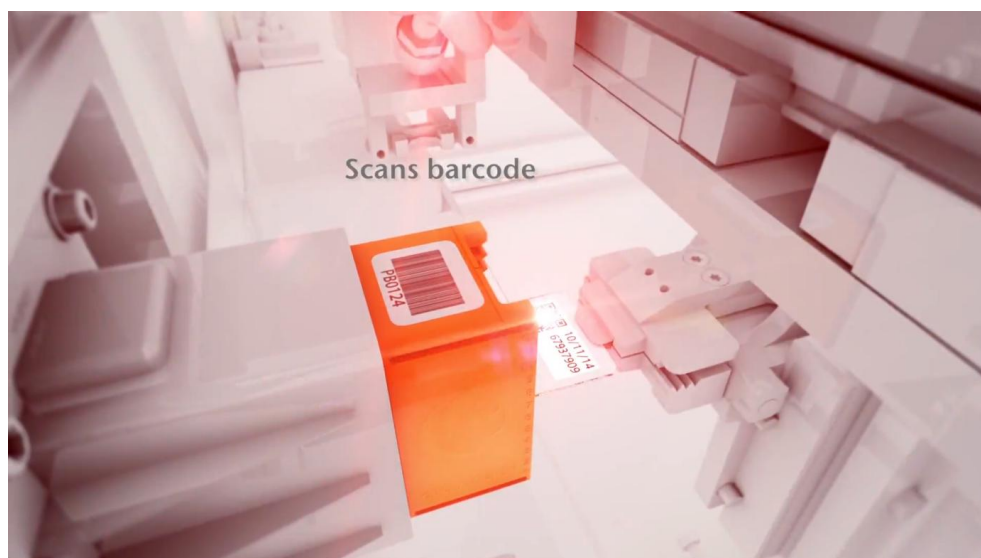


Figure 7 : Lecture des codes-barres du magasin et du frottis sanguin.

Source : vidéo Youtube promotionnelle

I.1.5.2 Pré-classification

Voici les différentes étapes de la pré-classification sur le DM (Figure 8) :

- définition de la monocouche et pré-localisation des éléments (objectif x10)
- mise au point automatique (objectif x100)
- segmentation (objectif x100) :
 - l'image de la cellule est décomposée, et plus de 300 fonctions sont calculées
 - une fois extraites, elles peuvent être résumées en 6 groupes principaux, analysés par le logiciel :
 - forme
 - couleur
 - texture (granulations...)
 - détection (vacuoles...)
 - chaîne de Markov (fonctions de probabilité...)
 - transformée en ondelettes : elle permet la segmentation (c'est-à-dire une transformation de l'image originale permettant l'extraction d'informations pertinentes)

Ainsi, les cellules sont évaluées en fonction de ces 6 groupes principaux. Mais il existe jusqu'à 350 caractéristiques individuelles utilisées ; par exemple, la taille et la forme du noyau.

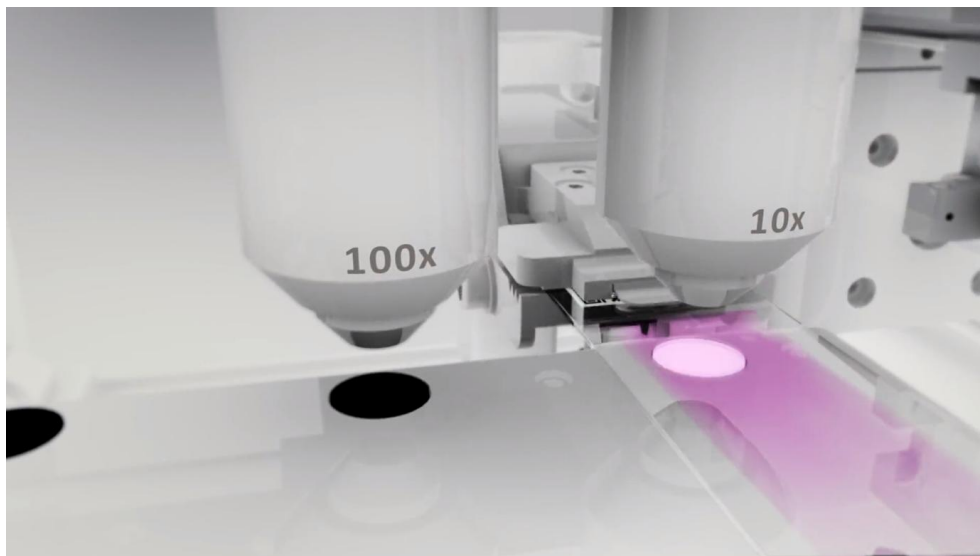


Figure 8 : Repérage de la monocouche cellulaire et localisation des cellules nucléées au faible grossissement (objectif x10) ; capture des images cellulaires au fort grossissement (objectif x100)

Source : vidéo Youtube promotionnelle



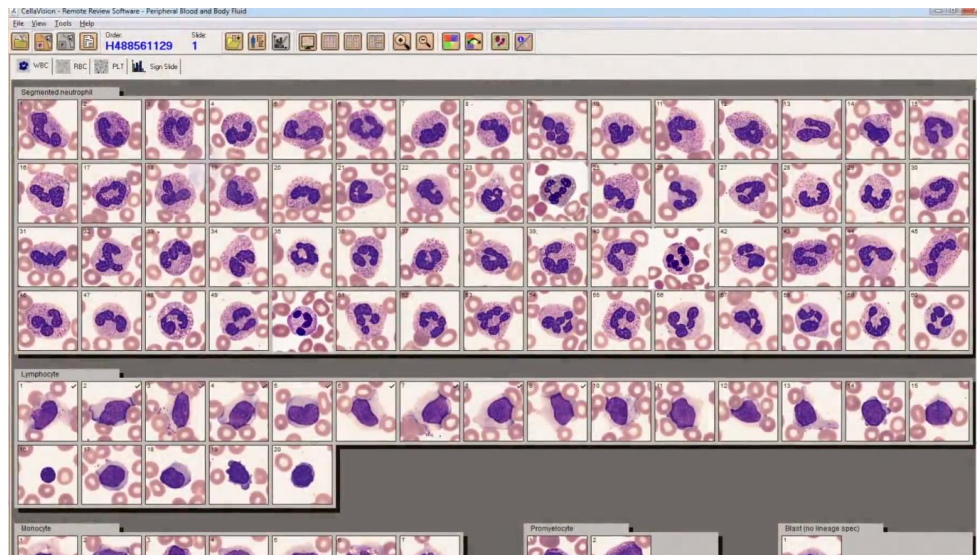


Figure 9 : Affichage de la pré-classification des éléments figurés du sang (ici, PNN et lymphocytes), pour revue et vérification par un opérateur.

Source : vidéo Youtube promotionnelle

Au bout d'approximativement 3 min, le logiciel propose la pré-classification à l'opérateur qui corrige alors les éventuelles cellules mal classées. L'opérateur peut voir simultanément plusieurs groupes de cellules pour les comparer, et éventuellement les reclasser par un cliquer-glisser ou un clic droit sur les photos.

I.2. Objectifs

L'examen microscopique des frottis sanguins reste toujours une approche indispensable et réelle dans le diagnostic et le suivi des hémopathies malignes.

Au quotidien, la morphologie est toujours au centre des rapports entre cliniciens et biologistes en particulier au moment de la suspicion diagnostique.

Elle fournit d'indispensables orientations permettant de choisir les investigations complémentaires spécialisées et d'optimiser la prise en charge du patient.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation, le secteur d'hématologie-cytologie souhaite adopter une nouvelle méthode de formule sanguine : par microscopie automatisée.

Les difficultés de l'accréditation de ce secteur sont liées à la variabilité inter-opérateur. En cas d'alarme sur les automates de CMF, une formule est réalisée au microscope par les techniciens du secteur de cytologie. Si une anomalie est découverte, la lame est relue par (l'interne éventuellement puis par) le biologiste de validation qui conclut.

En cas de recherche de pathologie des globules rouges, une formule manuelle est réalisée par les techniciens.

Le document SH INF 50 définit dans le domaine « biologie médicale », le sous-domaine « hématologie », et la famille « hématocytologie » la ligne de portée d'accréditation suivante :

« Hémogramme (Numération-formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés) – Méthode de type qualitatif et/ou quantitatif. Principe général des techniques : impédancemétrie, Cytométrie en flux, Cytochimie, Spectrophotométrie, Fluorescence, Radiofréquence, Calcul, Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique. » (tableau du paragraphe Expression de la portée d'accréditation)

Notre travail présentera donc deux versants : l'un quantitatif représenté par la numération des paramètres en pourcentages, l'autre qualitatif avec la détection et la reconnaissance de cellules anormales et l'interprétation globale de l'examen.

L'objectif de notre travail est d'aider le laboratoire à répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15 189 version 2012, pour la réalisation d'une validation initiale et continue d'une méthode automatisée découlant de la formule sanguine sur le DM. Notre validation de méthode concerne donc l'ensemble des éléments détectables lors de la lecture d'un frottis sanguin :

- les PNN
- les PNE
- les PNB
- les lymphocytes
- les monocytes
- les cellules atypiques (blastés, lymphocytes atypiques...)
- les métamyélocytes
- les myélocytes
- les érythroblastés





I.3. Méthodes et résultats

I.3.1. Validation d'une méthode relative à une formule automatisée

I.3.1.1 Situations au cours desquelles une formule au microscope (automatisé ou non) est réalisée

Le Cell-Dyn Sapphire et les Advia possèdent des performances jugées satisfaisantes pour la détection et la quantification des cellules sanguines normalement présentes dans le sang (polynucléaires, lymphocytes et monocytes). Comme tout automate d'hématologie cellulaire, ils sont également capables de détecter les cellules anormalement présentes dans le sang ainsi que les amas plaquettaires en générant des alarmes dont les sensibilités et spécificités ont déjà été évaluées au cours de dossiers de validation de méthode précédents.

La réalisation d'une formule au microscope intervient donc au laboratoire en second lieu lorsque les performances de l'automate sont insuffisantes (cf. sensibilités et spécificités des alarmes) ou dépassées (quantification des cellules anormales ou des schizocytes, détection des anomalies de l'hémoglobine, ...). Le laboratoire a ainsi décrit les critères d'acceptabilité de la formule par automate de CMF, conduisant à la réalisation d'un frottis sanguin pour effectuer un décompte au microscope, dans son mode opératoire « Réalisation d'une numération formule sanguine automatique ».

Ces critères se veulent être adaptés aux exigences que le laboratoire s'est fixé en termes de détection de situations pathologiques. Ils ont été établis en fonction des performances des automates, de la bibliographie [20] et de l'expérience du laboratoire.

En résumé des informations contenues dans ce document, les formules au microscope sont réalisées au laboratoire dans les cas suivants :

- suspicion de circulation dans le sang de cellules anormales, de lymphocytes atypiques (phases leucémiques de lymphomes) ou activés (cas des syndromes mononucléosiques),⁴
- suspicion de mauvais discernement des cellules par l'automate de CMF,⁴
- suspicion d'anomalie sur les hématies (y compris schizocytes et paludisme),⁵
- suspicion d'amas plaquettaires ou d'anomalie sur les plaquettes.⁵

Les formules au microscope sont donc déclenchées à la suite d'alarmes de l'automate, dans les situations biologiques à risque de pathologie hématologique sous-jacente (neutropénies, thrombopénies, hyperlymphocytoses, ...) et dans les situations cliniques entraînant le prescripteur à demander une étude morphologique sur les leucocytes et/ou les hématies.

I.3.1.2 Méthode qualitative ou quantitative ?

Nous rappelons que la portée d'accréditation de la formule manuelle comprend une notion quantitative. Par le classement des leucocytes et autres éléments, le DM permet, lui aussi, de réaliser une formule sanguine exprimée en pourcentages.

⁴ Microscopie manuelle ou automatisée.

⁵ Microscopie manuelle.



Cependant, l'identification des cellules en hématocytologie est considérée par le Cofrac comme étant relative à une méthode qualitative [11]. Et elle a déjà pu être testée dans la validation de méthode pour la lecture de formules manuelles, et est continuellement évaluée dans le maintien des performances du personnel habilité.

Le classement de cette méthode n'est donc pas simple avec des notions à la fois quantitatives et qualitatives. Nous avons alors décidé de réaliser une double validation :

- quantitative pour les pourcentages de chaque lignée leucocytaire dans la formule sanguine ;
- qualitative pour la détection et l'identification des cellules atypiques.

I.3.1.3 Portée A ou B ?

Pour certains, la seule notion de l'intervention de l'œil humain, sur les images d'un microscope, automatisé ou non, suffit pour la considérer comme une analyse qualitative en portée B.

D'autres auditeurs, considérant l'automatisation et la standardisation de la coloration de MGG (May-Grünwald-Giemsa), ainsi que du traitement d'une lame dans le DM, la classent en portée A. Cette coloration est une méthode de référence en Europe. Les colorants et le DM1200 sont marqués CE (conformité européenne), et le laboratoire utilise les conditions préconisées par le fabricant. Nous considérons donc notre validation de méthode comme étant « normalisée » et de portée A.

I.3.2. Validations de méthodes : paramètres quantitatifs

Ces validations de méthode concernent le pourcentage des : PNN (polynucléaires neutrophiles), PNE (polynucléaires éosinophiles), PNB (polynucléaires basophiles), lymphocytes, monocytes, cellules atypiques, métamyélocytes, myélocytes, érythroblastes (compte de cellules pour 100 leucocytes).

I.3.2.1 Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier

Nous sommes dans le cas d'une validation de méthode quantitative et en portée A. Conformément aux recommandations présentées précédemment, les paramètres à vérifier sont :

- la répétabilité
- la fidélité intermédiaire
- l'exactitude
- l'incertitude de mesure
- la comparaison de méthode

La variabilité inter-opérateur a été évaluée lors de l'habilitation du personnel à la lecture des formules manuelles. Le DM1200 n'étant qu'une aide à la réalisation de la formule microscopique, nous n'avons pas jugé pertinent de réévaluer cette variabilité.

La contamination entre échantillon et la recherche d'interférences sont inapplicables étant donné le principe de la technique.

La stabilité des réactifs après ouverture est contrôlée en continu (0), elle ne sera pas étudiée dans cette validation de méthode car une coloration impropre à la lecture d'un frottis est un

critère de rejet lors du test de localisation cellulaire. Ce dernier est réalisé quotidiennement, il permet de vérifier le processus de préparation des lames et le disque dur du système. Lors de ce test, l'opérateur examine toutes les images de la lame pour rechercher des cellules nucléées ayant été manquées par le logiciel.

Les intervalles de référence sont un paramètre à vérifier pour une méthode quantitative. Pour la formule sanguine, on a réalisé une vérification bibliographique.

I.3.2.2 Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier

Il n'existe pas à notre connaissance de limites d'acceptabilités consensuelles adaptées à la formule sanguine concernant la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Le laboratoire a donc décidé de fixer la limite de répétabilité grâce à l'équation $f(x) = \frac{1}{\sqrt{x}} * 100$ (Annexe 2). Ce modèle statistique prend en compte les variations de CV (coefficient de variation) en fonction du pourcentage cellulaire : plus le pourcentage cellulaire cible est bas, plus le CV attendu est grand.

Selon les recommandations de la SFBC (société française de biologie clinique) [17], nous avons fixé la limite d'acceptabilité de la fidélité intermédiaire comme étant 1,33 fois plus fort que celui de la répétabilité, c'est-à-dire selon l'équation : $f(x) = \frac{1,33}{\sqrt{x}} * 100$.

La table de Rümke (Annexe 4), permet de poser les limites d'acceptabilité de l'inexactitude.

Nous ne posons pas de limites d'acceptabilité pour l'incertitude de mesure conformément aux recommandations du SH GTA 14. Aucune incertitude de mesure limite n'est d'ailleurs documentée dans la littérature à notre connaissance. L'incertitude sera calculée à titre informatif et comme base de comparaison pour les futures réévaluations (annuelles selon le SH GTA 14).

Bien que recommandé dans le GTA 04 version 2015, nous avons décidé de ne pas estimer la variabilité inter-opérateurs ; l'homogénéité des résultats étant déjà évaluée régulièrement, dans le maintien des performances du personnel habilité à lire des formules sanguines manuelles.

I.3.2.3 Vérifications bibliographiques

Il n'existe pas de valeurs normales des pourcentages de la formule sanguine. Les seuils sont généralement consultés en fonctions des valeurs absolues.



Les valeurs absolues pour un hémogramme normal [21], [22] sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

De 0 à 12 ans :

| Âge | PNN | Lymphocytes | Monocytes | PNE | PNB |
|---------------|----------|-------------|-----------|---------|-------|
| 0-8j | 2.7-14.4 | 2.0-7.3 | 0-1.9 | 0-0.85 | 0-0.1 |
| 8j-2 sem | 1.5-5.4 | 2.8-9.1 | 0.1-1.7 | 0-0.85 | 0-0.1 |
| 2sem-2mois | 0.7-4.8 | 3.3-10.3 | 0.4-1.2 | 0-0.9 | 0-0.1 |
| 2-6 mois | 1-6 | 3.3-11.5 | 0.2-1.3 | 0.1-1.1 | 0-0.2 |
| 6 mois – 2ans | 1-8 | 3.4-10.5 | 0.2-0.9 | 0-0.9 | 0-0.1 |
| 2-6 ans | 1.5-8.5 | 1.8-8.4 | 0.15-1.3 | 0-1.1 | 0-0.1 |
| 6-12 ans | 1.5-8 | 1.5-5.0 | 0.15-1.3 | 0-1.0 | 0-0.1 |

Après 12 ans :

| | Homme (années) | Min-max | Femme (années) | Min-max |
|-------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| PNN | 12-15 | 1.5-6 | déc-15 | 1.5-6 |
| | 16-49 | 1.78-6.95 | 16-44 | 1.75-7.50 |
| | 50-59 | 1.91-6.63 | 45-49 | 1.81-7.15 |
| | >60 | 1.85-6.14 | 50-54 | 1.72-6.29 |
| | | | >55 | 1.69-5.84 |
| Lymphocytes | 12-15 | 1.5-4.5 | déc-15 | 1.5-4.5 |
| | 16-39 | 1.34-3.92 | 16-29 | 1.37-3.96 |
| | >40 | 1.24-3.62 | >30 | 1.24-3.56 |
| Monocytes | 12-15 | 0.15-1.3 | déc-15 | 0.15-1.3 |
| | 16-39 | 0.23-0.77 | 16-29 | 0.20-0.71 |
| | >40 | 0.23-0.72 | 30-49 | 0.20-0.66 |
| | | | >50 | 0.19-0.60 |
| PNE | 12-15 | 0.05-0.8 | déc-15 | 0.05-0.8 |
| | 16-19 | 0.05-0.63 | 16-19 | 0.04-0.58 |
| | 20-29 | 0.05-0.59 | 20-49 | 0.04-0.55 |
| | 30-59 | 0.05-0.54 | >50 | 0.04-0.47 |
| | >60 | 0.05-0.58 | | |
| PNB | >12 | 0-0.1 | >12 | 0-0.1 |

Tableau 3 : Valeurs normales de l'hémogramme du nouveau-né jusqu'à l'âge adulte.



I.3.2.4 Plan d'expérience et mise en œuvre au laboratoire

Tous les biologistes, techniciens et internes ont été formés à l'utilisation du DM lors de sa livraison par Siemens.

Concernant la répétabilité, il n'est pas possible de faire lire la même lame 3 fois ou plus, ces dernières s'abîmant lors de la manipulation par l'automate et l'essuyage de l'huile entre chaque lecture. Or le DM1200 peut lire dans la même séquence (successivement) jusqu'à 12 lames par magasin. C'est pourquoi, pour chaque lignée leucocytaire, 12 frottis sanguins sont tirés à partir du même échantillon d'un patient choisi. Pour certaines lignées cellulaires présentant une variabilité importante dans la population, 12 lames sont testées à un seuil haut et 12 autres à un seuil bas. C'est le cas des PNN, des lymphocytes et des monocytes. Les 12 frottis sont tirés, colorés, lus par le DM, en même temps, et corrigés par le même opérateur.

A propos de la fidélité intermédiaire, pour les mêmes raisons que celles citées précédemment, il n'est pas envisageable d'utiliser plusieurs fois la même lame. Donc pour chaque lignée leucocytaire, encore une fois, 12 frottis sanguins sont tirés à partir du même échantillon d'un patient choisi. De la même manière, pour certaines lignées cellulaires présentant une variabilité importante dans la population, 12 lames sont testées à un seuil haut et 12 autres à un seuil bas (PNN, lymphocytes et monocytes). Les 12 frottis sont lus par le DM à des dates/demi-journées différentes, avec des magasins différents, et corrigés par des opérateurs différents.

L'exactitude est évaluée à partir de lames issues du programme ABP (association de biologie praticienne) d'EEQ (évaluation externe de la qualité). La valeur cible est définie par la valeur attendue par le programme ABP, et encadrée en utilisant la table de Rümke (Annexe 4).

L'incertitude de mesure est appréciée grâce à la méthode « CIQ/EEQ » à partir du calcul de la justesse.

La comparaison de méthode est réalisée en faisant lire une lame, successivement sur le DM, puis par un opérateur sur un microscope manuel, ou issue d'un échantillon préalablement passé dans l'automate Advia2120 B rendant un résultat de pourcentage par CMF. La comparaison de méthode ne prend pas en compte les autres automates de routine urgente du laboratoire (Advia2120 A et Sapphire). Car ces derniers ont déjà prouvé leur ressemblance dans les résultats rendus avec l'Advia B, lors de leur vérification de méthode initiale respective. Ainsi, si le DM est corrélé avec l'Advia B, alors il est corrélé avec les autres automates.

I.3.2.5 Résultats, interprétation

Selon le SH GTA 01, « dans le cas d'examen dont le résultat repose sur une lecture réalisée par un opérateur (identification fondée sur la morphologie) il appartient au laboratoire d'évaluer régulièrement la qualification des opérateurs réalisant cette tâche. Un moyen alternatif de contrôle peut être le recours à des doubles lectures par différents opérateurs. Les risques doivent être maîtrisés au minimum pour les étapes critiques, qui sont identifiés » [23].

A Limoges, cette évaluation de l'opérateur est déjà pratiquée pour la lecture de formule par microscopie manuelle. Le DM n'étant qu'une aide à l'affichage des cellules, nous n'avons pas jugé nécessaire de doubler cette vérification.



I.3.2.5.1. Analyse de risques

Il est important de pouvoir évaluer les étapes critiques (Annexe 2). Le diagramme des 5M peut être utilisé pour identifier les principaux facteurs d'incertitude susceptibles d'influencer significativement le résultat.

I.3.2.5.1.1. Étape pré-analytique

- Le biologiste doit disposer si possible des renseignements suivants, sans lesquels **l'analyse peut manquer de sensibilité** :

- des informations cliniques pertinentes : l'âge, le sexe, grossesse éventuelle, l'origine ethnique du patient...
- la pathologie diagnostiquée ou suspectée : hémopathie, carence, infection, tumeur solide...
- les signes cliniques éventuels associés : splénomégalie, fièvre, adénopathie(s)...
- le traitement éventuel
- la question posée par le clinicien afin de permettre de lui donner une réponse adaptée
- pour une hémopathie connue, le stade évolutif supposé : diagnostic, suivi, sous traitement, suspicion de rechute, bilan après greffe...

- Nous insistons également sur le respect du **déla**i entre la prise de sang et la réalisation du frottis, que nous avons fixée à 6h au maximum.

En effet, l'EDTA utilisé en cytologie affecte la morphologie cellulaire [24] en provoquant la vacuolisation et la dégranulation des polynucléaires neutrophiles et des aspects pré apoptotiques et apoptotiques des lymphocytes dont les noyaux deviennent irréguliers. Des cellules lymphoïdes normales peuvent ainsi mimer des éléments anormaux ou, au contraire, ces artéfacts peuvent toucher les cellules lymphoïdes anormales authentiques dont le dépistage peut en souffrir.

Ce risque est maîtrisé au niveau des services prescripteurs par la diffusion du catalogue d'analyse et du manuel de prélèvement qui définissent le type de tube à utiliser ainsi que les conditions et durées de transport.

Au niveau du laboratoire, le personnel habilité applique l'instruction sur les critères d'acceptation des échantillons primaires comportant les conditions et la conduite à tenir en cas de non-conformité. De plus, le personnel habilité à réaliser des formules sanguines manuelles est sensibilisé au témoin de vieillissement exagéré des cellules *in vitro* qui est l'aspect échinulé des hématies (échinocytes).

- Le **transport à température ambiante** est lui aussi important pour le respect de l'intégrité des cellules. Il est particulièrement important d'éviter les chocs thermiques [24].

Les conditions de transport sont indiquées dans le catalogue des analyses diffusé aux services. Au sein du laboratoire, la pièce de stockage des échantillons est climatisée avec en-

registrement des températures, permettant le maintien des conditions de température ambiante.

- Au niveau du laboratoire, un autre risque important de l'étape préanalytique est une **identification erronée** du frottis ou une discordance entre l'identité de l'échantillon et celle du frottis.

Le risque d'identification incorrecte du frottis est maîtrisé par l'utilisation d'étiquettes informatiques qui comportent le nom et le prénom du patient, ainsi que la date du jour et le numéro du dossier.

Le risque d'erreur de correspondance entre le frottis et l'échantillon source est maîtrisé par la qualification/habilitation du personnel d'hématocytologie à la réalisation et la lecture d'un frottis sanguin. De plus, le mode opératoire de la réalisation d'une formule manuelle vise à minimiser cette erreur et à détecter une éventuelle discordance : identification du frottis préalablement à son étalement puis vérification de la correspondance avec le tube source ; formule sanguine réalisée le cas échéant avec connaissance des antécédents du patient et dans tous les cas avec les graphiques présentant les résultats de l'automate. En dernier lieu, une éventuelle discordance pourra être détectée par le personnel biologique validant les résultats (toutes les formules manuelles anormales sont validées biologiquement).

- La « **qualité** » du frottis réalisé est, elle aussi, un point critique à maîtriser.

Plusieurs critères macroscopiques et microscopiques définissent un étalement correct : le frottis obtenu doit être mince et régulier, avec des bords sensiblement rectilignes et distants de ceux de la lame (les leucocytes ont tendance à se disposer dans les parties externes du frottis). Au microscope (automatisé ou non), un frottis correctement étalé doit comporter une zone de lecture suffisamment importante où les centres clairs des hématies sont visibles.

Les instructions pour la réalisation d'un frottis sanguin sont décrites dans le mode opératoire « Réalisation d'une formule sanguine manuelle ». Le personnel d'hématocytologie est qualifié et habilité à effectuer des frottis sanguins.

Dans son utilisation spécifique sur le DM, le frottis doit aussi suivre les recommandations du constructeur : il faut « [...] observer une gradation de l'épaisseur, sans aucune irrégularité comme des traînées granuleuses, des creux, des stries, des trous ou des bulles. L'étalement de sang doit mesurer 30 mm de longueur minimum et s'arrêter à 5-15 mm du bord. » (Annexe 5) [25].

I.3.2.5.1.2. Etape analytique

Le risque de la phase analytique concerne principalement la compétence du personnel, mais il porte aussi sur la qualité des réactifs de coloration et sur la capacité du DM à repérer les cellules nucléées. Ces deux derniers points sont cruciaux, les compétences morphologiques n'étant d'aucune utilité sur un frottis de qualité déficiente ou si le microscope automatisé ne prend pas en photo tous les éléments figurés du sang.

- La **compétence du personnel** est assurée par sa qualification et son habilitation à la réalisation d'une formule manuelle (coloration et lecture). Le maintien de ses compétences est réalisé grâce à des confrontations internes cytomorphologiques régulières (cf. point suivant).



- Plusieurs critères permettent de s'assurer de la **qualité de la coloration** [26] : à l'œil nu, un frottis correctement coloré apparaît bleu pâle légèrement teinté de rose, à l'exception des cas d'hyperglobulinémie et du processus nécrotique où les frottis sont colorés en bleu soutenu. Au niveau microscopique, il ne faut pas observer de coloration de la zone intercellulaire, celle-ci doit en effet être claire et transparente. Les hématies doivent apparaître beige rosé, non réfringentes et les autres éléments doivent être colorés selon leurs constituants cellulaires.

La qualité des colorations est maîtrisée par l'utilisation de fiches de suivi des colorants et des séries de colorations (0). Ces fiches permettent la traçabilité des lots des réactifs utilisés, du pH de l'eau tamponnée reconstituée (crucial pour préserver l'affinité tinctoriale des colorants) et des heures de reconstitution des colorants avec validation de la qualité de la première lame de la série selon les critères précédemment cités.

- Les **conditions de coloration** des frottis sont maîtrisées : la pièce est climatisée et un relevé des températures est effectué (température de la pièce et température interne du colorateur). De plus, les conditions de stockage des réactifs non ouverts sont maîtrisées : armoire à « toxiques » à l'épreuve du feu, stockage à température ambiante.

- Enfin, le DM1200 est un automate ne nécessitant pas de contrôles qualité internes à passer plusieurs fois par jour. Il doit néanmoins passer un **test de « localisation cellulaire »** au début de chaque journée. Il permet de vérifier le processus de préparation des lames (coloration) et le disque dur du système.

Il consiste en un repérage par le microscope automatique de 200 cellules sur un frottis sanguin non pathologique avec environ 7-10 G/L globules blancs. L'opérateur vérifie alors que, sur les photos prises, aucune cellule n'a été « oubliée ». Si c'est le cas, il le signale manuellement (Figure 10). Le logiciel doit avoir trouvé tout seul plus de 97% des cellules totales. Lors de la vérification de méthode et de l'étude présentée dans cette thèse, c'est-à-dire sur plus de 40 localisations cellulaires, tous les tests de localisation cellulaire ont été passés avec succès.



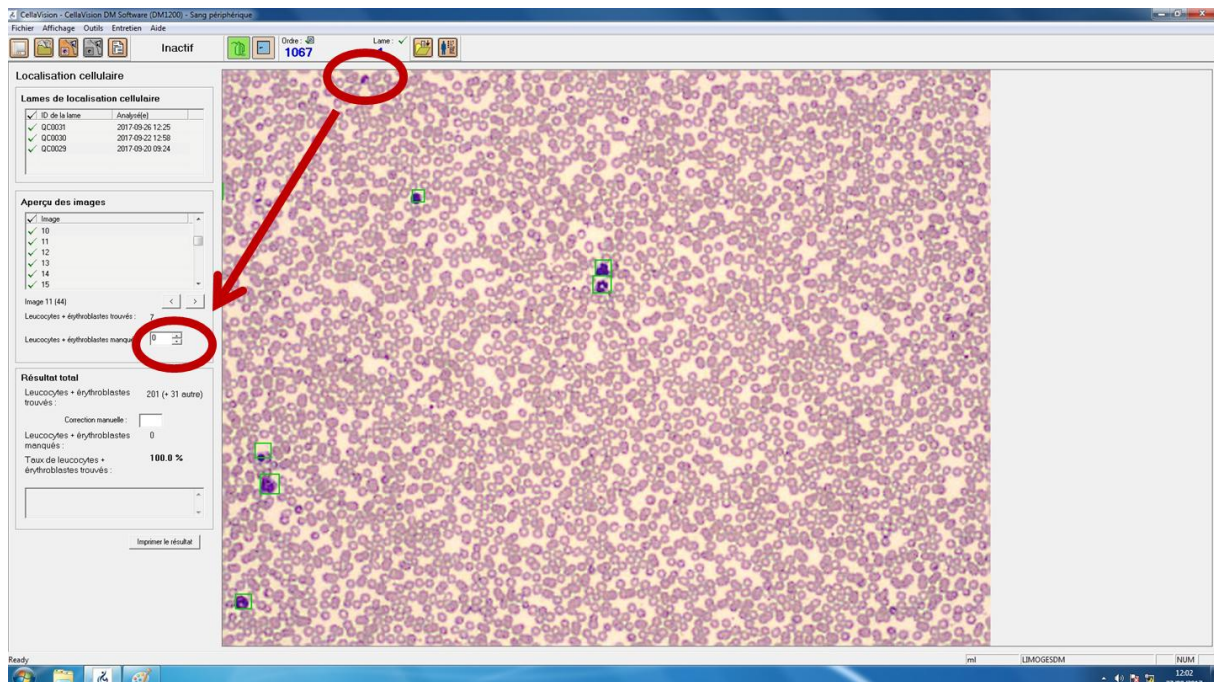


Figure 10 : Test de localisation cellulaire : une cellule « oubliée » par le DM (non encadrée en vert) est signalée par l'opérateur.

I.3.2.5.2. Qualification/habilitation du personnel

Nous avons défini 2 niveaux de compétence adaptés aux activités du personnel :

- Un niveau « de garde » pour le personnel de nuit (20h-8h) comprenant l'identification des amas plaquettaires, le dépistage et la numération des schizocytes, le décompte d'une formule normale et le dépistage sans identification ni comptage des éléments « anormaux » (en particulier les blastes). Ce niveau comprend aussi la capacité à tenir le poste « automate » avec la connaissance des critères pour lesquels un frottis manuel doit être analysé en urgence, ainsi que les critères d'appel du biologiste d'astreinte.
- Un niveau dit « de routine » pour le personnel de jour (8h-20h) assurant la maîtrise de la formule sanguine normale et pathologique dans la majorité des situations et la capacité, en cas de non reconnaissance d'éléments, à transmettre la lame ou les images à un senior, technicien ou biologiste, de façon adaptée à l'urgence.

L'habilitation du personnel peut se faire par « validation des acquis », sur l'ancienneté, pour le personnel en place depuis des années au laboratoire, ou suite à une formation initiale en interne pour les personnes nouvellement arrivées (y compris les internes).

Le maintien des compétences est assuré par la participation aux confrontations internes cytomorphologiques (cf. point I.3.2.5.3.1) pour le personnel qui effectue une activité régulière de lecture de lames. Des formations internes et externes tracées, ainsi que la mise à jour régulière de la bibliographie par le biologiste responsable du secteur, avec restitution au personnel, complètent le maintien des compétences.

I.3.2.5.3. Suivi des confrontations internes cytomorphologiques et des EEQ

Une instruction a été créée spécifiquement pour la gestion des contrôles de qualité des formules manuelles. Elle comprend les détails de la mise en œuvre de ces contrôles avec les

modalités d'enregistrement et de traitement statistique des données ainsi que la conduite à tenir en cas de dépassement des limites acceptables.

I.3.2.5.3.1. Présentation des confrontations internes

Des confrontations internes de cytomorphologie sont formalisées depuis le 1er janvier 2012.

Ces contrôles de qualité sont composés de frottis sanguins lutés choisis parmi les échantillons de routine de manière à couvrir l'étendue des pathologies rencontrées au CHU. Avec une fréquence initiale de 4 frottis mensuels permettant d'obtenir un grand nombre de résultats pour les validations de méthodes, la fréquence a été réduite en juin 2012 à l'analyse de 2 frottis par périodes de deux mois. Un paramétrage du système informatique de gestion conduit chaque participant à enregistrer son frottis de contrôle à la manière d'un échantillon de patient, permettant de se rapprocher au maximum des conditions usuelles de travail. Outre le décompte, le participant précise des commentaires éventuels : morphologiques, caractère d'urgence, lame confiée à un référent ou non en situation « réelle ».

Les résultats sont par la suite enregistrés dans un programme Excel « maison » pour leur traitement statistique. L'accent est principalement mis sur les techniciens qui sont responsables de la quasi-totalité des formules manuelles effectuées. Ce fichier est composé de différents onglets :

- 1 onglet de présentation facilitant l'utilisation du tableur.
- 17 onglets consacrés aux techniciens participants aux contrôles de qualité. Ces onglets permettent la diffusion sous forme papier de rapports individuels comprenant :
 - pour chaque type cellulaire :
 - le résultat du technicien
 - la moyenne des résultats des techniciens
 - la valeur cible (moyenne des résultats des biologistes) et un intervalle cible calculé depuis la table de Rümke [23], extrapolée pour être applicable au laboratoire
 - l'écart par rapport à la moyenne des techniciens, exprimé en nombre d'écart-type (idéalement entre -2 et +2)
 - l'écart par rapport à la valeur cible, exprimé en nombre d'écart-types (idéalement entre -2 et 2)
 - la demande du technicien à revoir la lame avec le biologiste
 - la caractéristique principale du frottis (ex : leucémie myéloïde chronique)
- 1 onglet "recap tec" récapitulant les résultats de l'ensemble des techniciens et permettant leur analyse statistique. Cet onglet contient également les résultats de l'automate lorsqu'ils sont disponibles.
- 1 onglet "internes" et 1 onglet "biologistes" où sont recueillis les résultats des internes et des biologistes.



- 1 onglet "statistiques" où les performances de l'ensemble des techniciens du laboratoire sont analysées grâce à un système de cotation, chaque résultat de technicien étant affecté d'une lettre (de « a » à « c ») :

- a : valeur du technicien comprise dans la fourchette « moyenne de l'ensemble des techniciens +/- 2 écart-types ».

- b : valeur du technicien à l'extérieur de la fourchette précédemment citée mais à l'intérieur de la « fourchette cible » établie selon la table de Rümke extrapolée (Annexe 4).

- c : résultat hors limite. La demande de relecture de la lame avec le biologiste est alors particulièrement prise en compte.

Les personnes le souhaitant et celles ayant des résultats non conformes (cotation « c » ou lame non confiée à tort en routine à un senior) revoient les frottis avec le biologiste référent sur le microscope multi-têtes. Eventuellement, des actions complémentaires sont mises en place (formation complémentaire...). Ces relectures sont tracées, elles permettent la formation continue.

Les cotations sont additionnées sur l'année en cours. Elles permettent de connaître les performances du laboratoire paramètre par paramètre et ainsi la vérification en continue des performances du laboratoire dans sa globalité. Cette analyse permet également d'ajuster le choix des lames pour les confrontations internes et d'évaluer la progression du personnel entre deux contrôles présentant des caractéristiques similaires.

I.3.2.5.3.2. Présentation de l'EEQ

Le laboratoire participe au programme d'évaluation externe de qualité de l'Association de Biologie Praticienne (ABP). Des séries de 4 frottis sanguin lutés et colorés sont reçues 3 fois dans l'année, accompagnées de documents présentant les cas et les résultats des numérations sanguines.

Tous les frottis sont analysés par le biologiste responsable du secteur. Il envoie ses résultats ainsi qu'une hypothèse diagnostique à l'ABP (les frottis reçus sont tous pathologiques).

Même si le laboratoire ne peut fournir qu'une réponse par lame d'EEQ, nous avons mis en place un système permettant de faire profiter l'ensemble des microscopistes à la formation continue offerte par ces programmes : un des frottis est systématiquement intégré aux séries de confrontations internes cytomorphologiques (qui sont donc constituées de l'analyse de 3 lames tous les 2 mois). Le frottis inclus est choisi par le biologiste responsable du secteur en fonction des besoins de formation du laboratoire. Les participants ont accès aux informations fournies par l'ABP. Les résultats sont analysés de façon identique aux autres frottis de la série, à ceci près que la valeur cible retenue est la moyenne de l'ensemble des participants et non celle des biologistes. Cette particularité permet le calcul du biais pour les résultats des biologistes, ce qui est impossible avec les confrontations cytomorphologiques « maison ».

Les résultats de l'ABP sont reçus sous forme électronique. En plus de l'évaluation des résultats du laboratoire grâce à une note, les rapports comprennent les notions essentielles sur les pathologies abordées et incluent des images numérisées. Ces rapports sont mis à la libre disposition du personnel d'hématocytologie, ils participent à la formation continue.

I.3.2.5.4. Résultats

Les résultats obtenus sont synthétisés dans les tableaux ci-dessous.

I.3.2.5.4.1. PNN

I.3.2.5.4.1.1. Tableau récapitulatif

Le décompte des pourcentages de chaque lignée cellulaire est calculé sur environ 200 globules blancs par l'automate.

| | | Répétabilité | Fidélité intermédiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élargie U | Comparaison de méthode |
|--------------------|-----------------------------------|--------------|------------------------|--|---------------------------------|---|
| Niveau bas | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ disponibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible | / | Équation de la droite de régression Advia/DM : $y=1,02x - 2,01$ Micro manuel/DM : $y=0,99x-1,56$ |
| | Valeur moyenne (%) | 33,3 | 32,85 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 17,3 | 23 | | 7,2 | |
| | Résultats (%) | 9,99 | 4,77 | | | |
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | | / | |
| | Valeur moyenne (%) | 65,6 | 65,23 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 12,3 | 16,36 | | 6,4 | |
| | Résultats (%) | 4,34 | 6,05 | | | |

Tableau 4 : Résultats de la validation des PNN.

I.3.2.5.4.1.2. Conclusion

Habituellement, il est attendu un résultat de CV un peu plus élevé pour la fidélité intermédiaire par rapport à la répétabilité. Ce n'est pas le cas pour les lames avec un niveau bas de PNN. Néanmoins ces valeurs sont très satisfaisantes, bien en dessous des seuils prédéfinis.

Les incertitudes sont conformes aux attentes du laboratoire. Sur des valeurs basses de leucocytose (<2 G/L) où l'incertitude peut avoir un impact de signification clinique sur la valeur absolue de PNN il est établi de se référer et de privilégier le résultat de l'automate compteur de cellules Advia ou Sapphire (si graphes conformes).

Au total, le résultat quantitatif des PNN est conforme aux objectifs préalablement fixés.



I.3.2.5.4.2. PNE

I.3.2.5.4.2.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité intermé- diaire | Exactitude | Incertitude de mesure élargie U | Comparaison de méthode |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------|---|---------------------------------------|--|
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ dispo- nibles : 7 valeurs sont comprises dans la four- chette cible | / | Équation de la droite de régres- sion Advia/DM : $y=1,2x-0$ Micro manuel/DM : $y=1,04x+0,3$ |
| | Valeur moyenne (%) | 9,14 | 8,33 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 33,08 | 44 | | | |
| | Résultats (%) | 20,46 | 23,5 | | NA | |

Tableau 5 : Résultats de la validation des PNE

I.3.2.5.4.2.2. Conclusion

Concernant l'exactitude, une des valeurs obtenues est un peu supérieure à la valeur limite fixée : 73,8% pour une limite supérieure à 73,5%, valeur attendue 62%. Elle est acceptée car pas de conséquence clinique (le pourcentage de PNE compris entre 62 et 73.8% a une pertinence clinique identique).

Les résultats de répétabilité, fidélité intermédiaire et exactitude sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées.

I.3.2.5.4.3. PNB

I.3.2.5.4.3.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité in- termédiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élar- gie U | Comparaison de méthode |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--|---|--|
| Niveau haut | Nombre de valeurs | NA | NA | 4 résultats d'EEQ dispo- nibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible | / | Équation de la droite de régression micro ma- nuel/DM : $y=0,992x+0,$ 6115 |
| | Valeur moyenne (%) | NA | NA | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | NA | NA | | | |
| | Résultats (%) | NA | NA | | NA | |

Tableau 6 : Résultats de la validation des PNB.

Il y a trop peu de basophiles sur les numérations classiques pour réaliser une étude de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire.

I.3.2.5.4.3.2. Conclusion

L'exactitude des PNB, vérifiée sur site, est conforme aux objectifs préalablement fixés. Et ce, de la même manière sur les lames avec des taux élevés (cas ABP de LMC -leucémie myéloïde chronique-) ou normaux.

En raison de la rareté des cas avec basophilie, la comparaison de méthode a été vérifiée à partir de sang normal et de valeurs élevées issues des EEQ ABP. Les résultats microscope



manuel et DM étaient corrélés au sens impact clinique (conformes pour chacun selon la table de Rümke). La droite de régression est donnée à titre indicatif, et est conforme.

I.3.2.5.4.4. Lymphocytes

I.3.2.5.4.4.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité inter- médiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élargie U | Comparaison de méthode |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|---|
| Niveau bas | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ dis- ponibles : 7 valeurs sont comprises dans la fourchette cible | / | Équation de la droite de ré- gression Ad- via/DM : $y=1x-$ $2,4$ Micro ma- nuel/DM : $y=0,9x+0,2$ |
| | Valeur moyenne (%) | 4,93 | 4,72 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 45 | 59,85 | | 4,4 | |
| | Résultats (%) | 34,01 | 32,59 | | | |
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | | / | |
| | Valeur moyenne (%) | 54,13 | 55,06 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 13,59 | 18,07 | | 10,2 | |
| | Résultats (%) | 7,01 | 5,84 | | | |

Tableau 7 : Résultats de la validation des lymphocytes.

I.3.2.5.4.4.2. Conclusion

Contrairement à ce qu'on pourrait s'attendre, les résultats de CV sont plus élevés pour la répétabilité. Ils restent néanmoins très satisfaisants, bien en dessous des seuils prédéfinis.

Pour l'exactitude, une valeur obtenue est un peu inférieure à la valeur limite fixée : 26,3% pour une limite à 26,8% (valeur attendue 36%). Elle est acceptée car pas de conséquence clinique (le pourcentage de lymphocytes compris entre 26.3 et 36% a une pertinence clinique identique chez ce cas avec 29% de cellules de Sézary).

Les résultats de répétabilité, fidélité intermédiaire et exactitude sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées.



I.3.2.5.4.5. Monocytes

I.3.2.5.4.5.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité inter- médiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élargie U | Comparaison de méthode | |
|------------------------|--|-------------------|-----------------------------|---|------------------------------------|---|---|
| Niveau bas | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ dispo- nibles : toutes les valeurs sont com- prises dans la fourchette cible | / | Équation de la droite de régression Advia/DM : $y=1,03x-0,3$ Micro ma- nuel/DM : $y=0,82x+0,6$ | |
| | Valeur moyenne (%) | 4,13 | 4,28 | | | | |
| | Limites d'accepta- bilité du CV (%) | 49,26 | 65,52 | | 5 | | |
| | Résultats (%) | 44,5 | 19,34 | | | | |
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | | / | | Non fait, pas assez de valeurs hautes dans les EEQ |
| | Valeur moyenne (%) | 15,8 | 15,63 | | | | |
| | Limites d'accepta- bilité du CV (%) | 25,16 | 33,46 | | | | |
| | Résultats (%) | 14,51 | 13,14 | | | | |

Tableau 8 : Résultats de la validation des monocytes.

I.3.2.5.4.5.2. Conclusion

Au total, le résultat quantitatif des monocytes est conforme aux objectifs préalablement fixés.

I.3.2.5.4.6. Cellules atypiques

I.3.2.5.4.6.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité inter- médiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élargie U | Compa- raison de mé- thode |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 5 résultats d'EEQ dispo- nibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible | / | NA |
| | Valeur moyenne (%) | 29,15 | 30,54 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 18,52 | 24,63 | | 10,5 | |
| | Résultats (%) | 10,85 | 9,9 | | | |

Tableau 9 : Résultats de la validation des cellules atypiques.

I.3.2.5.4.6.2. Conclusion

Les résultats de répétabilité, fidélité intermédiaire et exactitude sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées.



I.3.2.5.4.7. Métamyélocytes

I.3.2.5.4.7.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité inter- médiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élar- gie U | Compa- raison de mé- thode |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--|---|-------------------------------------|
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ dispo- nibles : toutes les valeurs sont comprises dans la four- chette cible | / | NA |
| | Valeur moyenne (%) | 13,08 | 12,13 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 27,65 | 36,77 | | | |
| | Résultats (%) | 6,87 | 13,57 | | NA | |

Tableau 10 : Résultats de la validation des métamyélocytes.

I.3.2.5.4.7.2. Conclusion

Au total, le résultat quantitatif des métamyélocytes est conforme aux objectifs préalablement fixés.

I.3.2.5.4.8. Myélocytes

I.3.2.5.4.8.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité inter- médiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élargie U | Compa- raison de mé- thode |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ dispo- nibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible | / | NA |
| | Valeur moyenne (%) | 26,73 | 28,78 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV (%) | 19,34 | 25,73 | | | |
| | Résultats (%) | 7,07 | 8,7 | | NA | |

Tableau 11 : Résultats de la validation des myélocytes.

I.3.2.5.4.8.2. Conclusion

Les résultats de répétabilité, fidélité intermédiaire et exactitude sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées.



I.3.2.5.4.9. Erythroblastes

I.3.2.5.4.9.1. Tableau récapitulatif

| | | Répé- tabilité | Fidélité inter- médiaire | Exactitude | Incertitude de mesure élar- gie U | Compa- raison de mé- thode |
|------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------|--|---|-------------------------------------|
| Niveau haut | Nombre de valeurs | 12 | 12 | 8 résultats d'EEQ dispo- nibles : toutes les valeurs sont comprises dans la four- chette cible | / | NA |
| | Valeur moyenne | 11,65 | 11,68 | | | |
| | Limites d'acceptabilité du CV | 29,3 | 38,97 | | NA | |
| | Résultats | 31,24 | 27,29 | | | |

Tableau 12 : Résultats de la validation des érythroblastes.

Pour la répétabilité, le CV obtenu est un peu supérieur à la valeur limite fixée. La répétabilité est acceptée en raison du mode d'expression non en pourcentages mais rapporté au nombre de GB (variabilité supplémentaire). L'autre explication est probablement la répartition hétérogène de ces éléments figurés du sang sur un frottis, rendant la dispersion des valeurs importante. Il n'y a pas de conséquence clinique : l'érythroblastose comprise entre 6 et 17.2 pour 100 GB ont une pertinence clinique identique. Ces deux valeurs sont respectivement la valeur minimale et la valeur maximale retrouvées dans le décompte des érythroblastes de ces 12 lames.

I.3.2.5.4.9.2. Conclusion

Au total, le résultat quantitatif des érythroblastes est conforme aux objectifs préalablement fixés.



I.3.3. Validations de méthodes : paramètres qualitatifs

La partie qualitative de la validation de méthode concerne la détection et l'identification des cellules atypiques.

I.3.3.1 Tableau récapitulatif

| Echantillons | Valeur Labo | Cible (valeur attendue) | LA inf | LA sup | Diagnostic labo | Diagnostic attendu | Conclusion |
|--------------|-------------|-------------------------|--------|--------|--|--|------------|
| ABP 2014-1-A | 56.3 | 60 | 51.2 | 71.5 | Neutrophiles hypogranuleux, évolution blastique d'un syndrome myélodysplasique | Neutrophiles hypogranuleux, évolution blastique d'un syndrome myélodysplasique | Conforme |
| ABP 2014-1-C | 72.6 | 78 | 70.8 | 90.2 | Dissémination sanguine d'un lymphome non hodgkinien à cellules du manteau, ou d'un lymphome à petites cellules matures | Dissémination sanguine d'un lymphome non hodgkinien à cellules du manteau, ou d'un lymphome à petites cellules matures | Conforme |
| ABP 2014-1-D | 18.2 | 19 | 11.6 | 27.7 | Leucémie à tricholeucocytes | Leucémie à tricholeucocytes | Conforme |
| ABP 2014-2-C | 36.1 | 29 | 20.3 | 38.6 | Sd de Sézary | Sd de Sézary | Conforme |
| ABP 2014-3-D | 6.1 | 6 | 2.2 | 12.6 | Neutrophiles hypogranuleux, suspicion d'AREB ou de Leucémie Aiguë myéloïde avec dysplasie | Neutrophiles hypogranuleux, suspicion d'AREB ou de Leucémie Aiguë myéloïde avec dysplasie | Conforme |

Tableau 13 : Résultats qualitatifs de l'identification des cellules atypiques.

Concernant la sensibilité, 9 cas de sang contenant des cellules anormales de nature diverse : lymphoblastes dont un cas sous corticothérapie, monoblastes, myéloblastes, cellules de lymphomes (manteau, Sézary, tricholeucocytes), ont été testés pour la détection de cellules atypiques sur le DM1200 avec 100% de sensibilité : 9 vrais positifs et 0 faux négatifs.

I.3.3.2 Conclusion

L'exactitude et la sensibilité sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées.

I.3.4. Confirmation des performances en pratique quotidienne

Le DM1200 n'étant qu'une aide à la réalisation de la formule microscopique, la confirmation des performances du DM est à rapprocher de celle de la formule sanguine manuelle. Ceci est réalisé grâce à la participation aux confrontations internes cytomorphologiques et aux EEQ par le personnel concerné. Il a été choisi de réaliser un contrôle de 4 lames tous les 3 mois, prenant en compte les critères : quantitatifs de pourcentages de chaque lignée cellulaire identifiée, et qualitatifs de diagnostic biologique.



En tant que méthode quantitative, il est important de suivre la fidélité intermédiaire afin d'assurer l'homogénéité des résultats et commentaires. Ce facteur est suivi avec les confrontations cytomorphologiques.

Les autres points de maîtrise de la qualité des méthodes qualitatives décrits dans le SH GTA 06 sont pris en compte dans l'analyse de risques et maîtrisés : conditions environnementales, équipements, qualité de l'étalement du frottis et de la coloration.





I.4. Discussion

Les validations de méthodes permettent d'apporter des preuves tangibles sur la qualité des analyses réalisées, la fiabilité des résultats et la compétence du personnel. Il s'agit d'un moyen efficace d'évaluation des performances d'un nouvel automate au sein d'un LBM.

Les avancées dans les automates de numération, de CMF et de biologie moléculaire n'ont jamais détrôné la cytologie. Ainsi, la formule sanguine au microscope (automatisé ou non) est l'examen cytologique indispensable pour l'analyse quantitative et qualitative des cellules sanguines. Même s'il est surtout important pour une formule sanguine de détecter les cellules anormales, il est inconcevable de ne pas tester les performances quantitatives de la méthode. Concernant le versant quantitatif, il est nécessaire de prouver que le résultat d'une formule sanguine est similaire quel que soit l'opérateur ayant effectué le décompte (au moins dans sa pertinence clinique). Les résultats de fidélité intermédiaire obtenus nous permettent largement de conclure positivement. Ils sont la conséquence des options permises par la microscopie automatisée comme :

- le décompte sur 200 cellules sanguines, contre 100 cellules pour la microscopie manuelle, initialement décidé pour des contraintes de temps (l'automate peut compter jusqu'à 500 cellules par lame)
- la comparaison des cellules entre elles par l'affichage simultané de dizaines de cellules sur un même écran, impossible lors de l'utilisation d'un objectif x100 sur un microscope manuel (Figure 11)

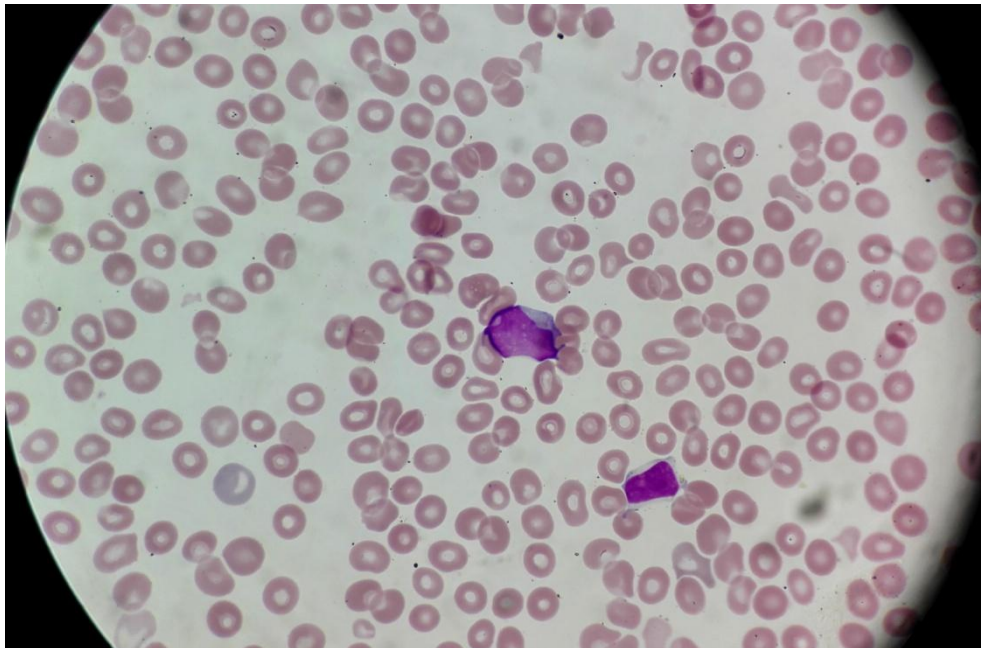


Figure 11 : Microscopie manuelle à l'objectif x100 : pour une numération à environ 7G/L, seulement 2 cellules sont ici visualisables dans un même champ (à gauche, blaste avec corps d'Auer ; à droite, lymphocyte).

Source : photo M. Labriffe, Limoges.

- l'utilisation d'une bibliothèque d'images de référence proposée par Cellavision®, qui peut être enrichie au fur et à mesure par les cas d'intérêt observés en routine



- et encore d'autres possibilités non développées ici : zoom sur chaque image, changement des contrastes, des teintes etc.

Cette validation de méthode quantitative de la formule automatisée nous a permis de connaître les performances et les limites de cette méthode, et de confirmer qu'elle participe à la qualité des résultats rendus aux patients. Elle a souligné la dispersion des valeurs obtenues pour le décompte des érythroblastes pour 200 leucocytes.

Pour le versant qualitatif, le point crucial est de garantir la meilleure sensibilité possible dans l'identification des cellules atypiques. Sur les 9 lames passées dans le DM1200, à chaque fois l'automate a su alerter sur la présence de ces cellules dans la pré-classification, avant toute intervention de l'opérateur. Avec la microscopie automatisée, c'est toujours l'opérateur (biologiste ou technicien) qui « a le dernier mot » sur les cellules visualisées sur l'écran. Il rappelle donc l'importance des programmes de CIQ (contrôle interne de qualité) pour les formules manuelles sanguines, gérés en partie par une technicienne référente, en partie par un biologiste. Ces programmes participent à la formation continue et au maintien des compétences du personnel.

A l'heure où l'e-médecine prend une part importante de la médecine moderne pour l'informatisation généralisée des données des patients et la mise en réseau de ces informations, la technologie de numérisation des lames en hématocytologie [27], constitue une avancée majeure. Car, en plus de réaliser des photos individuelles pour chaque cellule, le DM est un appareil capable de numériser des aires entières d'un frottis sanguin. De cette façon, la lame virtuelle se distingue des photographies numériques de champs microscopiques qui ne sont que des images statiques et ponctuelles, sélectionnées par un observateur. Ainsi elle pourrait être mise à profit pour faire des contrôles de qualité en hématocytologie.

Les avantages de la numérisation des éléments figurés du sang de chaque patient sont nombreux :

- les photos peuvent être visualisées simultanément par différents utilisateurs facilitant l'enseignement médical, ou tout simplement la discussion entre experts de cas complexes ; les microscopes multi têtes nécessitant souvent un espace dédié, un investissement et un entretien important
- les lames peuvent être observées successivement par de nombreux utilisateurs sans courir le risque d'endommager le frottis par l'utilisation répétée d'huile (ensuite essuyée) et de l'objectif dessus
- les images sont facilement extraites sur disque dur externe, ou partagées par email (fichiers images anonymisés)
- toutes les données sont archivées informatiquement sur des servers sécurisés du CHU, qui permettent de remonter dans les antécédents d'un même patient, permettant un suivi approfondi
- le gain de temps pour l'opérateur qui peut effectuer d'autres tâches pendant que l'automate pré-classe les cellules nucléées
- la possibilité de pouvoir reclasser, valider la formule de manière délocalisée à distance
- la possibilité d'avoir une vue d'ensemble « dézoomée » permettant de détecter d'éventuelles anomalies des globules rouges (ex. parasitémie intra-érythrocytaire).



Les performances du DM concernant les globules rouges et les amas plaquettaires n'ont pas été testées dans ce projet, car grandement dépendantes de la qualité du frottis et de la zone visualisée par l'automate (faux négatifs). Les amas plaquettaires sont habituellement retrouvés sur les bords du frottis, alors que la zone de monocouche cellulaire recherchée par le DM est généralement située au centre.

Les autres limites retenues pour cette méthode sont :

- le temps : chaque lame est lue par le DM en environ 4 min (pour 200 cellules pré-classées),
- le coût du microscope automatique,
- l'indispensable formation du personnel à la réalisation de frottis « compatibles » à la lecture par l'automate : ils doivent être larges et longs (Annexe 5).





I.5. Conclusion

La portée flexible standard (A) a permis au service d'hématologie du CHU de Limoges d'adopter une nouvelle méthode comprise dans la portée d'accréditation de l'hémogramme (I.1.3.3).

Nous avons validé la formule sanguine par microscopie automatisée. Même s'il s'agit d'une vérification des performances (portée A), la difficulté de cette thèse a reposé sur la quantité importante de frottis sanguins à tirer, puis à valider/reclasser (environ 200 cellules par frottis sanguins). Les frottis devaient être suffisamment nombreux pour conclure sur les 9 sous-processus que sont les lignées cellulaires étudiées, et ils devaient montrer une large diversité pour représenter le panel d'échantillons traité par un laboratoire d'hématologie biologique.

Le sepsis est une de ces situations fréquemment rencontrées, avec ses spécificités cytologiques et ses enjeux pronostiques. Nous allons donc maintenant voir quel rôle peut jouer la microscopie automatisée dans ce contexte de patient septique.





II. Immatures granuleux du sepsis : comparaison avec la CMF

II.1. Généralités

II.1.1. Sepsis

II.1.1.1 Epidémiologie

II.1.1.1.1. En France

Alors même que la fréquence du choc septique (exprimée pour 100 admissions en réanimation) est en augmentation croissante au cours des 20 dernières années (8,2 en 1993 à 15,4 en 2010), on relève une diminution significative de sa mortalité en réanimation (60,1 % en 1993 à 39,5 % en 2010) et, à un moindre degré, à l'hôpital (62 % en 1997 à 48,7 % en 2011) [28]. Cette diminution de la mortalité est sans doute en partie liée à l'intérêt porté par les réanimateurs pour cette pathologie ces dernières années, ainsi qu'à l'optimisation des prises en charge des patients. Quoi qu'il en soit, les chiffres de mortalité restent très élevés.

II.1.1.1.2. Aux États-Unis

Le sepsis reste donc un enjeu important dans les soins, et pas seulement en France. Aux États-Unis, le sepsis présente un taux de mortalité qui varie de 10 à 50%, et est aussi un des motifs les plus communs d'admission dans les services de réanimation [29]–[32].

En effet, Angus [30] décrit une incidence de 3 cas pour 1000 habitants, avec une mortalité hospitalière de 28,6%, un sex-ratio de 53,6% d'hommes, et une durée moyenne d'hospitalisation de 19,6 jours, pour un coût moyen de 22100\$ par patient.

Toujours à partir des critères de codification diagnostique américaine (ICD-9-CM), Martin [29] observe également une incidence s'élevant à 2,4 cas pour 1000 habitants, un risque relatif augmenté chez les hommes, et une mortalité hospitalière de 17,9%.

II.1.1.2 Enjeux du sepsis

Malgré une détection précoce des cas de sepsis, et des soins appropriés [33], certains patients présentent très tôt une aggravation clinique [34]–[36]. Plusieurs essais cliniques ont tenté d'évaluer la valeur de marqueurs variés comme la présepsine ou N-GAL pour prédire l'état clinique de patients septiques admis dans des services d'urgences [37]–[40] ; la plupart sur de petites populations, et ils évaluaient la capacité de marqueurs biologiques à prédire le décès à distance chez les patients septiques. Néanmoins, aucun essai n'a évalué la capacité de marqueurs biologiques à prédire fidèlement une aggravation clinique précoce. De plus, de précédentes études ont montré que les patients transférés d'un service conventionnel vers des soins intensifs présentaient un moins bon pronostic que les patients admis directement aux soins intensifs [36], [41], [42]. Par conséquent, un marqueur biologique permettant de prédire précocement la progression du sepsis pourrait être très utile en clinique pour le repérage des populations à haut risque d'aggravation à court terme, pour adapter le niveau de surveillance, et pour une bonne orientation à l'admission.



II.1.1.3 Définitions du sepsis

II.1.1.3.1. Premières définitions

Le sepsis a été défini pour la première fois par Bone et al. [43] en 1991 lors de la conférence de consensus associant deux sociétés savantes nord-américaines : l'American College of Chest Physicians (ACCP) et la Society of Critical Care Medicine (SCCM).

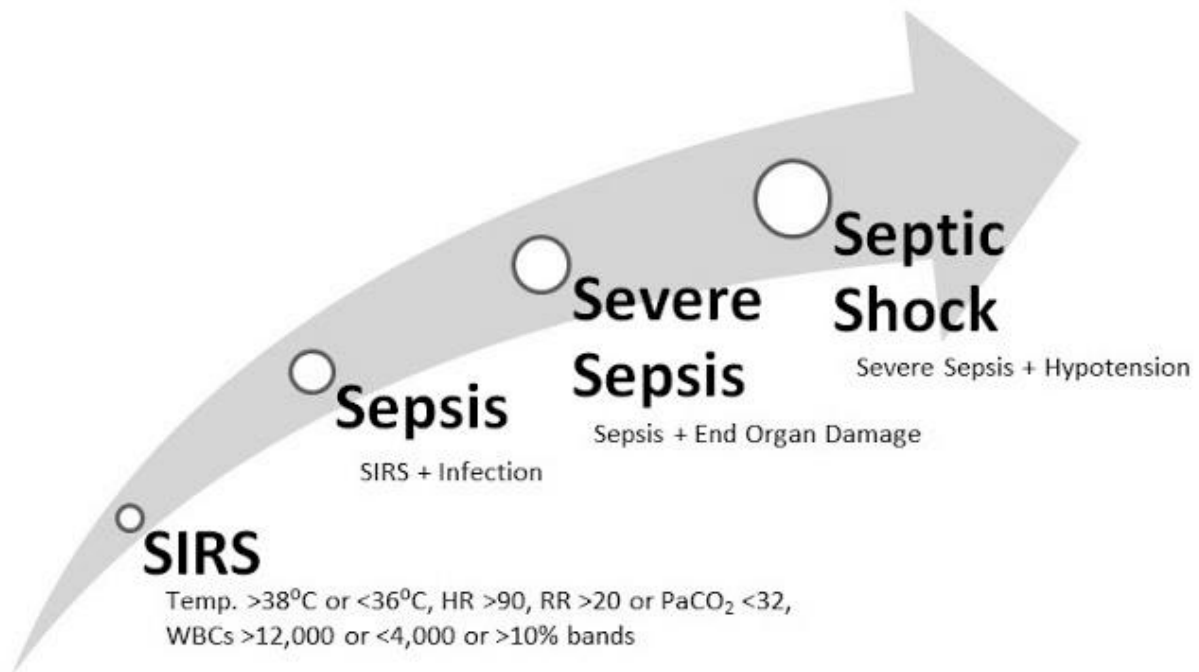


Figure 12 : Définition du sepsis en 4 stades.

SIRS : 2 critères parmi ceux présentés

Sepsis sévère : sepsis associé à hypotension artérielle, et/ou hypoperfusion, et/ou dysfonction d'un ou plusieurs organes (encéphalopathie septique, syndrome de détresse respiratoire aiguë, oligurie < 1 mL/kg/h, acidose métabolique inexplicée, hyperlactacidémie, coagulation intravasculaire disséminée)

Choc septique : signes d'hypoperfusion persistants malgré un remplissage adapté et/ou la nécessité d'utilisation de drogues vasoactives.

Source : « Defining Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis Criteria », *Internalize Medicine in Critical Care, Medicine* [43]

Le sepsis se divise alors en quatre stades : syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), sepsis, sepsis sévère et choc septique [43]. Et par définition, la présence de band cells est un des quatre critères possibles (deux minimum) pour définir le SIRS (Figure 12). Le pourcentage d'immatures granuleux, dont les band cells font partie, doit être supérieur à 10% pour remplir ce critère.

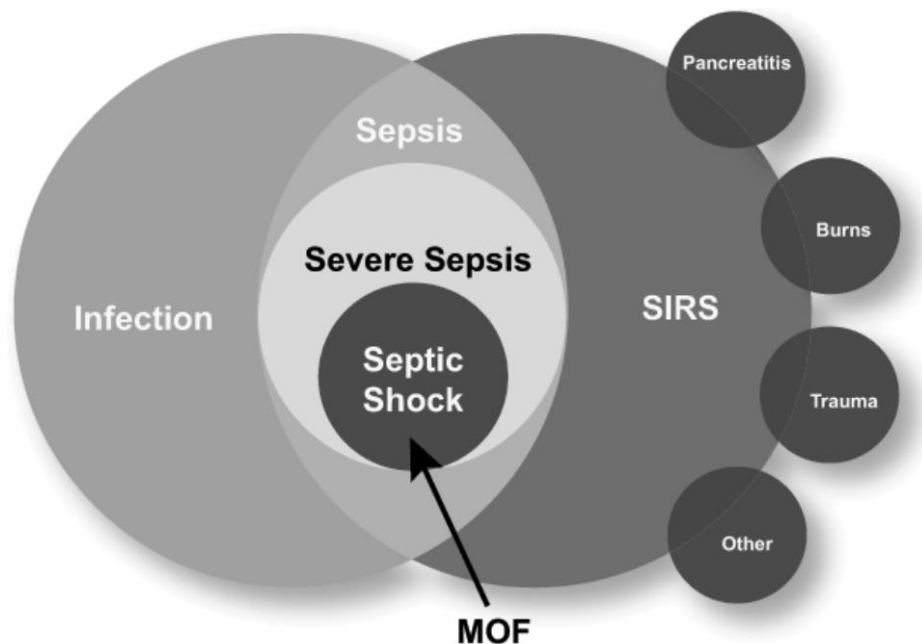


Figure 13 : Définition du sepsis selon Bone. MOF : Multi-Organe Failure durant le choc septique.

Source : [43] Bone et al. *Chest* 1992;101;1644

II.1.1.3.2. Nouvelles définitions

Elles sont issues d'un groupe de travail de la Society of Critical Care Medicine et de l'European Society of Intensive Care Medicine.

Le processus d'écriture a comporté une analyse de la littérature, la rédaction de critères, et une analyse « big data » de bases de données hospitalières. Les définitions précédentes dataient de 2001, et maintenaient les concepts de sepsis, sepsis grave et choc septique proposés depuis Bone en 1991, reposant largement sur le niveau d'inflammation et une hypothèse de continuum entre les 3 concepts (Figure 13).

Le sepsis est maintenant défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection. Il n'y a plus de notion de SIRS ou de distinguo sepsis/sepsis grave. La présence de 2 points minimum, OU une augmentation de 2 points si dysfonction présente avant infection, dans le score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) définit le sepsis chez un patient avec infection (Tableau 14).

| Calcul du score SOFA | 0 point | 1 point | 2 points | 3 points | 4 points |
|--|-------------|-----------------|---|---|---|
| PaO ₂ /FiO ₂ | >400 | 301-400 | 201-300 | 101-200 et VA | ≤ 100 et VA |
| Plaquettes x10 ³ /mm ³ | >150 | 101-150 | 51-100 | 21-50 | ≤20 |
| Bilirubine, mg/L (mmol/L) | <12 (<20) | 12-19 (20-32) | 20-59 (33-101) | 60-119 (102-204) | >120 (>204) |
| Hypotension | PAM ≥70mmHG | PAM < 70mmHG | Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose) | Dopa > 5 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradré ≤ 0,1 | Dopamine > 15 ou adr > 0,1 ou noradré > 0,1 |
| Score de Glasgow | 15 | 13-14 | 10-12 | 6-9 | <6 |
| Créatinine, mg/L (μmol/L) ou diurèse | <12 (<110) | 12-19 (110-170) | 20-34 (171-299) | 35-49 (300-440) ou <500mL/j | >50 (>440) ou <200mL/j |

VA : ventilation assistée. PAM : pression artérielle moyenne [estimée par (PAS + 2 x PAD) / 3]. Amines : dose en γ/kg/mn

Tableau 14 : Score SOFA.

Source : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF).

Quant à lui, le choc septique est défini par la présence de tous les critères suivants : sepsis, besoin de drogues vasopressives pour maintenir une PAM \geq 65 mm Hg, et lactates $>$ 2 mmol/l (18mg/dl) malgré un remplissage adéquat.

Ainsi, le stade du sepsis n'est pas seulement lié à l'état clinique et aux antécédents médicaux du patients mais aussi largement influencé par la réponse de l'hôte à l'infection [44], [45], avec, comme conséquence, une perturbation importante des niveaux de globules blancs circulants.

II.1.2. Physiopathologie des granuleux

Il faut environ 12 jours pour qu'une CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocytaire Monocytaire) produise des PNN sanguins. Ces durées peuvent être raccourcies : diminution du nombre de mitoses, diminution du temps de transit dans le compartiment mitotique, et/ou diminution du temps de transit dans le compartiment de maturation et de stockage (c'est-à-dire une libération plus rapide dans le sang).

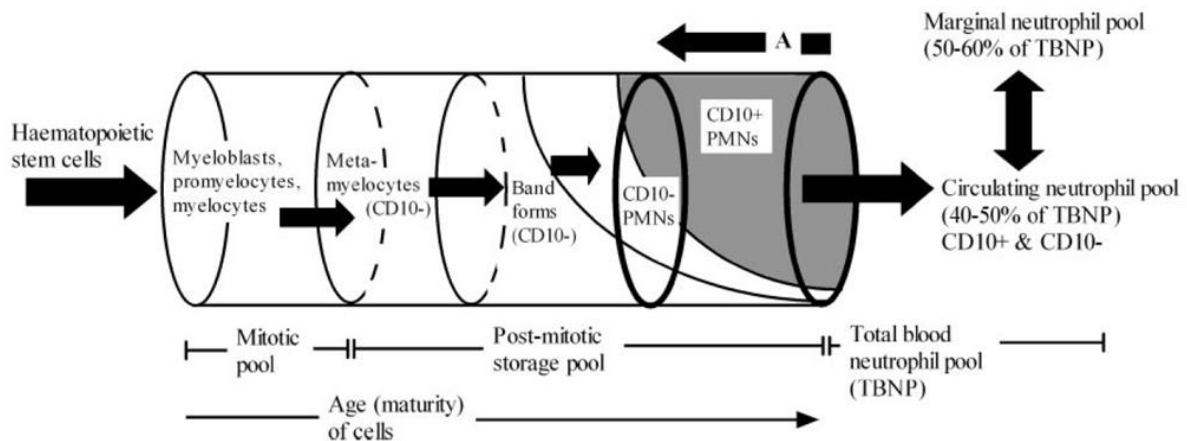


Figure 14 : Modèle en pipeline de la moelle osseuse, pour la production et le relargage de neutrophiles. Flèche A : pendant le recrutement actif des neutrophiles, ce point de libération peut remonter le pipeline avec une vitesse qui décrit l'âge de sortie des neutrophiles. PMN : polymorphonuclear neutrophils (PNN).

Source : Orr, Wilson et al. 2007 [46]

Les cellules de la réponse immunitaire innée, essentiellement les neutrophiles et monocytes, jouent un rôle majeur dans la réponse inflammatoire. Une des conséquences bien connue du sepsis est l'activation de la moelle osseuse par la sécrétion de G-CSF (granulocyte-colony-stimulating factor). Ce qui permet la production de granulocytes avec une augmentation du nombre de neutrophiles et de band cells dans le sang en moins de 2h [46] (Figure 14). Les neutrophiles peuvent aussi être recrutés à partir du pool extramédullaire marginal : PNN collés sur les parois des vaisseaux sanguins.

Ces band cells sont donc des neutrophiles n'ayant pas achevé leur maturation complète, caractérisés phénotypiquement par une expression diminuée du CD10 et CD16, et morphologiquement par la non séparation complète des lobes du noyau par un fin filament de chromatine [47]. Lorsque la moelle osseuse est stimulée par des catécholamines et des cytokines pro-inflammatoires, les band cells (et la myélémie en générale) sont libérés prématurément dans la circulation [47]. En pratique, la distinction avec des PNN matures est parfois floue, et varie d'un opérateur à l'autre.

II.1.3. Augmentation des immatures granuleux dans la phase aiguë du sepsis

II.1.3.1 Etude Septiflux 1

Tous les patients admis aux urgences ou en réanimation pour un sepsis évoluant depuis moins de 24h était éligibles. Les critères d'exclusion étaient : grossesse en cours, âge inférieur à 18 ans, tumeurs solides, infections au VIH, pathologie hématologique ou inflammatoire autre que le sepsis, médicaments immunosuppresseurs. Au total, 177 patients ont été inclus.

Pour chaque patient, une stratégie de « gating » a permis d'isoler les lignées cellulaires d'intérêt. Par exemple, la combinaison CD10/CD24/CD34/CD64/CD45 a permis de sélectionner les granulocytes qui exprimaient faiblement CD10. Et pour isoler les granuleux CD16dim, la combinaison CD14/CD45/CD16/CD11c/CD11b a été utilisée (Annexe 6).

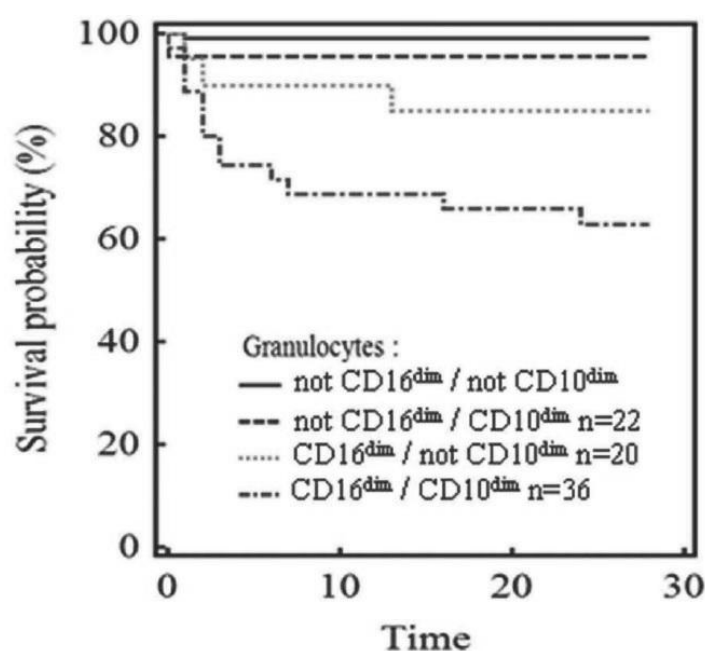


Figure 15 : Septiflux 1 : courbes de survie de Kaplan-Meier.

Pas de CD16dim / pas de CD10dim : n=99 ; référence

Pas de CD16dim / CD10dim : pas de différence significative, avec 95,5% des patients en vie à J30 (test du log rank, $p=0,23$)

CD16dim / pas de CD10 dim : survie diminuée, avec 85% des patients en vie à J30 (test du log rank, $p<0,0015$)

CD16dim / CD10dim : survie diminuée, avec 63% des patients en vie à J30 (test du log rank, $p<0,0001$)

Les seuils de 90% de CD10dim, et de 15% de CD16dim, ont permis de prédire une aggravation du sepsis à 48h avec une sensibilité de 57% et 70%, et une spécificité de 78% et 82% respectivement. Le taux de survie à J30 était de 99% pour les patients sans CD10dim ni CD16dim, 85% pour les patients avec seulement CD16dim augmentées, et 63% pour les patients avec CD16dim et CD10dim augmentées ($p<0,001$).



II.1.3.2 Etude Septiflux 2

Dans Septiflux 2, l'étude, en cours de publication, était cette fois-ci multicentrique [5]. Et nous avons aussi montré le rôle majeur de la quantification précise des immatures granuleux afin d'évaluer le risque de mortalité.

De façon prospective, entre novembre 2013 et juin 2015, tous les patients admis dans un service d'urgence ou une unité de réanimation pour un sepsis évoluant depuis moins de 24 heures étaient éligibles. Ils étaient regroupés selon leur état septique à l'admission : contrôles (c'est-à-dire individus non septiques), sepsis, sepsis sévère, et choc septique. Une Numération Formule Sanguine et une lame colorée au May-Grünwald Giemsa étaient réalisées à l'inclusion ainsi qu'une étude par cytométrie en flux en 8 couleurs (CD64/CD10/CD14/CD16/CD24/CD11b/CD3/CD45) permettant d'isoler et quantifier : les lymphocytes CD3, les granuleux CD64+, les monocytes en distinguant la proportion de pro-inflammatoires (CD16), et les granuleux immatures (expression diminuée du CD10 et du CD16).

781 patients étaient étudiés (âge : 67 ± 48 ans, SOFA : 5 ± 4). Ils étaient divisés en 3 groupes (sepsis, sepsis sévère et choc septique) à J0 et à J2. A J0, les patients septiques présentaient une augmentation du nombre de granulocytes CD64pos, de monocytes CD16pos, avec une lymphopénie CD3+. La sévérité du stade était associée avec un pourcentage plus élevé d'immatures granuleux et une lymphopénie CD3+ plus profonde. Les pourcentages d'immatures granuleux avaient tendance à être plus élevés chez les patients qui s'aggravaient à J2 ($35,1 \pm 35,6$ vs $43,5 \pm 35,2$, $p=0,07$). Un taux élevé d'immatures granuleux était aussi associé à l'apparition de nouvelles défaillances d'organes à J2.

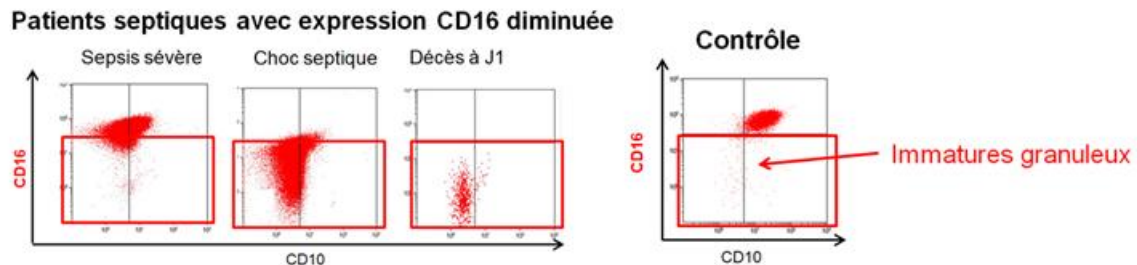


Figure 16 : Expression du CD10 et du CD16 par groupe de patients.

- Granulocytes CD16^{dim}>30%, CD3<0.26G/L, n= 105
- Granulocytes CD16^{dim}>30%, CD3>0.26G/L, n= 237
- Granulocytes CD16^{dim}<30%, CD3<0.26G/L, n= 63
- Granulocytes CD16^{dim}<30%, CD3>0.26G/L, n= 363

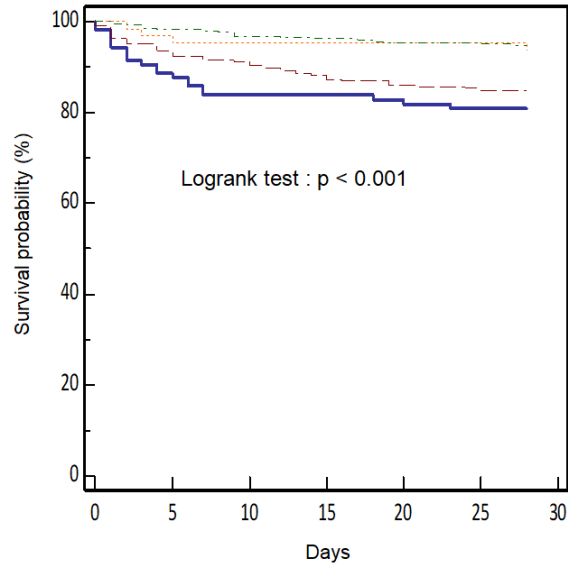


Figure 17 : Septiflux 2 : courbes de survie de Kaplan-Meier.

CD16^{dim}<30% : 95% de survie à J28, avec ou sans lymphopénie CD3+.

La survie est significativement diminuée en présence d'IG CD16^{dim}, et la présence de lymphopénie CD3+ profonde détériore ce pronostic avec un taux de survie environ égal à 80% à J28.

Ces études ont donc permis de conclure sur l'augmentation des immatures granuleux dans la phase aiguë du sepsis précédant l'aggravation de l'état clinique du patient (défaillance d'organe, décès), et souvent associée à une lymphopénie T.

II.1.4. Limites en routine et objectifs

La CMF est actuellement la méthode de référence pour caractériser l'immunophénotypage d'un leucocyte. Et des progrès considérables ont été réalisés dans l'harmonisation de la CMF et dans les EEQ, permettant des comparaisons inter laboratoires [48], [49]. En journée, cette méthode peut maintenant rendre des résultats fiables rapidement. En effet, la CMF en routine est utilisée pour identifier et quantifier des cellules hématopoïétiques, car plus précis, plus rapide et plus reproductible que la cytologie conventionnelle [4]. Cependant, dans la majorité des cas, elle nécessite la présence d'un technicien qualifié sur place pour en interpréter les résultats.

C'est pourquoi nous avons comparé la quantification des immatures granuleux par un microscope motorisé (CellaVision® DM1200), avec la CMF. Le DM dispose d'un logiciel permettant une classification automatisée : technique pouvant être plus facilement mise en place en urgence. En effet, l'automate est une méthode utilisable 24/24h, pour rendre un taux de myélémie en s'affranchissant de la variabilité inter-opérateur.

L'objectif était donc d'évaluer le DM dans sa pré-classification en myélémie pour estimer le pronostic de patients septiques.



II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Passage des lames

Nous avons utilisé les lames colorées des 177 patients/contrôles de Limoges inclus dans l'étude Septiflux 2 (Figure 18). Pour certains patients (env 4-5), les lames n'ont pas été retrouvées (peut-être non faites à l'époque). Après avoir effectué le test de localisation cellulaire du jour (cf généralités du fonctionnement du DM), elles ont toutes été passées dans l'automate en août 2017.

Pour certaines, le microscope automatisé n'a pas été capable de rendre un résultat de pré-classification. Lors de la réalisation des frottis sanguins de Septiflux 2, ces derniers n'étaient pas préparés conformément aux spécifications de Cellavision® (Annexe 5). Il était donc attendu que certains frottis soient illisibles par le DM (env. 18). Les raisons des échecs ont été : la longueur trop courte de ces derniers, leur largeur insuffisante, ou des frottis pas assez fins avec donc une zone de monocouche cellulaire trop petite.

Au total, c'est 154 frottis qui ont pu être pré-classifiés par le microscope automatique selon le contexte : 15 contrôles, 82 sepsis, 29 sepsis sévères, et 28 chocs septiques.

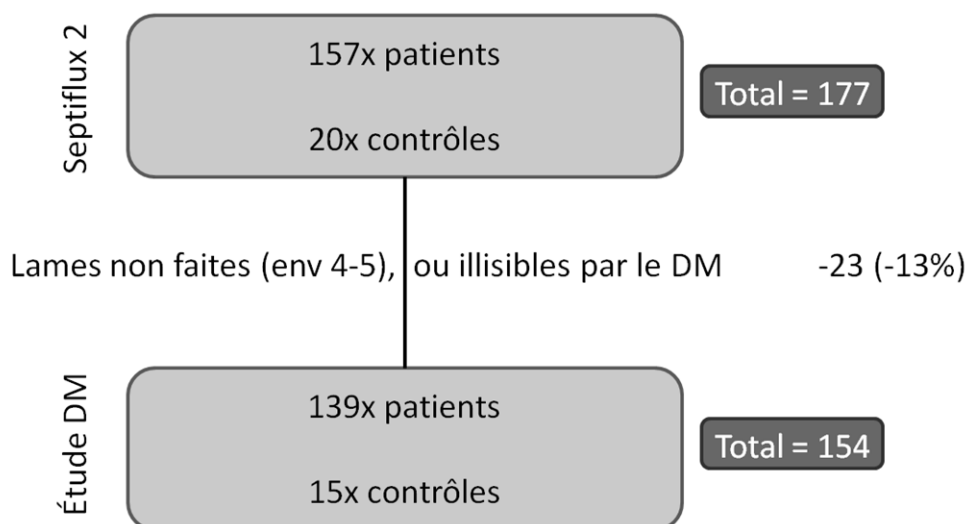


Figure 18 : Lames incluses dans l'étude.

II.2.2. Reclassement et validation des formules sanguines

Les données brutes de pré-classification des granuleux du DM1200 ont été conservées sans intervention d'aucun opérateur. Les monocytes, lymphocytes, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles ont été reclassés si nécessaire par deux cytologistes en simultané. Les neutrophiles non classés n'ont pas été inclus ainsi que les neutrophiles classés par erreur dans une autre catégorie (appelés « mal classés »).

| Classement du DM | Correction |
|-----------------------------------|-----------------|
| Lymphocyte dans « PNN » | Lymphocytes |
| Granuleux dans « Non identifiés » | G. non classés |
| Granuleux dans « Lymphocytes » | G. mal classés |
| Granuleux dans « PNN » | <i>inchangé</i> |
| Granuleux dans « Bandcells » | <i>inchangé</i> |
| Granuleux dans « Métamyélocytes » | <i>inchangé</i> |

Tableau 15 : Exemples de reclassement (G. : Granuleux).

Grâce à cette méthode, c'est le DM qui définissait le stade du granuleux selon son immaturité, sans intervention du cytologiste.

Les stades considérés comme myélémie dans cette étude étaient (dans l'ordre croissant d'immaturité) :

- les bandcells
- les métamyélocytes
- les myélocytes
- les promyélocytes
- les blastes (très rares).

L'extraction des résultats a été permise par l'outil database Query du logiciel de Cellavision®. Et les données ont été retraitées avec MedCalc et Microsoft Office Excel 2007.



II.3. Résultats

II.3.1. Exemples de photos prises par le DM1200

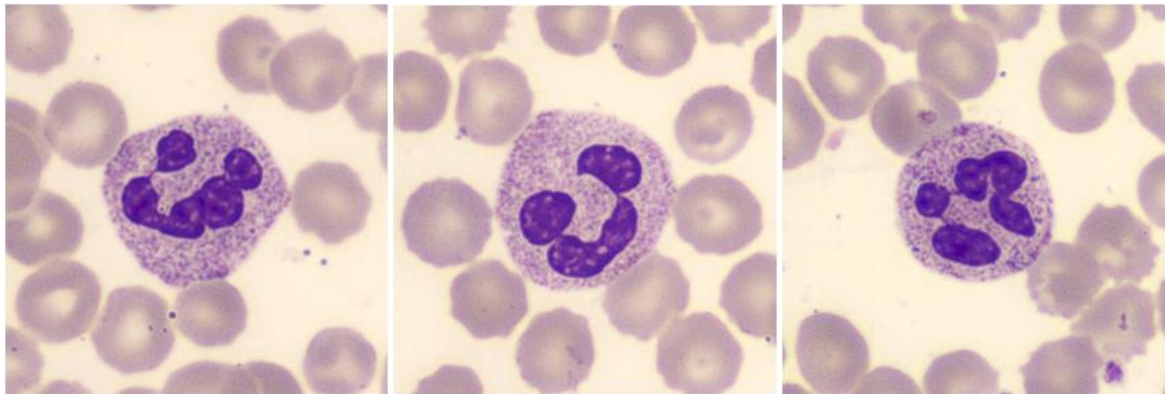
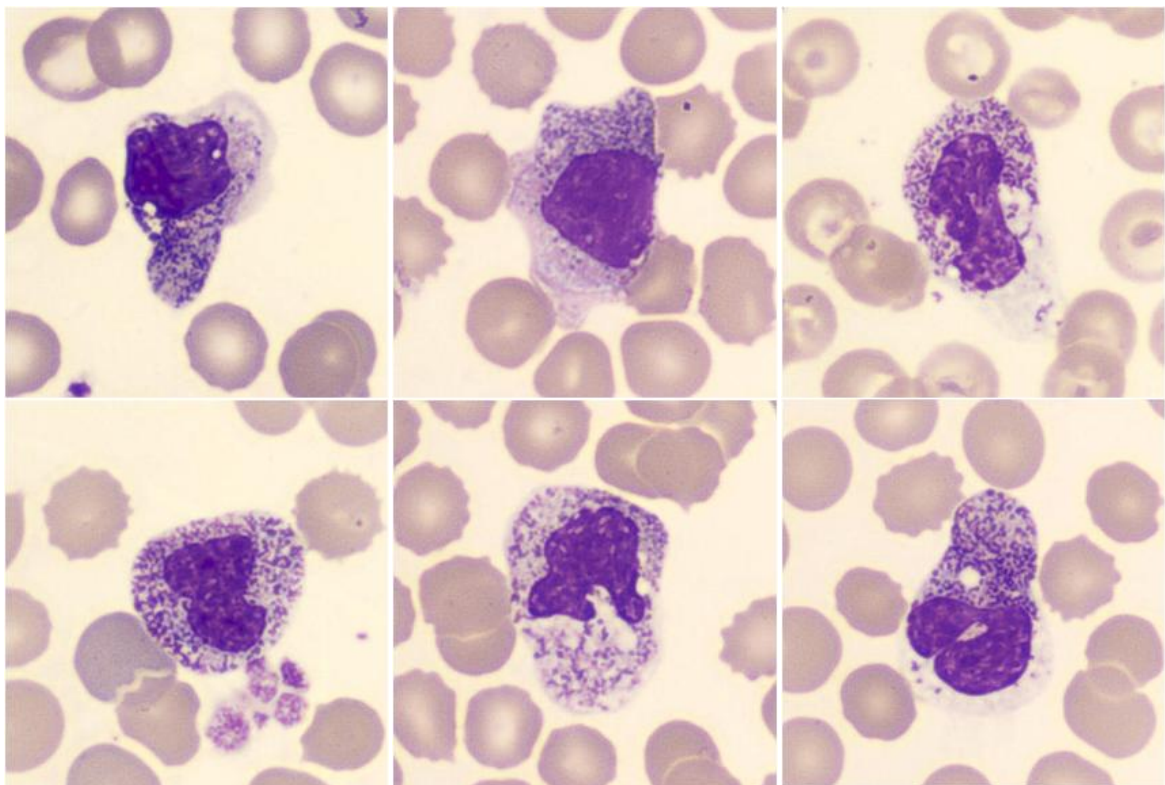


Figure 19 : PNN contrôles.

Ces photos proviennent des frottis sanguins des individus non septiques (groupe de 15 contrôles).



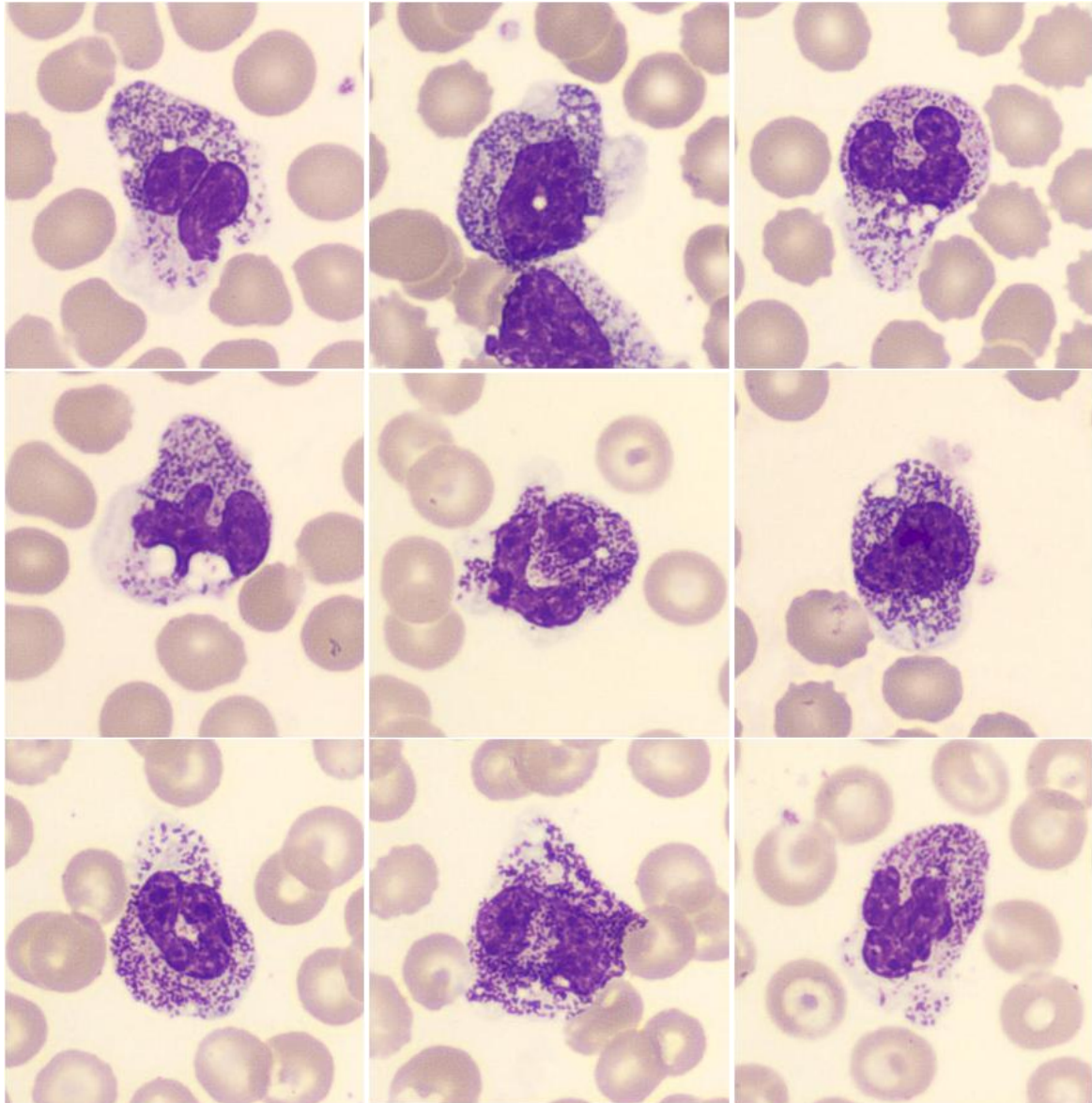


Figure 20 : Souffrance des granuleux
Ces photos proviennent des frottis sanguins de patients en choc septique.

II.3.2. Proportions de granuleux mal/non classés

Les moyennes des pourcentages de granuleux mal et non classés, pour chaque groupe, sont résumées dans le tableau suivant.

| Groupes | Nombre de patients | Moyenne des % de granuleux mal et non classés | Écart type | % de patients avec granuleux mal et non classés $\geq 2\%$ |
|----------------------|--------------------|---|------------|--|
| Contrôle | 15 | 0,9 | 2 | 6,7 |
| Sepsis | 82 | 5,4 | 8,7 | 52,4 |
| Sepsis sévère | 29 | 12,1 | 15,2 | 69 |
| Choc septique | 28 | 12,8 | 12 | 92,9 |

Tableau 16 : Moyennes des granuleux mal/non classés par groupe.



En moyenne, il y a plus de granuleux mal et non classés pour les sepsis sévères et les chocs septiques. Cependant, les écarts types pour chaque groupe sont relativement importants. Ils démontrent d'une grande dispersion des pourcentages autour de chaque moyenne. Ainsi, on peut trouver des frottis de sepsis avec des pourcentages élevés de granuleux mal et non classés, ou encore des frottis de choc septique avec des pourcentages faibles de granuleux mal et non classés.

Cette dispersion est également objectivée par la représentation en boxplot (Figure 21). Les boîtes sont larges et les extrémités des « moustaches » sont éloignées, avec souvent quelques valeurs extrêmes en dehors des moustaches.

Nous pouvons aussi observer que plus le sepsis est sévère, plus le DM est en difficulté pour classer les granuleux (dernière colonne du Tableau 16).

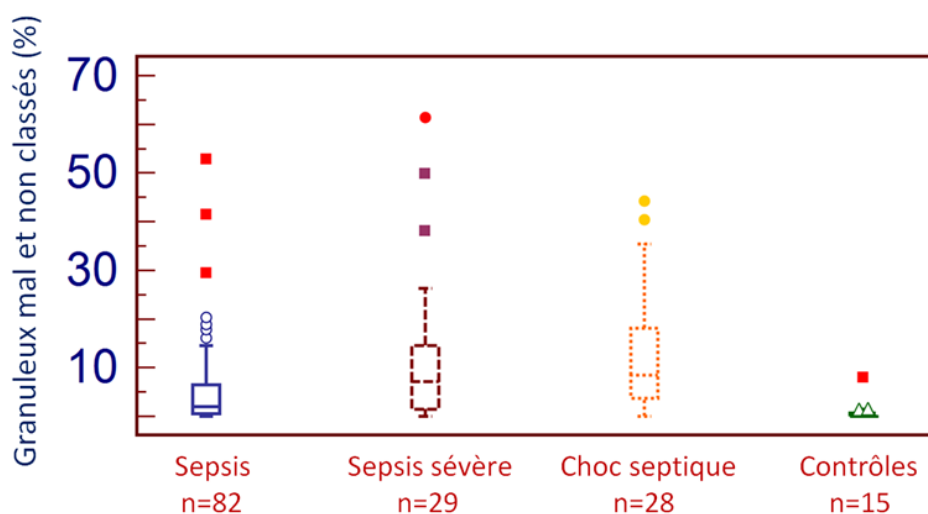


Figure 21 : Pourcentages de granuleux mal/non classés par groupe.

Nous ne trouvons pas de corrélation du pourcentage de granuleux mal/non classés avec le pourcentage de myélémie (Figure 22).

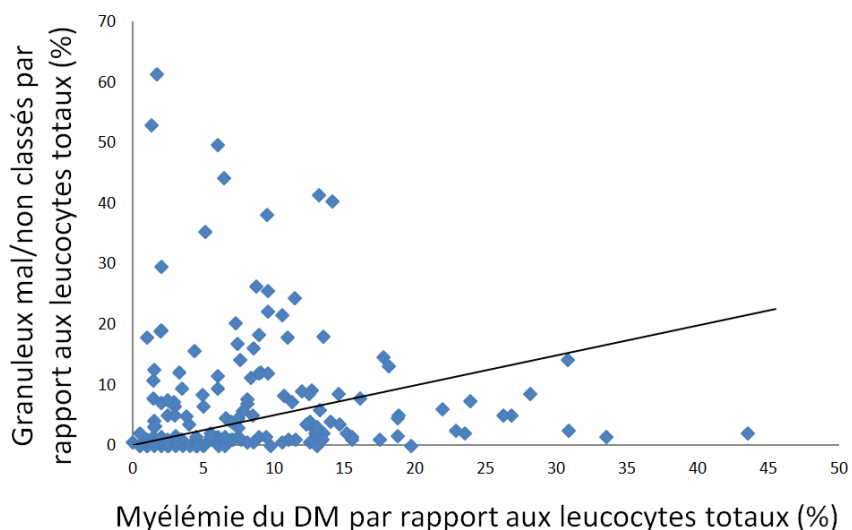


Figure 22 : Granuleux mal/non classés en fonction de la myélémie.



II.3.3. Proportions de myélémies

Les moyennes des pourcentages de myélémie, pour chaque groupe, sont résumées dans le tableau suivant.

| Groupes | Nombre de patients | Moyenne des % de myélémie | Écart type |
|---------------|--------------------|---------------------------|------------|
| Contrôle | 15 | 3,2 | 2,3 |
| Sepsis | 82 | 9,2 | 7,1 |
| Sepsis sévère | 29 | 14,8 | 8,4 |
| Choc septique | 28 | 20,4 | 11,8 |

Tableau 17 : Moyennes de myélémie par groupe.

Comme attendu, nous remarquons qu'en moyenne, plus l'état du patient se dégrade, plus le pourcentage de myélémie est important. Néanmoins les écarts types sont aussi assez élevés. Ce qui signifie que la dispersion des valeurs de myélémie autour de la moyenne n'est pas négligeable. Ainsi, on peut trouver des frottis de sepsis avec des pourcentages élevés de myélémie, ou encore des frottis de choc septique avec des pourcentages faibles de myélémie.

De la même manière que pour les pourcentages de granuleux mal et non classés, la représentation en boxplot des myélémies met en exergue cette dispersion des données (Figure 23).

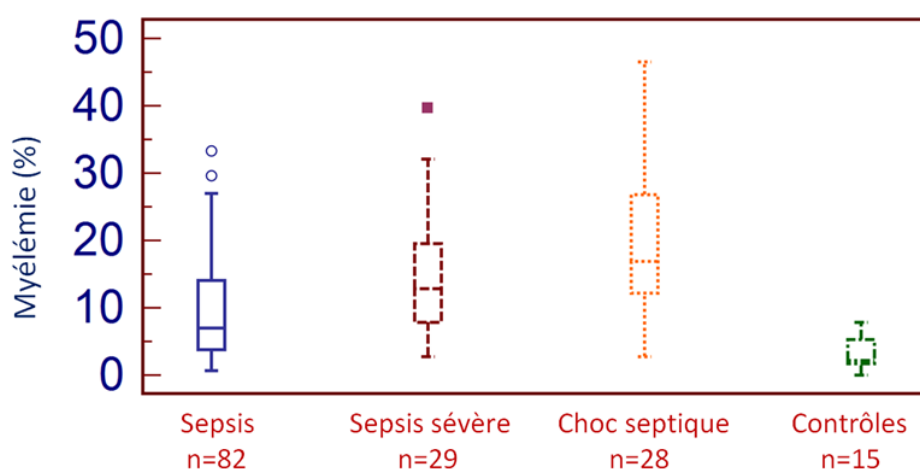


Figure 23 : Pourcentages de myélémie par groupe.

II.3.4. Myélémie en fonction de l'évolution des patients

Nous avons également comparé la myélémie avec l'évolution des patients de J0 à J2, en les divisant en deux groupes : dégradation (ex passage de sepsis à sepsis sévère), ou stabilité/amélioration.



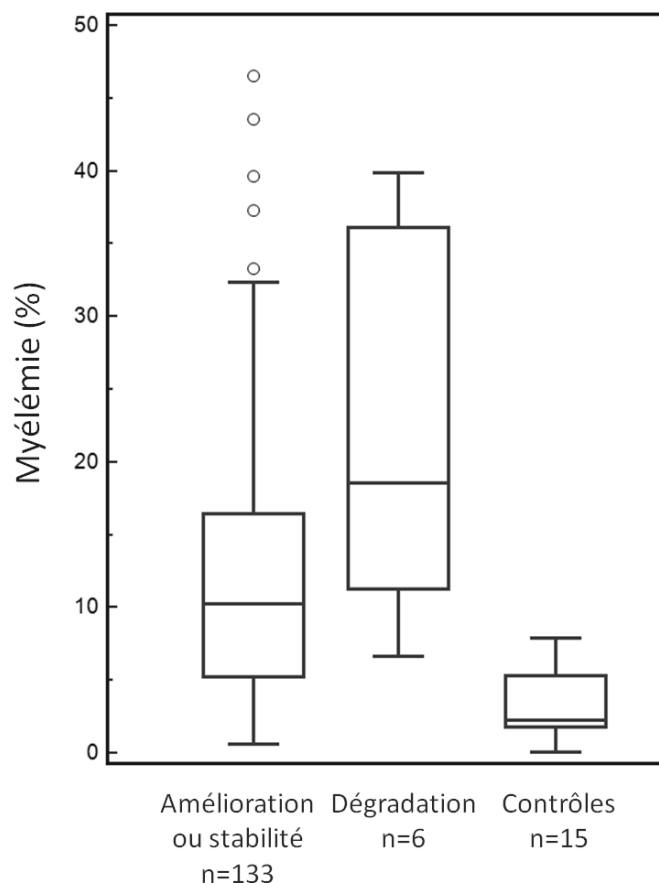


Figure 24 : Pourcentages de myélémie par rapport à l'évolution clinique à J2, chez les 139 patients septiques.

Pour les patients en stabilité/amélioration, beaucoup présentent encore des valeurs extrêmes élevées (voir Annexe 7 pour l'interprétation des box plot). Pour les patients septiques, on observe, pour la plupart, des pourcentages supérieurs à 10% de myélémie par rapport aux granuleux neutrophiles.

En résumé, les valeurs de myélémie rendues par le DM semblent assez spécifiques, avec néanmoins une probable valeur prédictive positive relativement basse, due au petit nombre de patients se dégradant à J2.

II.3.5. Corrélation des IG rendus par le DM avec les résultats de CD10dim/CD16dim en CMF

Dans un modèle de régression linéaire passant par zéro, le coefficient de corrélation des IG rendu par le DM, en fonction de la proportion de granuleux CD10^{dim} et CD16^{dim} est très bas à respectivement 0,52 et 0,25 (Figure 25 et Figure 26).

D'autres modèles de courbes de tendance non linéaires ont été testés (logarithmiques, polynomiales), les résultats étaient comparables, et prévisibles au vu de la distribution éparse des points (Figure 25 et Figure 26).

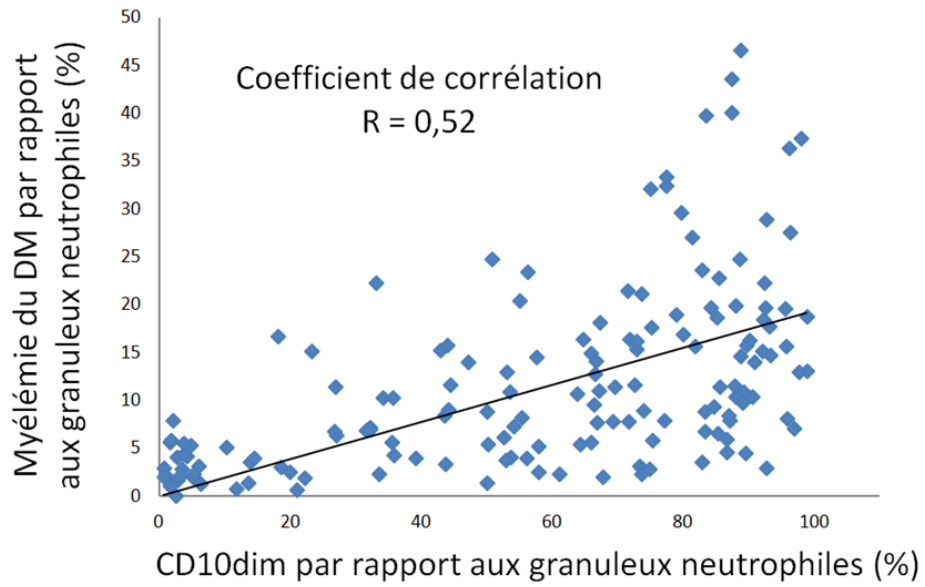


Figure 25 : Myélémie du DM par rapport au CD10dim.

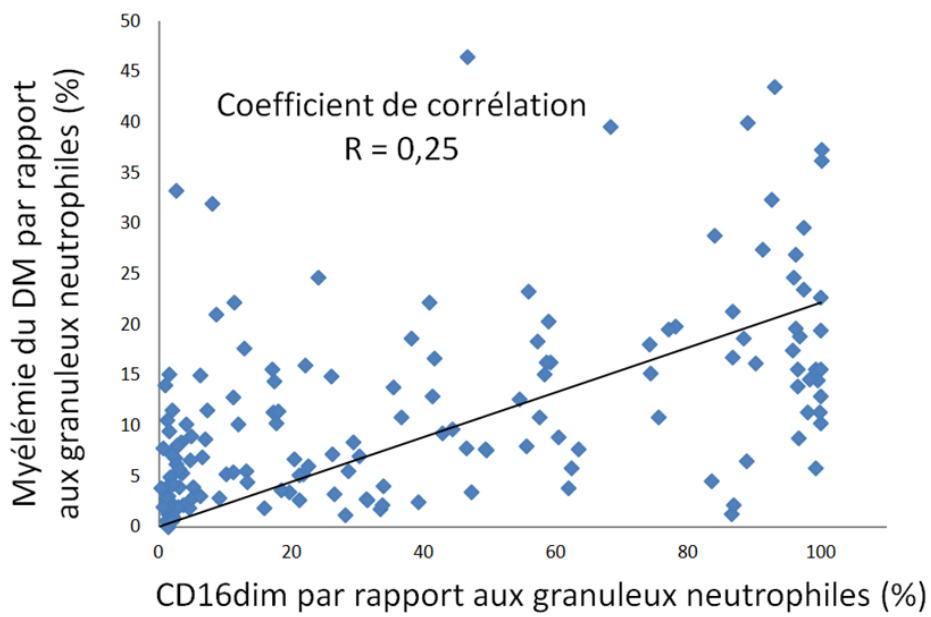


Figure 26 : Myélémie du DM par rapport au CD16dim.



II.4. Discussion

II.4.1. Corrélation myélémie et CD10dim/CD16dim

La force de liaison qui existe entre les deux variables myélémie et CD10dim/CD16dim est faible. On ne peut donc pas conclure sur la corrélation de la myélémie rendue par le DM avec le taux de CD10dim/CD16dim en CMF.

Ces résultats rejoignent les études déjà réalisées, montrant la difficulté de séparer les band cells des polynucléaires neutrophiles matures [5], [44], [45]. La microscopie, automatisée ou non, semble donc à ce jour difficilement reproductible.

II.4.2. Granuleux mal et non classés

Pour améliorer les performances du DM, et permettre de diminuer le nombre de granuleux mal et non classés, l'étude des critères utilisés par le logiciel de classification serait souhaitable. Quels sont les facteurs qui influent sur son choix vers tel ou tel stade de maturation etc. Bien sûr, en pratique, le constructeur ne peut pas donner accès à ces données pour des raisons de secret de fabrication.

Néanmoins, l'entreprise Siemens, qui distribue l'automate DM1200 fabriqué par Cellavision, est prêt à approfondir le travail sur l'identification des immatures granuleux. C'est pourquoi des frottis sanguins anonymisés de patients septiques leur seront confiés dans une prochaine étude. Le but est de corriger les difficultés persistantes du DM à identifier la myélémie sanguine.

II.4.3. Anomalies morphologiques

Nous avons cependant pu voir qu'avec un taux élevé de granuleux mal et non classés, le DM permet de nous alerter sur l'aspect pathologique des frottis sanguins des patients atteints de sepsis. En effet, il objective de manière évidente la souffrance des granuleux par ses photos prises (Figure 20, p. 102) :

- hypo/hyper- granulation,
- vacuoles,
- anomalies de segmentation,
- déformation des cellules.

II.4.4. Automate de CMF utilisable 24/7 : Aquios

Prochainement, le service d'hématologie biologique du CHU de Limoges, souhaiterait acquérir un nouvel automate de CMF : Aquios CL de Beckman Coulter (Figure 27).





Figure 27 : Automate de CMF Aquios CL de Beckman Coulter ; réactifs suivis par codes barres 2D situés en dessous des flacons de mix

Source : <https://www.beckman.com/coulter-flow-cytometers/aquios-cl>

Ce dernier permet un fonctionnement 24/7 et qui est simple d'utilisation :

- par l'utilisation de pré-mix d'anticorps liquides à code-barres (Figure 27), prêts à l'emploi ; permettant le suivi des numéros de lots, des dates d'expiration des flacons ouverts et fermés, et du nombre de tests restants ;
- sans pipetage manuel des tubes primaires qui restent fermés, et avec une distribution et mélange automatiques des réactifs utilisés ;
- auto-gating, possible par fenêtrage configurable en amont ;
- un encombrement relativement diminué pour une utilisation sur un plateau technique d'urgence.

Il permettra, entre autres, la mesure des immatures granuleux 24/7 par des opérateurs moins expérimentés en CMF.

II.4.5. Automatisation de la biologie médicale

Nous l'avons vu avec le DM1200 et l'Aquios CL, ces nouvelles technologies « load-and-go » s'inscrivent dans un contexte où la productivité est optimisée à son maximum pour des raisons économiques.

Ainsi, quel que soit la discipline, l'automatisation des tâches est recherchée [50], pour allouer les opérateurs qualifiés là où on a le plus besoin. Une fois mis en place et paramétrés, ces systèmes éliminent et simplifient les tâches manuelles (ex débouchage, pipetage), permettant entre autres la réduction de l'exposition à des substances potentiellement dangereuses comme le sang. Cette simplification globale permet la polyvalence du personnel opérant, mais rappelle également la nécessité d'une minorité experte, et référente sur place pour chaque automate.

II.4.6. Matériel connecté et partage

L'informatisation des résultats biologiques a permis à la biologie médicale de bénéficier de nombreux avantages non négligeables déjà largement utilisés en pratique courante :

- archivages des résultats,
- traçabilité des contrôles de qualité,
- extraction des données pour la recherche,
- partage de cas cliniques dans un objectif didactique, ou pour concertation pluridisciplinaire,
- contrôle à distance : en délocalisé.

Dès le début de l'utilisation du DM1200, nous avons pu en jouir intuitivement :

- stockage systématique des images prises par le DM, sur les serveurs sécurisés du CHU de Limoges,
- conservation de photos de référence pour l'illustration de maladies rares dans la formation du personnel,
- diffusion par mail d'images automatiquement anonymisées prises par le DM, pour discussion,
- extraction des résultats de myélogramme pour les lames des patients de l'étude Septiflux 2.

Alors que l'hématocytologie semble a priori une science très manuelle, elle sait profiter de tous ces atouts accessoires, maintenant devenus obligatoires pour tout matériel connecté.

Ces avancées ne doivent néanmoins pas nous faire oublier notre rôle commun dans la protection des données de santé. La Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) a récemment rappelé aux établissements de santé la nécessité de se conformer au règlement européen sur la protection des données personnelles (RGPD) qui entre en application en mai 2018 [51].



II.4.7. Sepsis : autres moyens d'évaluation pronostique

Avec l'arrivée en 2016 de la nouvelle définition du sepsis, la SPILF a proposé des critères simplifiés, utilisables hors réanimation, permettant déjà d'identifier les patients à risque : **les critères quick SOFA (qSOFA)** :

- Pression artérielle systolique ≤ 100 mm Hg
- Fréquence respiratoire ≥ 22 /min
- Confusion

La présence d'au moins 2 critères quick SOFA identifie des patients risquant d'avoir un mauvais pronostic et justifiant d'un monitoring accru, et/ou d'un traitement spécifique et/ou de prendre un avis en réanimation.

Le quick SOFA est immédiatement accessible et très intuitif, notamment pour des professionnels de santé en cabinet sans accès direct et immédiat à la biologie. Mais à l'échelon individuel, ce score a aussi ses limites : il doit être tempéré par l'état basal du patient. En effet en milieu hospitalier, la tension artérielle habituelle des patients est souvent élevée, et il existe encore de nombreuses causes de confusion préexistante.



Conclusion

La cytométrie de flux reste la méthode de référence pour quantifier précisément les immatures granuleux pour une évaluation du risque de mortalité chez les patients septiques. Cependant, le DM a correctement joué son rôle de sentinelle en identifiant les frottis difficiles. D'autre part, la quantification des immatures granuleux par le DM a révélé des anomalies morphologiques majeures dans le sepsis, d'autant plus que celui-ci est grave.

A l'image de ses débuts prometteurs, il ne fait alors aucun doute que le DM saura bientôt s'imposer comme innovation par l'automatisation de la cytologie.

L'objectif des prochaines études sera de quantifier les immatures granuleux par cytométrie en flux 24/7.





Références bibliographiques

- [1] « Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale | Legifrance ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=id> [nov. 27, 2017].
- [2] AFNOR, *Norme NF EN ISO 15189-Laboratoires de biologie médicale-Exigences concernant la qualité et la compétence*, 2012.
- [3] « LOI n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale | Legifrance ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027478077> [nov. 27, 2017].
- [4] E. Guérin, M. Orabona, M. A. Raquil et al., « Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration », *Crit. Care Med.*, vol. 42, no 9, p. 2007-2018, sept. 2014.
- [5] T. Daix et al., « Circulating immature granulocytes and T-cell lymphopenia predict clinical worsening of septic patients », (en cours de publication).
- [6] AFNOR, « NF EN ISO 9000- Systèmes de management de la qualité-Principes essentiels et vocabulaire », oct. 2015.
- [7] Cofrac, « SH GTA 01-Guide technique d'accréditation en biologie médicale (révision 01) », avr. 2015. Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63
- [8] Cofrac, « SH REF 02-Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 (révision 05) », juin 2016. Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=60
- [9] Cofrac, « SH REF 08-Expression et évaluation des portées d'accréditation (révision 05) », mars 2017. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=60
- [10] Cofrac, « SH INF 50-Portées types d'accréditation (révision 04) », mars 2017. Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=62
- [11] Cofrac, « SH GTA 04-Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (révision 01) », avr. 2015. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63
- [12] Cofrac, « SH GTA 06-Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale (révision 00) », juin 2012. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63
- [13] Cofrac, « SH GTA 14-Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale (révision 00) », sept. 2011. Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63
- [14] « Vocabulaire international de métrologie-Concepts fondamentaux et généraux et termes associés », JCGM 200, 2012. Disponible sur: <http://www.bipm.org/fr/publications/guides/vim.html>



- [15]Cofrac, « SH FORM 43-FICHE QUANTITATIF-Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale (révision 00) », avr. 2015. Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=64
- [16]A. Vassault, D. Grafmeyer, J. De Graeve et al., « Spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques », *Annales de Biologie Clinique*, vol. 57, no 6, p. 685-695, 1999.
- [17]C. Ricos, V. Alvarez, F. Cava, J. V. Garcia-Lario, A. Hernandez, C. V. Jimenez, J. Minchinela, C. Perich, M. Simon, « Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation », *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 59, p. 491-500, 1999.
- [18]M. Dumontet, « Mise en œuvre, utilisation et exploitation du contrôle de qualité afin d'assurer la validation analytique, la maîtrise métrologique des instruments d'analyses et la détermination de l'incertitude de mesure », *Spectra Biologie*, vol. 157, p. 27-36, 2007.
- [19]Cofrac, « LAB INF 19-Liste des organisateurs de comparaison interlaboratoires (révision 03) », nov. 2016. Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=62
- [20]P. W. Barnes, S. L. McFadden, S. J. Machin, E. Simson, international consensus group for hematology, « The international consensus group for hematology review : suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis », *Lab Hematol*, vol. 11, no 2, p. 83-90, 2005.
- [21]P. S. Simpkin, R. F. Hinchliffe, R. J. Arceci, « Reference Values (chapitre 37) » dans *Pediatric hematology*, Ed. Blackwell, 3e éd., 2006.
- [22]X. Troussard, S. Vol, E. Cornet et al., « Full blood count normal reference values for adults in France », *J Clin Pathol*, oct. 2013.
- [23]I. Arnoux, M. Loosveld, « Accréditation d'un laboratoire d'Hématologie Cytologie », *Feuillets de biologie*, p. 49-59, 2012.
- [24]F. Trimoreau, N. Gachard, V. Leymarie et al., « Étapes préanalytiques pour la numération et cytologie sanguine », *Biologie Clinique*, 2011.
- [25]Cellavision®, « DM1200 Manuel d'utilisation v5.0 français ».
- [26]M. Imbert, M. El Khouri, « La coloration de May-Grünwald-Giemsa », *Biologie clinique*, 2006.
- [27]J. Burthem *et al.*, « The use of digital 'virtual slides' in the quality assessment of haematological morphology: results of a pilot exercise involving UK NEQAS(H) participants », *British Journal of Haematology*, vol. 130, n° 2, p. 293-296, 2005.
- [28]J. P. Quenot, A. Pavon, I. Fournel et al., « Le choc septique de l'adulte en France : vingt ans de données épidémiologiques », *Réanimation*, vol. 24, p. 303, 2015.
- [29]G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, et al., « The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 », *N Engl J Med*, vol. 348, p. 1546-1554, 2003.
- [30]D. C. Angus, R. S. Wax, « Epidemiology of sepsis: An update », *Crit Care Med*, 2001.



- [31] V. Y. Dombrovskiy, A. A. Martin, J. Sunderram et al., « Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003 », *Crit Care Med*, vol. 35, p. 1244–1250, 2007.
- [32] R. P. Dellinger, M. M. Levy, J. M. Carlet et al., « Surviving Sepsis Campaign : International guidelines for management of severe sepsis and septic shock », *Intensive Care Med*, vol. 34, p. 17–60, 2008.
- [33] D. F. Gaieski, M. E. Mikkelsen, R. A. Band et al., « Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department », *Crit Care Med*, vol. 38, p. 1045-1053, 2010.
- [34] M. Kennedy, N. Joyce, M. D. Howell, J. Lawrence Mottley, N. I. Shapiro, « Identifying infected emergency department patients admitted to the hospital ward at risk of clinical deterioration and intensive care unit transfer », *Acad Emerg Med*, vol. 17, p. 1080-1085, 2010.
- [35] J. L. Vincent, Y. Sakr, C. L. Sprung et al., « Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units : results of the SOAP study », *Crit Care Med*, vol. 34, p. 344-353, 2006.
- [36] C. Brun-Buisson, P. Meshaka, P. Pinton, B. Vallet, « EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS : a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe Sepsis in French intensive care units », *Intensive Care Med*, vol. 30, p. 580-588, 2004.
- [37] R. Carpio, J. Zapata, E. Spanuth, G. Hess, « Utility of presepsin (sCD14-ST) as a diagnostic and prognostic marker of sepsis in the emergency department », *Clin Chim Acta*, vol. 450, p. 169-175, 2015.
- [38] D. Y. Hong, J. W. Kim, J. H. Paik et al., « Value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in predicting the mortality of patients with sepsis at the emergency department », *Clin Chim Acta*, vol. 452, p. 177-181, 2016.
- [39] S. Franchini, T. Marciànò, C. Sorlini et al., « Serum CXCL12 levels on hospital admission predict mortality in patients with severe sepsis/septic shock », *Am J Emerg Med*, vol. 33, 2015, p. 1802-1804.
- [40] G. J. Zhao, D. Li, Q. Zhao et al., « Prognostic value of plasma tight-junction proteins for sepsis in emergency department: an observational study », *Shock*, vol. 45, p. 326-332, 2016.
- [41] J. S. Lundberg, T. M. Perl, T. Wiblin et al., « Septic shock: an analysis of outcomes for patients with onset on hospital wards versus intensive care units », *Crit Care Med*, vol. 26, 1998, p. 1020-1024.
- [42] J. C. Knott, S. L. Tan, A. C. Street, M. Bailey, P. Cameron, « Febrile adults presenting to the emergency department: outcomes and markers of serious illness », *Emerg Med J*, vol. 21, p. 170-174, 2004.
- [43] R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald, The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee, « Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis », *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*, 1992.



- [44] E. E. Davenport, K. L. Burnham, J. Radhakrishnan, P. Humburg, P. Hutton, T. C. Mills, « Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study », *Lancet Respir Med*, vol. 4, 2016, p. 259-271.
- [45] M. Emonts, F. C. Sweep, N. Grebenchtchikov et al., « Association between high levels of blood macrophage migration inhibitory factor, inappropriate adrenal response, and early death in patients with severe sepsis », *Clin Infect Dis*, vol. 44, p. 1321-1328, 2007.
- [46] Y. Orr, D. P. Wilson, J. Taylor, P. Bannon, C. Geczy, M. Davenport, L. Kritharides, « A kinetic model of bone marrow neutrophil production that characterizes late phenotypic maturation », *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 292, p. R1707-1716, 2006.
- [47] P. J. Cornbleet, « Clinical utility of the band count », *Clin Lab Med*, vol. 22, p. 101-136, 2002.
- [48] F. Solly, L. Rigollet, L. Baseggio et al., « Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study », *Cytometry A*, vol. 83, p. 1066-1072, 2013.
- [49] F. Lacombe, E. Bernal, D. Bloxham et al., « Harmonemia: a universal strategy for flow cytometry immunophenotyping-A European LeukemiaNet WP10 study », *Leukemia*, vol. 30, p. 1769-1772, 2016.
- [50] C. B. Frey, M. Osborne, « The Future of Employment: How Susceptible Are Jobs to Computerisation? », *Oxford University Programme on the Impacts of Future Technology*, sept. 2013.
- [51] CNIL, « Établissements de santé : préparez-vous au règlement européen sur la protection des données personnelles (RGPD) ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.cnil.fr/sites/default/files/atoms/files/rgpd_-_etablissements_de_sante.pdf [fév. 2018].



Annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe 1. Feuille de suivi de la coloration de MGG standardisée..... | 119 |
| Annexe 2. Analyse de risques de la formule sanguine automatisée..... | 120 |
| Annexe 3. Etablissement des limites d'acceptabilité de la répétabilité pour les formules sanguines : graphique représentant la droite d'équation : $fx = 1x * 100$ | 125 |
| Annexe 4. Table de Rümke et table de Rümke extrapolée | 126 |
| Annexe 4.1. Table de Rümke | 126 |
| Annexe 4.2. Table de Rümke extrapolée, adaptée à tous les pourcentages cellulaires | 126 |
| Annexe 5. Exemples de frottis pour le DM | 127 |
| Annexe 5.1. Acceptés | 127 |
| Annexe 5.2. Non acceptés | 127 |
| Annexe 6. Stratégie du gating utilisée dans l'étude Septiflux 1 : lignées cellulaires déduites présumées..... | 128 |
| Annexe 7. Interprétation des box plots (ou boîtes à moustache) avec MedCalc..... | 129 |
| Annexe 8. Poster tel que présenté lors du congrès de l'AFC (association française de cytométrie) tenu à Reims du 7 au 9 novembre 2017 | 130 |





Annexe 1. Feuille de suivi de la coloration de MGG standardisée

| Technicien (initiales) | N° lot Giemsa | N° lot May- Grünwald | pH de l'eau tamponnée (entre 6-8) | Date | Heure | Validation de la coloration (initiales) |
|---------------------------|------------------|-------------------------|--|------|-------|--|
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |



Annexe 2. Analyse de risques de la formule sanguine automatisée

| MAITRISE DES RISQUES | | | | | | |
|--|------------------------|---|-----------------------|----------|---|---|
| (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé) | | | | | | |
| Phase | 5M | Points critiques | Echelle de criticité | | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai,...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement,...) avec les références du SMQ du Laboratoire |
| Préanalytique | Matière (échantillons) | Prescription incluant notamment : - identification univoque du patient - identification du prescripteur - nature des examens prescrits | D=2 ; G=3 ; O=4 | Critique | Information des prescripteurs Information des préleveurs Contrôle à réception | PBH INST 0022 - Charte d'identification du patient ou du résident au CHU de Limoges (PE QRU GRV 001) PBH INST 0024 - Vérification de l'identité du patient à toutes les étapes de sa prise en charge (P QRU GRV 005) PBH ORG 0027 - Convention relative à la réalisation des examens de biologie médicale entre le Laboratoire et les services de soins du CHU de Limoges PBH ORG 0032 - Convention relative à la réalisation d'examens de biologie médicale par le CHU de Limoges PBH PREA 0005 - Manuel de prélèvement Catalogue général des examens de Laboratoire accessibles sur Intranet du CHU et sur Internet RCL PREA 0001 - Réception, tri et vérification de la conformité des échantillons biologiques LHEM PREA 0009 - Critères d'acceptation ou de rejet des échantillons primaires et conduite à tenir Déploiement de la prescription connectée des examens de biologie médicale RCL PREA 00028 - Prescription connectée : Acquiescement manuel des demandes |
| Préanalytique | Matière (échantillons) | Prélèvement des échantillons primaires et notamment : - identification du patient - préparation du patient - nature, site anatomique d'origine et volume d'échantillons à prélever - type de contenants - date (et heure, le cas échéant) de prélèvement | D=2 ; G=3 ; O=4 | Critique | Information des préleveurs Contrôle à réception | PBH INST 0022 - Charte d'identification du patient ou du résident au CHU de Limoges (PE QRU GRV 001) PBH INST 0024 - Vérification de l'identité du patient à toutes les étapes de sa prise en charge (P QRU GRV 005) PBH ORG 0027 - Convention relative à la réalisation des examens de biologie médicale entre le Laboratoire et les services de soins du CHU de Limoges PBH ORG 0032 - Convention relative à la réalisation d'examens de biologie médicale par le CHU de Limoges PBH PREA 0032 - Conditionnement et acheminement des échantillons primaires au laboratoire PBH PREA 0005 - Manuel de prélèvement Catalogue général des examens de Laboratoire accessibles sur Intranet du CHU et sur Internet RCL PREA 0001 - Réception, tri et vérification de la conformité des échantillons biologiques LHEM PREA 0009 - Critères d'acceptation ou de rejet des échantillons primaires et conduite à tenir Déploiement de la prescription connectée des examens de biologie médicale RCL PREA 00028 - Prescription connectée : Acquiescement manuel des demandes |



| Phase | 5M | Points critiques | Echelle de criticité | | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai,...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement,...) avec les références du SMQ du Laboratoire |
|---------------|------------------------|--|-----------------------|--------------|---|--|
| Préanalytique | Matière (échantillons) | Acheminement des échantillons primaires incluant notamment : - conditionnement (emballage, température,...) - modalités (pneumatique, hors pneumatique,...) - délai | D=2 ; G=3 ; O=4 | Critique | Information des préleveurs Contrôle à réception | PBH INST 0022 - Charte d'identification du patient ou du résident au CHU de Limoges (PE QRU GRV 001) PBH INST 0024 - Vérification de l'identité du patient à toutes les étapes de sa prise en charge (P QRU GRV 005) PBH INST 0042 - Procédure d'utilisation du pneumatique PBH ORG 0027 - Convention relative à la réalisation des examens de biologie médicale entre le Laboratoire et les services de soins du CHU de Limoges PBH ORG 0032 - Convention relative à la réalisation d'examens de biologie médicale par le CHU de Limoges PBH PREA 0032 - Conditionnement et acheminement des échantillons primaires au laboratoire PBH PREA 0033 - Utilisation des poches isothermes pour l'acheminement des échantillons primaires dans la glace au Laboratoire PBH PREA 0005 - Manuel de prélèvement Catalogue général des examens de Laboratoire accessibles sur Intranet du CHU et sur Internet RCL PREA 0001 - Réception, tri et vérification de la conformité des échantillons biologiques LHEM PREA 0009 - Critères d'acceptation ou de rejet des échantillons primaires et conduite à tenir |
| Préanalytique | Méthode | Enregistrement du dossier dans le SIL | D=2 ; G=3 ; O=3 | Critique | Instruction d'enregistrement des échantillons à réception au Laboratoire Formation du personnel à la réception | PBH PREA 0001 - Procédure de réception et d'enregistrement des échantillons au Laboratoire RCL PREA 0009 - Scan bac : saisie d'une demande d'analyse RCL PREA 0014 - Instruction incluant la vérification de la saisie manuelle informatique Déploiement de la prescription connectée des examens de biologie médicale RCL PREA 0028 - Prescription connectée - Acquiescement manuel des demandes |
| Préanalytique | Matière (échantillons) | Interférences | D=4 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Information des préleveurs et des prescripteurs Contrôle à réception | PBH ORG 0027 - Convention relative à la réalisation des examens de biologie médicale entre le Laboratoire et les services de soins du CHU de Limoges PBH ORG 0032 - Convention relative à la réalisation d'examens de biologie médicale par le CHU de Limoges PBH PREA 0005 - Manuel de prélèvement Catalogue général des examens de Laboratoire accessibles sur Intranet du CHU et sur Internet LHEM PREA 0009 - Critères d'acceptation ou de rejet des échantillons primaires et conduite à tenir Voir chapitre "Evaluation des performances de la méthode" : - Encadré "Interférences" : Bibliographie et/ou essai sur site |
| Préanalytique | Milieu | Conditions de conservation des échantillons (température,...) | D=2 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Métrologie / suivi des enceintes thermostatées critiques | RCL PREA 0003 - Instruction de conservation des échantillons primaires avant analyse LHEM ACYTO 0004 - Réalisation d'une numération formule sanguine automatique (NFS sur automates) PBH MAT 0008 - Procédure Métrologie - Surveillance des équipements de mesure critiques LHEM MAT 0005 - Suivi métrologique des enceintes thermostatées en hématologie |



| Phase | 5M | Points critiques | Echelle de criticité | | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai,...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement,...) avec les références du SMQ du Laboratoire |
|---------------|--------------------------|--|-----------------------|--------------|---|--|
| Préanalytique | Main d'œuvre (Personnel) | Compétence et maintien de compétences du personnel | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Formation, habilitation et maintien des compétences du personnel aux différents postes identifiés | PBH GRH 0002 - Procédure d'habilitation et de maintien des compétences du personnel LHEM GRH 0028 - Cytologie - Morphologie sanguine |
| Préanalytique | Matériel (équipements) | Identification des frottis Fonctionnement du matériel utilisé dans le cadre du prétraitement de l'échantillon Surveillance des dérives | D=2 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Maîtrise des équipements (planification des maintenances préventives, suivi métrologique, raccordement,...) | Réalisation formule manuelle LHEM ACYTO 0005 Suivi des maintenances préventives et correctives (Qualims EQM®) PBH MAT 0008 - Procédure Métrologie - Surveillance des équipements de mesure critiques PBH A 0002 - Procédure d'évaluation interne et externe de la qualité - Organisation des contrôles Manuel d'utilisation de l'appareil |
| Préanalytique | Matériel (équipements) | Interfaces informatiques | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Transferts de données informatiques entre: Crossway (presco), Glims | PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques LHEM INF 0013 - paramétrage et vérification du système informatique : de la production ou saisie manuelle à la diffusion de résultat |
| Analytique | Milieu | Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur | D=2 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Conditions environnementales critiques | Exigences / manuel d'utilisation de l'appareil Suivi des conditions environnementales critiques |
| Analytique | Matériel (équipements) | Fonctionnement du matériel Surveillance des dérives | D=2 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Maîtrise des équipements (planification des maintenances préventives, suivi métrologique, raccordement,...) | Suivi des maintenances préventives et correctives (Qualims EQM®) PBH ORG 0028 - Convention de collaboration Laboratoire - Département Technique Biomédical PBH MAT 0008 - Procédure Métrologie - Surveillance des équipements de mesure critiques PBH A 0002 - Procédure d'évaluation interne et externe de la qualité - Organisation des contrôles Manuel d'utilisation de l'appareil |
| Analytique | Matériel (équipements) | Informatique embarquée | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Paramétrage, connexions, archivage des données | PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques PBH INF 0005 - Procédure de sécurité des systèmes informatiques |
| Analytique | Méthode | Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences,...) | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité | Voir chapitre "Evaluation des performances de la méthode" : - Encadré "Sensibilité et Spécificité analytique" : Bibliographie et/ou essai sur site - Encadré "Etendue de mesure" : Bibliographie et/ou essai sur site - Encadré "Limite de détection" : Bibliographie et/ou essai sur site Instruction décrivant les limites de détection, quantification, linéarité, interférences |
| Analytique | Méthode | Causes d'incertitude de mesure | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | incertitude de mesure | Voir chapitre "Evaluation des performances de la méthode" : - Encadré "Incertitudes de mesure" : Bibliographie et/ou essai sur site Gestion des contrôles cytomorphologiques LHEM A CYTO 0011 |

| Phase | 5M | Points critiques | Echelle de criticité | | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai,...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement,...) avec les références du SMQ du Laboratoire |
|----------------|--------------------------|--|-----------------------|--------------|--|---|
| | | | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | | |
| Analytique | Main d'œuvre (personnel) | Compétence et maintien de compétence du personnel | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Formation, habilitation et maintien des compétences du personnel aux différents postes identifiés | PBH GRH 0002 - Procédure d'habilitation et de maintien des compétences du personnel LHEM GRH 0028 - Cytologie - Morphologie sanguine |
| Analytique | Matériel (équipements) | Interfaces informatiques | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Transferts de données informatiques entre: Glims, Middleware (PGP ou MPL), Automate, Middleware (PGP ou MPL), Glims | PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques LHEM INF 0013 - paramétrage et vérification du système informatique : de la production ou saisie manuelle à la diffusion de résultat |
| Postanalytique | Milieu | Conditions de conservation des échantillons (température,...) | D=2 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Métrologie / suivi des enceintes thermostatées critiques | LHEM ACYTO 0004 - Réalisation d'une numération formule sanguine automatique (NFS sur automates) PBH MAT 0008 - Procédure Métrologie - Surveillance des équipements de mesure critiques |
| Postanalytique | Main d'œuvre (personnel) | Compétence et maintien de compétence du personnel | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Formation, habilitation et maintien des compétences du personnel aux différents postes identifiés | PBH GRH 0002 - Procédure d'habilitation et de maintien des compétences du personnel LHEM GRH 0028 - Cytologie - Morphologie sanguine |
| Postanalytique | Méthode | Règles de validation biologique et d'interprétation des résultats d'examens | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Validation du système expert de validation biologique Disponibilité et utilisation des renseignements cliniques pertinents | PBH POSTA 0001 - Procédure de validation et diffusion des résultats d'examens PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques LHEM INF 0021 - Règles de validation et de revue de routine au laboratoire d'hématologie validation biologique secteur cytologie LHEM A CYTO 0018 |
| Postanalytique | Matériel (équipements) | Serveur de diffusion informatique des résultats d'examens: Interfaces | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Paramétrage et vérification des connexions informatiques Transferts de données informatiques entre: Glims, Cyberlab, Cariatides | PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques PBH INF 0005 - Procédure de sécurité des systèmes informatiques LHEM INF 0013 - paramétrage et vérification du système informatique : de la production ou saisie manuelle à la diffusion de résultat |
| Postanalytique | Matériel (équipements) | Conservation des résultats d'examens sans détérioration permettant le suivi du patient | D=3 ; G=3 ; O=1 | Peu critique | Sauvegardes des résultats d'examens permettant d'assurer le suivi du patient | PBH INF 0005 - Procédure de sécurité des systèmes informatiques LHEM QUA 0012 - Règles de classement et d'archivage des documents et enregistrements au laboratoire d'hématologie |



La criticité de chaque risque est évaluée selon le mode de calcul ci-dessous :

| Niveaux | Gravité (G) en cas d'apparition du risque | Occurrence (O) du risque | Déteçtabilité (D) en cas d'apparition du risque |
|---------|--|---|--|
| 1 | Aucune incidence sur le résultat | Pourrait se produire au moins une fois par an | Détection automatique de dysfonctionnement |
| 2 | Incidence sur le résultat sans incidence sur la prise en charge du patient | Pourrait se produire au moins une fois par semestre | Détection par une procédure systématique de vérification |
| 3 | Incidence sur le résultat qui peut avoir une incidence sur la prise en charge du patient | Pourrait se produire au moins une fois par mois | Détection par une procédure périodique de vérification |
| 4 | Risque vital engagé | Pourrait se produire au moins une fois par semaine | Aucune détection possible ou organisée |

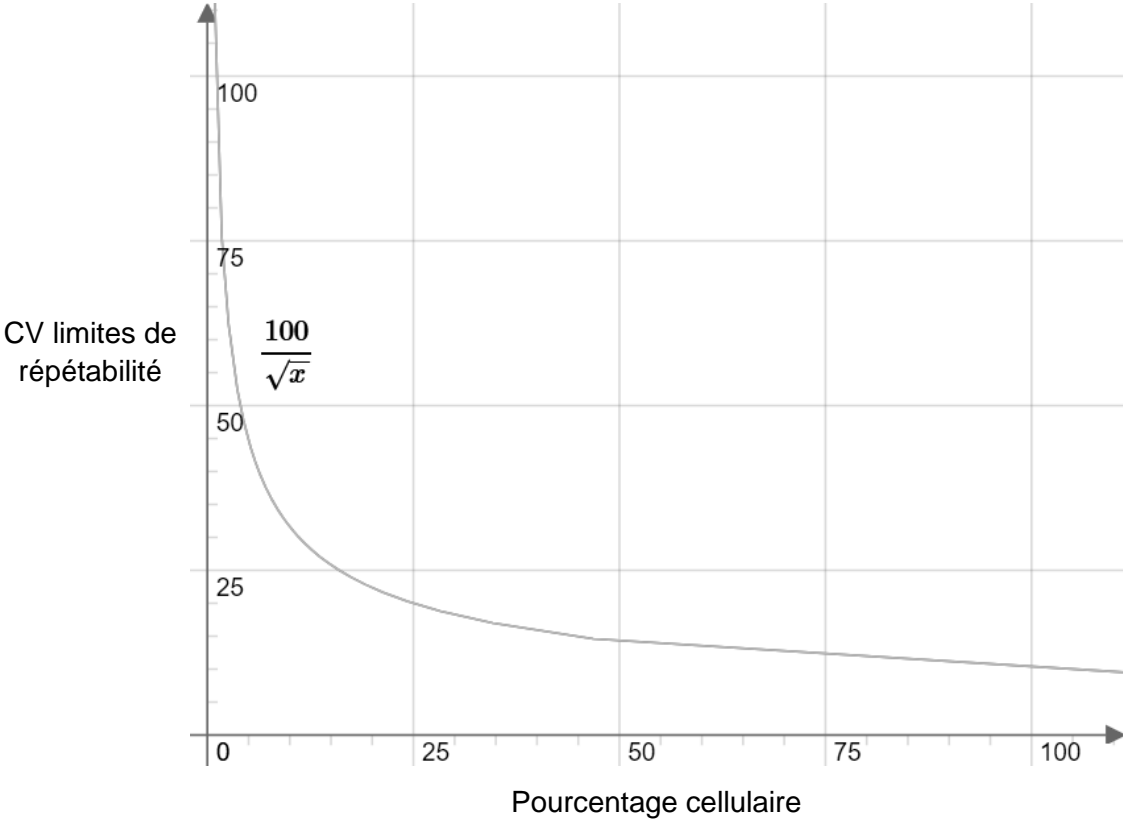
$$C \text{ Criticité} = G \text{ Gravité} \times O \text{ Occurrence} \times D \text{ Déteçtabilité}$$

Echelle de criticité

| | | | | |
|----|----|----|----|----------------------|
| 16 | 32 | 48 | 64 | Très critique |
| 12 | 24 | 36 | 48 | |
| 9 | 18 | 27 | 36 | |
| 8 | 16 | 24 | 32 | |
| 6 | 12 | 18 | 24 | Critique |
| 4 | 8 | 12 | 16 | Peu critique |
| 3 | 6 | 9 | 12 | |
| 2 | 4 | 6 | 8 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | |



Annexe 3. Etablissement des limites d'acceptabilité de la répétabilité pour les formules sanguines : graphique représentant la droite d'équation : $f(x) = \frac{1}{\sqrt{x}} * 100$



Annexe 4. Table de Rümke et table de Rümke extrapolée

Annexe 4.1. Table de Rümke

| % | 100 | 200 | 500 | 1.000 | 10.000 |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 0 - 3.6 | 0 - 1.8 | 0 - 0.7 | 0 - 0.4 | 0 - 0.1 |
| 1 | 0.0 - 5.4 | 0.1 - 3.6 | 0.3 - 2.3 | 0.5 - 1.8 | 0.8 - 1.3 |
| 2 | 0.2 - 7.0 | 0.6 - 5.0 | 1.0 - 3.6 | 1.2 - 3.1 | 1.7 - 2.3 |
| 3 | 0.6 - 8.5 | 1.1 - 6.4 | 1.7 - 4.9 | 2.0 - 4.3 | 2.6 - 3.4 |
| 4 | 1.1 - 9.9 | 1.7 - 7.7 | 2.5 - 6.1 | 2.9 - 5.4 | 3.6 - 4.5 |
| 5 | 1.6 - 11.3 | 2.4 - 9.0 | 3.3 - 7.3 | 3.7 - 6.5 | 4.5 - 5.5 |
| 6 | 2.2 - 12.6 | 3.1 - 10.2 | 4.1 - 8.5 | 4.6 - 7.7 | 5.5 - 6.5 |
| 7 | 2.9 - 13.9 | 3.9 - 11.5 | 4.9 - 9.6 | 5.5 - 8.8 | 6.5 - 7.6 |
| 8 | 3.5 - 15.2 | 4.6 - 12.7 | 5.8 - 10.7 | 6.4 - 9.9 | 7.4 - 8.6 |
| 9 | 4.2 - 16.4 | 5.4 - 13.9 | 6.6 - 11.9 | 7.3 - 10.9 | 8.4 - 9.6 |
| 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 |
| 25 | 16.9 - 34.7 | 19.2 - 31.6 | 21.3 - 29.0 | 22.3 - 27.8 | 24.1 - 25.9 |
| 30 | 21.2 - 40.0 | 23.7 - 36.9 | 26.0 - 34.2 | 27.2 - 32.9 | 29.1 - 31.0 |
| 35 | 25.7 - 45.2 | 28.4 - 42.0 | 30.8 - 39.4 | 32.0 - 38.0 | 34.0 - 36.0 |
| 40 | 30.3 - 50.3 | 33.2 - 47.1 | 35.7 - 44.4 | 36.9 - 43.1 | 39.0 - 41.0 |
| 45 | 35.0 - 55.3 | 38.0 - 52.2 | 40.6 - 49.5 | 41.9 - 48.1 | 44.0 - 46.0 |
| 50 | 39.8 - 60.2 | 42.9 - 57.1 | 45.5 - 54.5 | 46.9 - 53.1 | 49.0 - 51.0 |

Tableau statistique présentant, en fonction du nombre de cellules comptées et du pourcentage cellulaire réel, un intervalle de valeurs dans lequel le décompte est juste.

Par exemple, pour un pourcentage cellulaire réel à 20%, il est possible de dénombrer sans commettre d'erreur entre 12,7% et 29,2% de ces cellules si la formule est effectuée sur 100 éléments, ou entre 14,7% et 26,2% si 200 éléments sont comptés.

Annexe 4.2. Table de Rümke extrapolée, adaptée à tous les pourcentages cellulaires

| % vrai | cellules comptées (%) | | % vrai | cellules comptées | | % vrai | cellules comptées | | % vrai | cellules comptées | |
|--------|-----------------------|--------------|--------|-------------------|--------------|--------|-------------------|--------------|--------|-------------------|--------------|
| | limite basse | limite haute | | limite basse | limite haute | | limite basse | limite haute | | limite basse | limite haute |
| 0 | 0 | 5.3 | 26 | 17.6 | 35.4 | 51 | 41.7 | 62 | 76 | 68.6 | 88.1 |
| 1 | 0 | 5.3 | 27 | 18.5 | 36.5 | 52 | 42.8 | 63.1 | 77 | 69.7 | 89.1 |
| 2 | 0.3 | 7.1 | 28 | 19.4 | 37.6 | 53 | 43.8 | 64.1 | 78 | 70.8 | 90.2 |
| 3 | 0.7 | 8.6 | 29 | 20.3 | 38.6 | 54 | 44.8 | 65.2 | 79 | 72 | 91.2 |
| 4 | 1.1 | 10 | 30 | 21.2 | 39.7 | 55 | 45.9 | 66.2 | 80 | 73.1 | 92.3 |
| 5 | 1.6 | 11.4 | 31 | 22.1 | 40.8 | 56 | 46.9 | 67.3 | 81 | 72.2 | 93.3 |
| 6 | 2.2 | 12.6 | 32 | 23 | 41.9 | 57 | 48 | 68.3 | 82 | 75.3 | 94.3 |
| 7 | 2.8 | 13.9 | 33 | 24 | 42.9 | 58 | 49 | 69.4 | 83 | 76.5 | 95.4 |
| 8 | 3.4 | 15.1 | 34 | 24.9 | 44 | 59 | 50.1 | 70.4 | 84 | 77.6 | 96.4 |
| 9 | 4.1 | 16.3 | 35 | 25.9 | 45.1 | 60 | 51.2 | 71.5 | 85 | 78.7 | 97.4 |
| 10 | 4.7 | 17.5 | 36 | 26.8 | 46.1 | 61 | 52.2 | 72.5 | 86 | 79.9 | 98.5 |
| 11 | 5.4 | 18.7 | 37 | 27.8 | 47.2 | 62 | 53.3 | 73.5 | 87 | 81 | 99.5 |
| 12 | 6.1 | 19.8 | 38 | 28.7 | 48.3 | 63 | 54.4 | 74.6 | 88 | 82.2 | 100 |
| 13 | 6.9 | 21 | 39 | 29.7 | 49.3 | 64 | 55.5 | 75.6 | 89 | 8.3 | 100 |
| 14 | 7.6 | 22.1 | 40 | 30.7 | 50.4 | 65 | 56.5 | 76.7 | 90 | 84.5 | 100 |
| 15 | 8.4 | 23.2 | 41 | 31.7 | 51.5 | 66 | 57.6 | 77.7 | 91 | 85.6 | 100 |
| 16 | 9.2 | 24.4 | 42 | 32.6 | 52.5 | 67 | 58.7 | 78.8 | 92 | 86.8 | 100 |
| 17 | 10 | 25.5 | 43 | 33.6 | 53.6 | 68 | 59.8 | 79.8 | 93 | 87.9 | 100 |
| 18 | 10.8 | 26.6 | 44 | 34.6 | 54.6 | 69 | 60.9 | 80.8 | 94 | 89.1 | 100 |
| 19 | 11.6 | 27.7 | 45 | 35.6 | 55.7 | 70 | 62 | 81.9 | 95 | 90.2 | 100 |
| 20 | 12.4 | 28.8 | 46 | 36.6 | 56.8 | 71 | 63.1 | 82.9 | 96 | 91.4 | 100 |
| 21 | 13.2 | 29.9 | 47 | 37.7 | 57.8 | 72 | 64.2 | 84 | 97 | 92.6 | 100 |
| 22 | 14.1 | 31 | 48 | 38.7 | 58.9 | 73 | 65.3 | 85 | 98 | 93.7 | 100 |
| 23 | 14.9 | 32.1 | 49 | 39.7 | 59.9 | 74 | 66.4 | 86 | 99 | 94.9 | 100 |
| 24 | 15.8 | 33.2 | 50 | 40.7 | 61 | 75 | 67.5 | 87.4 | 100 | 96.1 | 100 |
| 25 | 16.7 | 34.3 | | | | | | | | | |

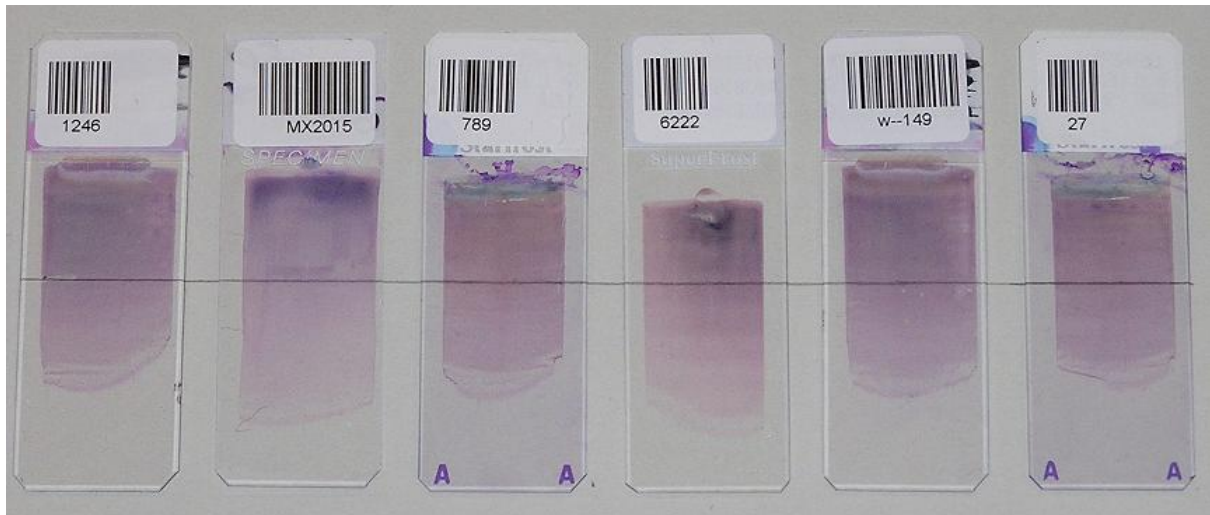


Annexe 5. Exemples de frottis pour le DM

Source : manuel d'utilisation du DM1200 v5.0

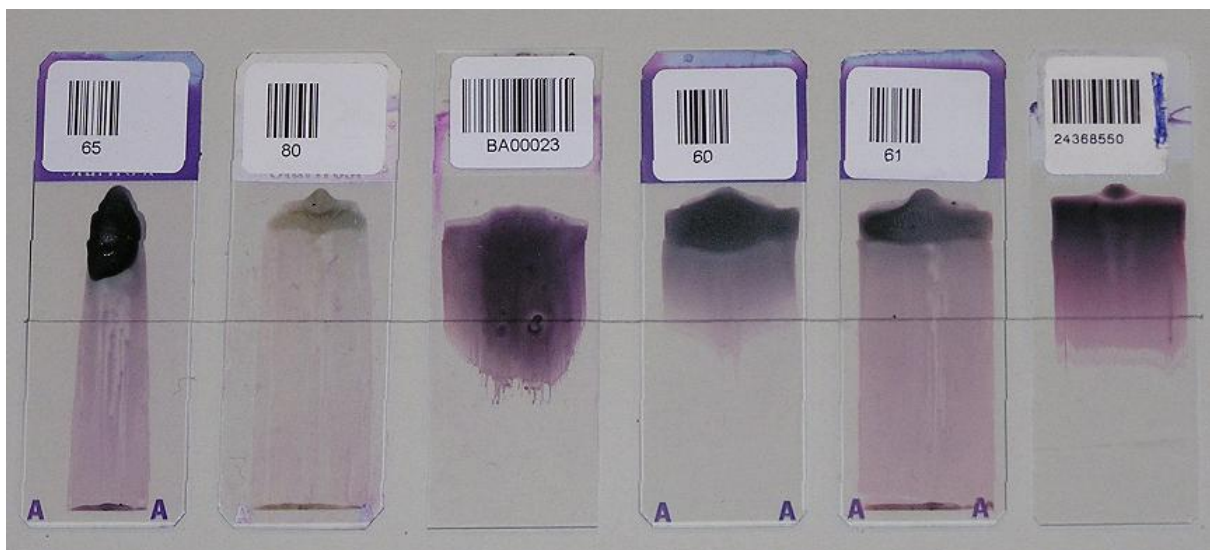
La ligne sur les images suivantes représente le point de départ de l'analyse.

Annexe 5.1. Acceptés



Ces lames ont toutes été préparées conformément aux spécifications.

Annexe 5.2. Non acceptés



Ces lames n'ont pas été préparées conformément aux spécifications et ne doivent pas être analysées dans le DM1200.



Annexe 6. Stratégie du gating utilisée dans l'étude Septiflux 1 : lignées cellulaires déduites présumées.

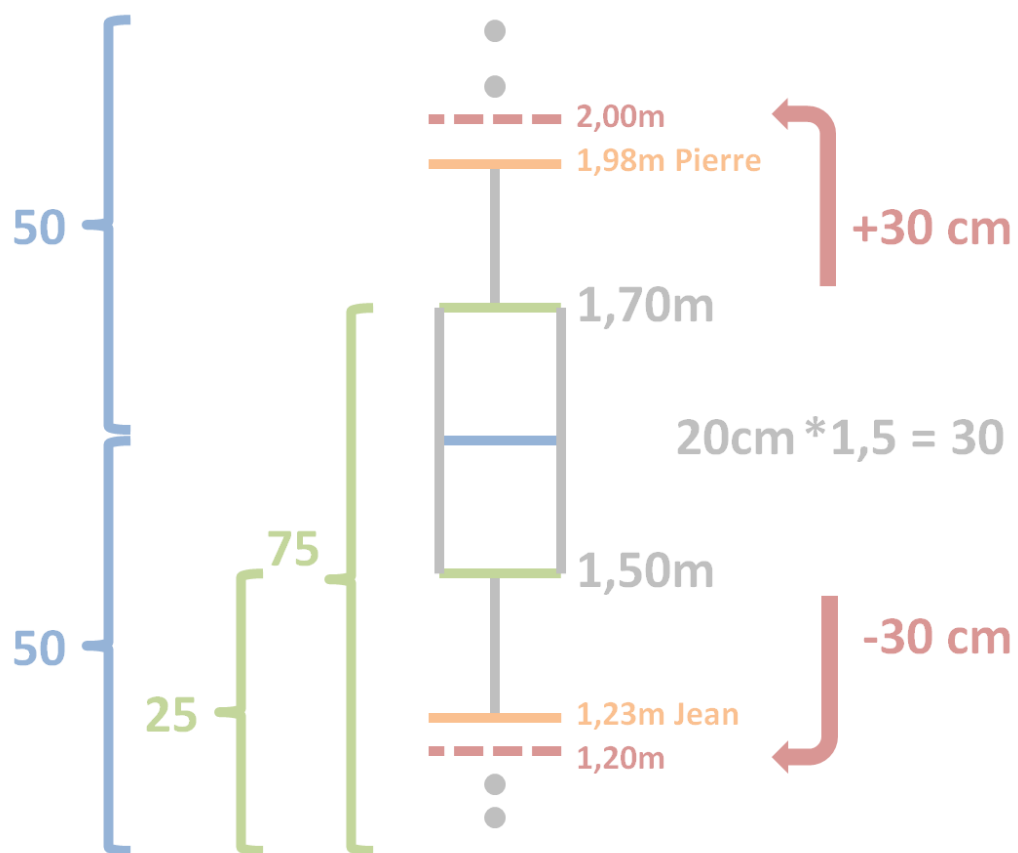
| | Combination | Gating properties |
|-----------------------------------|-------------|--|
| Lymphocytes G/L | (iv) | SSC low,CD45 high |
| B-lymphocytes , CD19pos, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD19+ |
| T-lymphocytes, CD3pos, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3+ |
| T-lymphocytes, CD4pos, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3+,CD4+ |
| T-lymphocytes, CD8pos, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3+,CD8+ |
| NK lymphocytes, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3-,CD16+ or CD56+ |
| NK-like lymphocytes, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3-,CD16+ or CD56+ |
| Activated CD4pos lymphocytes, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3+,CD4+, DR+ or CD25+ or CD38+ |
| Activated CD8pos lymphocytes, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3+,CD8+, DR+ or CD25+ or CD38+ |
| T reg, G/L | (iv) | SSC low,CD45 high,CD3+,CD25+, CD127 dim |
| Granulocytes G/L : | (iii) | SSC high/CD45int |
| - increased CD64 expression, %** | (iii) | SSC high/CD45int/CD64+ |
| - decreased CD16 expression, %** | (ii) | SSC high/CD45int/CD14-/CD11b-CD16dim |
| - decreased CD10 expression, % ** | (iii) | SSC high/CD45int/CD10dim |
| - increased CD24 expression, %** | (iii) | SSC high/CD45int/CD24+ |
| Hematogones, G/L | (iii) | SSC low/CD45int/cd16-/CD64-/not CD45 high/CD10+ |
| DC1, G/L | (v) | CD45int/not SShigh/CD4int/not CD123-/CD116+ |
| DC2, G/L | (v) | CD45int/not SShigh/CD4int/not CD123+ |
| CD34+, G/L | (iii) | SSC low/CD45int/CD34+ |
| Plasmocytes G/L | (v) | CD45+/CD138+ |
| Promonocytes, G/L | (ii) | SSCInt/CD45 high/CD14Int/CD11bInt |
| Monocytes, G/L | (ii) | SSCInt/CD45 high/CD14+ |
| increased CD16 expression, % | (ii) | SSCInt/CD45 high/CD14+/CD16+ |
| increased DRneg monocytes % | (iv) | CD45int/not SShigh/CD4+ |

- (i) CD36-FITC / CD2-PE + CD294-PE /CD19-ECD / CD16-PC5 /CD45-PC7,
- (ii) CD14-FITC / CD11c-PE / CD45-ECD / CD11b-PC5 /CD16-PC7,
- (iii) CD64-FITC / CD10-PE / CD45-ECD / CD24-PC5 / CD34-PC7
- (iv) CD4-FITC /DR-PE / CD8-ECD/ CD38-PC5/ CD25-PC7 /CD56-APC / CD127-A700 /CD3-A750 /CD16-PB / CD45-KO
- (v) CD116-FITC / CD123-PE / CD45-ECD / CD138-PC5 / CD4-PC7.



Annexe 7. Interprétation des box plots (ou boîtes à moustache) avec MedCalc

Exemple pour les tailles de 100 personnes :

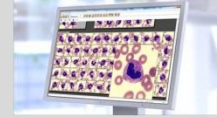


Annexe 8. Poster tel que présenté lors du congrès de l'AFC (association française de cytométrie) tenu à Reims du 7 au 9 novembre 2017

La comparaison de la microscopie automatisée (DM) et de la CMF révèle les anomalies morphologiques majeures des immatures granuleux du sepsis.

M. Labriffe¹, A. Marcillou¹, R. Jeannet^{2,3}, T. Daix^{2,4}, B. François^{2,4}, J. Feuillard^{1,2}, E. Guérin^{1,2}

¹Hématologie Biologique, CHU Limoges, Limoges, France ; ²Inserm CIC 1435, CHU Limoges, Limoges, France ; ³UMR CNRS 7276, CHU Limoges, Limoges, France ; ⁴Réanimation polyvalente, CHU Limoges, Limoges, France



Introduction

- Le sepsis est la deuxième cause de décès en réanimation. C'est une situation bien connue d'augmentation des «band-cells» et de la myélémie, équivalents cytotogiques des immatures granuleux CD10^{dim} et CD16^{dim} en cytométrie de flux (CMF).
- Au plan cytologique, ces situations sont mal codifiées et peu reproductibles. Par contre en CMF, dans une étude multicentrique en cours de publication et avec recrutement sélectif, nous avons montré le rôle majeur de la quantification précise des immatures granuleux (IG) afin d'évaluer le risque de mortalité^{1,2}.
- C'est pourquoi nous avons comparé la quantification des immatures granuleux par un microscope motorisé (CellaVision DM1200™), avec la CMF. Le DM dispose d'un logiciel permettant une classification automatisée : technique pouvant être plus facilement mise en place en urgence.

Matériel et Méthodes

- De façon prospective, entre novembre 2013 et juin 2015, tous les patients admis dans un service d'urgence ou une unité de réanimation pour un sepsis évoluant depuis moins de 24 heures étaient éligibles. Une numération formule sanguine avec une lame colorée au May-Grünwald Giemsa étaient réalisées à l'inclusion ainsi qu'une étude par cytométrie en flux en 8 couleurs (CD64/CD10/CD14/CD16/CD24/CD11b/CD3/CD45) permettant d'isoler : les lymphocytes CD3, les granuleux CD64+, les monocytes en distinguant la proportion de pro-inflammatoires (CD16), et les granuleux immatures (expression diminuée du CD10 et du CD16).
- Les données brutes de pré-classification des granuleux neutrophiles du DM ont été conservées sans reclassement. Alors que les monocytes, lymphocytes, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles ont été reclassés par deux cytologistes. Les neutrophiles non et mal classés dans une autre catégorie n'ont pas été inclus.

Résultats

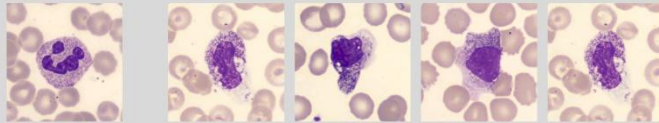


Fig. 1 : PNN contrôle sur le DM (1^{re} photo à gauche) ; souffrance des granuleux neutrophiles sur le DM.

- Pour 15 frottis contrôles, le taux de neutrophiles non/mal classés était bas à 0,9% (fig. 3 : écart-type $\sigma=2,0$).

Il était également faible dans les myélémies sans sepsis : 6,5% pour un patient avec Splénomégalie Myéloïde.

- Sur les 157 patients septiques, 139 patients avec frottis correct ont été analysés. Et la proportion de neutrophiles non/mal classés augmente avec la gravité du sepsis (fig. 3).
- Le coefficient de corrélation des IG rendu par le DM, en fonction de la proportion de granuleux CD10^{dim} et CD16^{dim} est très bas à respectivement 0,52 et 0,25 (fig. 5 et 6). En effet, le DM objective la souffrance des granuleux (fig. 1 : hypo/hyper- granulation, vacuoles et anomalies de segmentation).

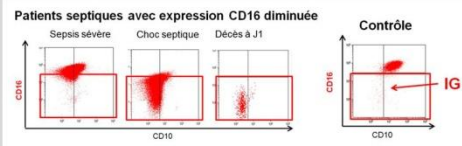


Fig. 2 : Cytométrie de flux et groupes pronostiques.

| Groupes | Nombre de patients | Moyenne des % de granuleux mal et non classés | Écart type | % de patients avec granuleux mal et non classés $\geq 2\%$ |
|---------------|--------------------|---|------------|--|
| Contrôle | 15 | 0,9 | 2,0 | 6,7 |
| Sepsis | 82 | 5,4 | 8,7 | 52,4 |
| Sepsis sévère | 29 | 12,1 | 15,2 | 69,0 |
| Choc septique | 28 | 12,8 | 12,0 | 92,9 |

Fig. 3 : Pourcentages de granuleux mal et non classés.

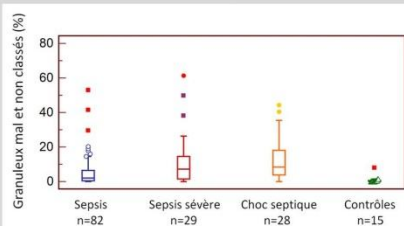


Fig. 4 : Pourcentages de granuleux mal et non classés par groupes pronostiques.

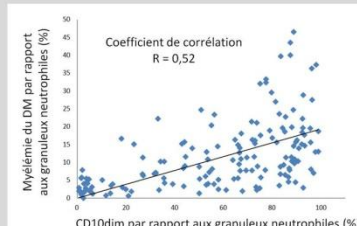


Fig. 5 : Myélémie du DM en fonction de CD10dim.

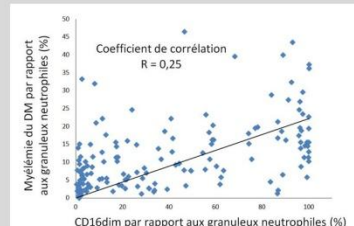


Fig. 6 : Myélémie du DM en fonction de CD16dim.

Conclusion

- La CMF reste la méthode de référence pour quantifier précisément les IG pour une évaluation du risque de mortalité chez les patients septiques.
- Cependant, le DM a correctement joué son rôle de sentinelle en identifiant les frottis pathologiques d'une part. D'autre part, la quantification des IG par le DM a révélé des anomalies morphologiques majeures dans le sepsis, d'autant plus que celui-ci est grave.

Références :

1. Guerin, Estelle, Marie-Caroline, Marie-Astrid Raquil, Bruno Girardot, Fémy Bellier, Sébastien Gilbert, Marie-Christine Eéné, et al. "Circulating Immature Granulocytes with T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration." Critical Care Medicine 42, no. 9 (September 2014): 2007-18.
2. Circulating immature granulocytes and T-cell lymphopenia predict clinical worsening of septic patients. Thomas Daix, MD, Estelle Guérin, MD, Eha Tavernier, PhD, Emmanuelle Mercier, MD, Valérie Gissot, MD, Olivier Héran, MD, Jean-Paul Mira, MD, PhD, Florence Comas, MD, Nicolas Chapuis, MD, Christophe Guittou, MD, Marie-C. Eéné, PhD, Jean-Frédéric Cassot, MD, Cindy Tisser, MD, Julien Song, MD, Gaël Firon, MD, Anne-Françoise ME, Irigoyne Malles, MD, Eric Lesage, MD, Nicolas de Prost, MD, Stéphan Bellaf, MD, FMC, Christiane Wagner-Eaton, MD, Fanni Coudroy, MD, Elodie Claudon, MD, Fabrice Uhl, MD, Mikhaïl Fossoul, MD, Thomas Lafon, MD, Robin Jeannet, MD, Frédéric Vargas, MD, PhD, Catherine Fleureau, MD, Mickaël Foux, MD, Kaoutar Allou, PharmD, Philippe Vignon, MD, PhD, Jean Feuillard, MD, PhD, Erno François, MD for the Septiflux trial group (en cours de publication)



Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.





Validation initiale des performances du microscope automatisé DM1200 et application dans le suivi pronostique du sepsis

Dans le cadre de la démarche d'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO 15189, le secteur d'hématocytologie du CHU de Limoges souhaite adopter une nouvelle méthode de formule sanguine par microscopie automatisée. Il s'agit d'une méthode principalement automatique, et notre travail présente deux versants : l'un quantitatif représenté par la numération en pourcentage des différentes lignées cellulaires présentes dans le sang, l'autre qualitatif avec la détection et la reconnaissance des cellules anormales sanguines dans les échantillons pathologiques. Les contrôles internes et externes de la qualité permettront d'assurer le maintien des performances du DM et du personnel. L'étude des immatures granuleux pour prédire l'évolution clinique de patients septiques nous a permis de montrer les limites actuelles de la microscopie automatisée par rapport à la méthode de référence, la CMF. Cependant, le DM a correctement joué son rôle de sentinelle en identifiant les frottis difficiles. D'autre part, la quantification des IG par le DM a révélé des anomalies morphologiques majeures dans le sepsis, d'autant plus que celui-ci est grave.

Mots-clés : formule sanguine, microscopie automatisée, validation, vérification, DM, cytométrie de flux, immatures granuleux, sepsis, cytologie

Initial validation of the automated microscope DM1200 and application in prognostic follow-up of septic patients

Ordinance No. 2010-49 of 13 January 2010 concerning medical biology requires the accreditation of all French laboratories according to DIN EN ISO 15189. This thesis presents the approach and results of method validations performed for the blood count by automated microscopy. Participation in external and internal quality assurance schemes for both technical and interpretative elements of blood cells examination, are encouraged and recommended to ensure accuracy, reproductibility and standardization. The study of immature granulocytes to predict the clinical course of septic patients allowed us to show the current limitations of automated microscopy compared to the reference method, FCM. However, the DM correctly played his role of sentry in identifying difficult blood smears on the one hand. On the other hand, the quantification of IG by DM revealed major morphological abnormalities in sepsis, especially as it is severe.

Keywords : blood count, automated microscope, validation, verification, DM, flow cytometry, immature granulocytes, sepsis, cytology

