

Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 23 octobre 2020

Par

Charlotte FRANCOIS

Née le 28 janvier 1991, à Toulouse

Evaluation des performances du mode BodyFluid™ de l'automate d'Hématologie Mindray BC-6200 : comparaison avec la méthode manuelle et application dans un laboratoire polyvalent

Thèse dirigée par Mme le Docteur Elise FREBET-SEILLAN

Examineurs :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ.....Présidente

M. le Professeur Sébastien HANTZ.....Juge

Mme le Docteur Jasmine CHAUZEIX.....Juge

M. le Docteur David RIZZO.....Juge

M. le Docteur Franck TRIMOREAU.....Membre invité



Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 23 octobre 2020

Par Charlotte FRANCOIS

Née le 28 janvier 1991, à Toulouse

Evaluation des performances du mode BodyFluid™ de l'automate d'Hématologie Mindray BC-6200 : comparaison avec la méthode manuelle et application dans un laboratoire polyvalent

Thèse dirigée par Mme le Docteur Elise FREBET-SEILLAN

Examineurs :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ.....Présidente
M. le Professeur Sébastien HANTZ.....Juge
Mme le Docteur Jasmine CHAUZEIX.....Juge
M. le Docteur David RIZZO.....Juge
M. le Docteur Franck TRIMOREAU.....Membre invité



Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2020

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE (retraite septembre 2020)
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MCU-P DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE

BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LAVERDET-POUCH Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LAWSON Roland	PHARMACOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

MICROBIOLOGIE
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

MARCHAND Guillaume

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

PROFESSEURS EMERITES :

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 31/03/2021)

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Docteur Elise Frebet-Seillan pour ses précieux conseils et encouragements. Tu as su, avec bienveillance, me guider dans la construction et la rédaction de cette thèse. Je te suis très reconnaissante de m'avoir proposé ce travail et d'avoir bien voulu m'encadrer. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et de m'avoir fait partager ton savoir durant mon semestre à Agen.

Merci au Professeur Sylvie Rogez de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail. J'ai particulièrement apprécié vos enseignements lors de mon passage dans votre service de Bactériologie/Virologie, à Limoges.

Merci au Professeur Sébastien Hantz d'avoir accepté d'être membre du jury et de juger cette thèse. Merci aussi pour vos enseignements lors de mon passage dans votre service de Bactériologie/Virologie, à Limoges.

Merci également au Docteur Jasmine Chauzeix, au Docteur David Rizzo et au Docteur Franck Trimoreau, du laboratoire d'Hématologie de Limoges, d'avoir accepté de participer à ce jury et à l'analyse critique de ce travail.

Merci à Julien Balley et à Christophe Vallet (de Menarini®) pour m'avoir éclairée sur les caractéristiques techniques et le fonctionnement du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200.

A mes parents, mes sœurs (Marie, Claire, Hortense) et mon beau-frère (Arnaud), pour votre infaillible soutien, votre écoute et votre patience tout au long de mes études. Merci d'être là tous les jours à mes côtés.

A mes grands-parents (Manou, Papy, Mamie), ma tante (Marie-Christine), mes oncles (Philippe, Christian, Pierre), mes cousins (Elisa, Anabelle, Isadora, Flora, Axel, Nathan, François-Xavier, Nicolas, Thomas, Arnaud, Jean-Baptiste), leurs épouses et leurs enfants. Merci pour tous ces moments inoubliables.

A tout le reste de la famille.

A Jérémy, pour ton soutien continu durant ce travail, ta patience et ta gentillesse. Merci pour tes conseils et surtout de toujours croire en moi.

A François-Xavier, pour ta précieuse aide pour les statistiques.

A Baptiste, pour ton aide en informatique, et à Alix.

A tous mes amis d'enfance.

A mes amis de la fac de Pharmacie : Anaïs, Aurore (et Benjamin), Christine, Elodie (et Hélène), Justine, Lucie, Mathilde (et Jean-Baptiste), Mélanie M, Mélanie V et Pierre. Merci pour ces belles années ; il y en aura d'autres.

A tous les internes que j'ai pu côtoyer durant ces quatre années et à la petite équipe du DU Qualité de Toulouse.

Je remercie également tous les biologistes, techniciens, internes, externes, agents et secrétaires que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de mon internat, à Limoges, à Bordeaux, à Toulouse et à Agen, qui m'ont permis de me former. Merci à toute l'équipe du laboratoire d'Agen qui m'a bien aidée dans mon travail. Merci tout particulièrement à Amélie et Nicolas pour votre bonne humeur et pour tout ce que vous m'avez appris.

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

Introduction.....	18
I. Généralités	19
I.1. Liquides biologiques corporels humains.....	19
I.1.1. Liquide d'ascite ou liquide péritonéal	19
I.1.1.1. Physiopathologie	19
I.1.1.2. Ponction d'ascite	20
I.1.1.3. Cytologie.....	21
I.1.1.4. Autres analyses biologiques	29
I.1.2. Liquide pleural.....	29
I.1.2.1. Physiopathologie	29
I.1.2.2. Ponction pleurale.....	30
I.1.2.3. Cytologie.....	31
I.1.2.4. Autres analyses biologiques	33
I.1.3. Liquide céphalo-rachidien	34
I.1.3.1. Physiopathologie	34
I.1.3.2. Ponction lombaire.....	34
I.1.3.3. Cytologie.....	36
I.1.3.4. Autres analyses biologiques	37
I.1.4. Liquide de dialyse péritonéale continue ambulatoire	37
I.1.4.1. Principe de la dialyse péritonéale continue ambulatoire	37
I.1.4.2. Complications de la dialyse péritonéale continue ambulatoire	39
I.1.4.3. Prélèvement	39
I.1.4.4. Cytologie.....	40
I.1.4.5. Autres analyses biologiques	40
I.2. Numération et formule cellulaires des liquides biologiques : techniques de référence manuelles	40
I.2.1. Numération en cellule de comptage	40
I.2.2. Formule cellulaire.....	41
I.2.3. Contraintes et limites	41
I.3. Vérification et validation de méthode.....	42
I.3.1. Définitions	42
I.3.2. Référentiels.....	43
I.3.3. Dossier de vérification / validation de méthode	43
II. Objectifs	46
III. Matériels et méthodes	47
III.1. Type d'étude	47
III.2. Sélection des échantillons	47
III.3. Recueil de données	47
III.4. Analyse statistique.....	47
III.5. Mesures éthiques et réglementaires	48
III.6. Description de la technique manuelle.....	48
III.6.1. Numération cellulaire	48
III.6.2. Formule cellulaire.....	49
III.7. Description du principe analytique du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200.....	50
III.7.1. Chaîne CAL 6000	50

III.7.1.1. Module BC-6200.....	51
III.7.1.1.1. Caractéristiques.....	51
III.7.1.1.2. Modes d'analyse.....	51
III.7.1.1.3. Principes d'analyse.....	51
III.7.1.1.3.1. Spectrophotométrie : canal hémoglobine (HB).....	52
III.7.1.1.3.2. Impédance : canal globules rouges / plaquettes (GR-PLT).....	52
III.7.1.1.3.3. Cytofluorométrie en flux.....	53
III.7.1.2. Etaleur colorateur SC-120.....	55
III.7.2. Mode BodyFluid™.....	56
III.7.2.1. Numération cellulaire.....	56
III.7.2.2. Formule leucocytaire.....	56
III.7.2.3. Expression des résultats.....	57
III.7.2.4. Représentation graphique en scattergramme.....	57
III.8. Evaluation des performances de la méthode automatisée.....	58
III.8.1. Répétabilité.....	58
III.8.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire.....	59
III.8.3. Approche de la justesse.....	59
III.8.4. Approche de l'exactitude.....	59
III.8.5. Estimation de l'incertitude de mesure.....	60
III.8.6. Comparaison de méthodes.....	61
III.8.7. Limite de détection et limite de quantification.....	63
III.8.8. Contamination inter-échantillons.....	63
III.9. Maîtrise des risques.....	63
III.10. Etude des délais de rendu des résultats.....	64
IV. Résultats.....	65
IV.1. Caractéristiques des échantillons.....	65
IV.2. Evaluation des performances de la méthode automatisée.....	66
IV.2.1. Vérifications expérimentales.....	66
IV.2.1.1. Répétabilité.....	66
IV.2.1.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire.....	68
IV.2.1.3. Approche de la justesse.....	70
IV.2.1.4. Approche de l'exactitude.....	72
IV.2.1.5. Estimation de l'incertitude de mesure.....	74
IV.2.1.6. Comparaison de méthodes.....	76
IV.2.1.7. Limite de détection et limite de quantification.....	85
IV.2.1.8. Contamination inter-échantillons.....	85
IV.2.2. Vérifications bibliographiques.....	85
IV.2.2.1. Limites de linéarité.....	86
IV.2.2.2. Interférences et spécificités analytiques.....	86
IV.2.2.3. Robustesse et stabilité des réactifs.....	86
IV.2.2.4. Intervalles de référence et/ou valeurs seuils.....	86
IV.3. Maîtrise des risques.....	87
IV.4. Vérification des performances appliquée aux liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire.....	91
IV.5. Application au laboratoire et impact sur les délais de rendu des résultats.....	97
IV.5.1. Situation actuelle : prise en charge des liquides biologiques en journée et en période de permanence des soins.....	97
IV.5.2. Comparaison des délais.....	98

Discussion.....	101
Conclusion.....	106
Références bibliographiques.....	107
Annexes	111
Serment De Galien.....	126

Table des illustrations

Figure 1 : Illustration d'une ponction d'ascite	21
Figure 2 : Cellules mésothéliales non altérées et en transformation « histioïde » dans un liquide d'ascite (Objectif 50)	22
Figure 3 : Ascite à polynucléaires neutrophiles (Objectif 50)	23
Figure 4 : Ascite à polynucléaires éosinophiles (Objectif 50).....	23
Figure 5 : Ascite lymphocytaire (Objectif 50).....	24
Figure 6 : Cellules de Burkitt dans un liquide d'ascite (Objectif 50)	25
Figure 7 : Cellule de Reed-Sternberg (maladie de Hodgkin) dans un liquide d'ascite (Objectif 50)	25
Figure 8 : Lymphome B dans un liquide d'ascite (Objectif 50).....	26
Figure 9 : Mésothéliome dans un liquide d'ascite (Objectif 50).....	27
Figure 10 : Adénocarcinome ovarien dans un liquide d'ascite (Objectif 10)	28
Figure 11 : Adénocarcinome ovarien dans un liquide d'ascite (Objectif 50)	28
Figure 12 : Carcinose épidermoïde de l'œsophage dans un liquide d'ascite (Objectif 50)	29
Figure 13 : Illustration d'une ponction pleurale	31
Figure 14 : LNH folliculaire dans un liquide pleural (Objectif 50)	32
Figure 15 : Cancer anaplasique à petites cellules dans un liquide pleural (Objectif 50).....	33
Figure 16 : Illustration d'une ponction lombaire.....	36
Figure 17 : Exemple d'une stratégie de DPCA	38
Figure 18 : Illustration du recueil du liquide de DPCA.....	39
Figure 19 : Tableau des performances à évaluer lors d'une vérification ou d'une validation de méthode quantitative ou qualitative.....	44
Figure 20 : Cellule de Kova® permettant la numération cellulaire des différents liquides biologiques corporels	48
Figure 21 : Aerospray® Gram Series 2 (colorateur de lame / cyto centrifugeuse)	49
Figure 22 : Présentation de la chaîne CAL 6000	50
Figure 23 : Illustration du mode manuel du BC-6200.....	51
Figure 24 : Analyse par impédance (canal globules rouges / plaquettes)	52
Figure 25 : Histogrammes de distribution volumétrique des globules rouges (RBC) et des plaquettes (PLT).....	53
Figure 26 : Mesure optique en cytofluorométrie en flux	53
Figure 27 : Analyse par fluorocytométrie (mise en évidence des trois paramètres exploitables : SS, FL, FS).....	54
Figure 28 : SC-120, de face et de profil	55

Figure 29 : Scattergramme DIFF du mode BodyFluid™	57
Figure 30 : Obtention de la formule leucocytaire de recherche du mode BodyFluid™ grâce au canal DIFF	58
Figure 31 : Diagramme des 5M (diagramme d'Ishikawa) pour l'élaboration de l'analyse de risques.....	63
Figure 32 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et méthode manuelle.....	79
Figure 33 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et le BC-6200 #2	84
Figure 34 : Scattergrammes et images des étalements colorés au MGG (aux grossissements 20 et 50) de quelques échantillons de liquides d'ascite et de liquides pleuraux présentant un scattergramme DIFF anormal	91
Figure 35 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et la méthode manuelle pour les liquides de DPCA.....	94
Figure 36 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et le BC-6200 #2 pour les liquides de DPCA	96
Figure 37 : Histogramme représentant les délais de rendu des résultats obtenus par les deux méthodes étudiées	99
Figure 38 : Histogramme représentant le temps technique de la numération cellulaire manuelle.....	99
Figure 39 : Histogramme représentant le temps technique de la formule cellulaire manuelle	100
Figure 40 : Histogramme représentant le temps technique total des deux méthodes étudiées	100

Table des tableaux

Tableau 1 : Description du programme « MGG1 » (frottis sanguins, liquides de ponction)...	55
Tableau 2 : Présentation des 101 échantillons étudiés.....	65
Tableau 3 : Aspect des différents échantillons étudiés	65
Tableau 4 : Contexte des 101 échantillons étudiés	66
Tableau 5 : Résultats de la répétabilité (BC-6200 #1)	67
Tableau 6 : Résultats de la répétabilité (BC-6200 #2)	67
Tableau 7 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #1).....	68
Tableau 8 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #2).....	68
Tableau 9 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #1)	69
Tableau 10 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #2).....	69
Tableau 11 : Résultats de la justesse : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #1)	70
Tableau 12 : Résultats de la justesse : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #2)	70
Tableau 13 : Résultats de la justesse : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #1)	71
Tableau 14 : Résultats de la justesse : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #2)	71
Tableau 15 : Résultats des EEQ par rapport au groupe de pairs (BC-6200 #1).....	72
Tableau 16 : Résultats des EEQ par rapport à l'ensemble des participants (BC-6200 #1) ...	73
Tableau 17 : Résultats des EEQ par rapport au groupe de pairs (BC-6200 #2).....	73
Tableau 18 : Résultats des EEQ par rapport à l'ensemble des participants (BC-6200 #2) ...	74
Tableau 19 : Résultats de l'incertitude de mesure (BC-6200 #1)	74
Tableau 20 : Résultats de l'incertitude de mesure (BC-6200 #2)	75
Tableau 21 : Validation de l'automate BC-6200 #1 pour le diagnostic d'épanchement inflammatoire avec comme référence la méthode manuelle.....	75
Tableau 22 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #1 et la méthode manuelle.....	77
Tableau 23 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #2 et le BC-6200 #1	81
Tableau 24 : Limite de détection et limite de quantification calculées (BC-6200 #1).....	85
Tableau 25 : Résultats de la contamination inter-échantillons (BC-6200 #1 et BC-6200 #2)	85
Tableau 26 : Résultats de la stabilité (BC-6200 #1).....	87
Tableau 27 : Résultats de la stabilité (BC-6200 #2).....	88

Tableau 28 : Caractéristiques des échantillons étudiés positifs en Anatomopathologie.....	89
Tableau 29 : Résultats de la répétabilité pour les liquides de DPCA (BC-6200 #1)	91
Tableau 30 : Résultats de la répétabilité pour les liquides de DPCA (BC-6200 #2)	92
Tableau 31 : Validation de l'automate BC-6200 #1 pour le diagnostic de péritonite avec comme référence la méthode manuelle pour les liquides de DPCA.....	92
Tableau 32 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #1 et la méthode manuelle pour les liquides de DPCA	93
Tableau 33 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #2 et le BC-6200 #1 pour les liquides de DPCA	95
Tableau 34 : Résultats de la stabilité pour les liquides de DPCA (BC-6200 #1 et BC-6200 #2)	97
Tableau 35 : Estimation du nombre de liquides analysés au CHAN sur un an.....	98

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
AUC : Area Under Curve (aire sous la courbe)
BF : BodyFluid™
CH : Centre Hospitalier
CHAN : Centre Hospitalier Agen-Nérac
CIQ : Contrôle Interne de Qualité
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CV : Coefficient de Variation
DIFF : Formule leucocytaire
DIQ : Distance Interquartile
DPA : Dialyse Péritonéale Automatisée
DPCA : Dialyse Péritonéale Continue Ambulatoire
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
EO-BF : Eosinophil cell - BodyFluid™
ERP : Erythrocytes, Réticulocytes, Plaquettes
FL : Fluorescence Light (émission de fluorescence)
FORM : Formulaire
FS : Forward Scatter (diffusion frontale de la lumière)
GB : Globule Blanc
GB-BF : Globule Blanc - BodyFluid™
GR : Globule Rouge
GR-BF : Globule Rouge - BodyFluid™
GR-BF(S) : Globule Rouge - BodyFluid™ (paramètre de recherche)
GTA : Guide Technique d'Accréditation
HB : Hémoglobine
HF-BF : High Fluorescence - BodyFluid™
IC : Intervalle de Confiance
INF : Document d'information
IRC : Insuffisance Rénale Chronique
ISLA : Infection Spontanée du Liquide d'Ascite

ISO : Organisation Internationale de Normalisation
LA : Leucémie Aigüe
LAL : Leucémie Aigüe Lymphoïde
LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde
LBM : Laboratoire de Biologie Médicale
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LCS : Liquide Cérébro-Spinal
LDH : Lactate Déshydrogénase
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
LY-BF : Lymphocyte cell - BodyFluid™
MGG : May-Grünwald Giemsa
MN : Cellules mononucléées
MO-BF : Monocyte cell - BodyFluid™
NEU-BF : Neutrophil cell - BodyFluid™
NFS : Numération Formule Sanguine (hémogramme)
PLT : Plaquette
PMN : Cellules polynucléées
PNE : Polynucléaire Eosinophile
PNB : Polynucléaire Basophile
PNN : Polynucléaire Neutrophile
RBC : Red Blood Cell (globule rouge)
REF : Document de référence
ROC : Receiver Operating Characteristic
SFBC : Société Française de Biologie Clinique
SH : Santé Humaine
SIL : Système d'Information de Laboratoire
SNC : Système Nerveux Central
SS : Side Scatter (diffusion latérale de la lumière)
TC-BF : Total Cell - BodyFluid™
WNB : Leucocytes, érythroblastes, polynucléaires basophiles

Introduction

L'analyse des liquides biologiques de ponction en laboratoire hospitalier fournit des informations précieuses aux cliniciens pour le diagnostic et la prise en charge de nombreuses pathologies telles que les infections du liquide d'ascite, les épanchements pleuraux, les méningites, les péritonites bactériennes chez les patients en dialyse péritonéale, les cancers...

Concernant la partie cytologique, deux examens sont réalisés au laboratoire de Biologie Médicale : la numération cellulaire et l'examen morphologique des cellules. La microscopie optique manuelle est toujours considérée aujourd'hui comme la technique de référence (« gold standard ») pour l'analyse des liquides, mais peut être un processus difficile et chronophage. En effet, le comptage optique en chambre de comptage et l'examen microscopique des cellules après coloration spécifique requièrent du personnel compétent souvent spécialisé (techniciens de laboratoire et biologistes médicaux). Ces techniques manuelles présentent des inconvénients majeurs : durée de l'analyse, variabilité inter-opérateur, imprécision, reproductibilité, performance... (1).

Dans ce contexte, il paraît légitime et intéressant de mettre en place une analyse cytologique automatisée des liquides biologiques corporels. De nombreux automates d'Hématologie cellulaire peuvent analyser ces liquides. On ne peut cependant pas utiliser tels quels ces automates prévus pour l'analyse sanguine pour l'étude des liquides biologiques. En effet, ces derniers ne présentent pas les mêmes caractéristiques que le sang : présence de cellules particulières (cellules mésothéliales, macrophages, cellules néoplasiques...), cellularité moindre, matrice extra-cellulaire différente (2).

Plusieurs fabricants d'appareils d'Hématologie cellulaire ont donc adapté les technologies existantes en créant des modes spécifiques « Liquides Biologiques » (ou BF : BodyFluid™) avec de nouvelles règles d'expertise, par cytométrie en flux. Les plus représentés sur le marché en France en 2020 sont les automates Sysmex® (séries XN, XE, XT), Mindray® (BC-6800 et BC-6200) et Beckman Coulter® (DxH 600 et DxH 800). Les instruments Horiba®, Abbott® et Siemens® proposent également l'analyse de ces liquides. Certains systèmes d'analyse urinaire permettent l'étude des liquides biologiques (la série UF de Sysmex® et la série iQ200 de Beckman Coulter®). Les microscopes automatisés peuvent déterminer leur formule, par analyse d'images (DM 9600 et DM 1200 de Siemens®) (3).

Les avantages potentiels de l'automatisation résident dans l'amélioration de l'exactitude, de la précision, de l'efficacité et de la rentabilité du laboratoire.

L'automate BC-6200, fabriqué par Mindray® (Mindray, Shenzhen, Chine) et distribué en France par la société Menarini® (A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L., Rungis, France), est un analyseur d'Hématologie cellulaire capable, par son mode BF, d'analyser les liquides suivants : liquides d'ascite, liquides pleuraux et liquides céphalo-rachidiens.

Notre objectif principal était d'évaluer les performances analytiques de l'automate BC-6200 pour l'analyse des liquides biologiques en routine au sein du laboratoire HOSPILAB47 du Centre Hospitalier Agen-Nérac (CHAN).

Les objectifs secondaires de ce travail étaient de déterminer, d'une part, si les performances du BC-6200 étaient satisfaisantes pour analyser les liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA), matrice non validée par le fournisseur, et d'autre part, si la mise en place de cette technique automatisée permettait d'améliorer le service rendu par le laboratoire HOSPILAB47.

I. Généralités

I.1. Liquides biologiques corporels humains

L'organisme comporte plusieurs cavités internes, pouvant être virtuelles, où les liquides biologiques vont s'accumuler et se modifier au cours de phénomènes pathologiques locaux et généraux. L'analyse biologique correcte de ces liquides de ponction est un élément clé pour poser rapidement et de façon définitive un diagnostic précis. Plusieurs types d'analyses sont réalisés au laboratoire de Biologie Médicale : analyses cytologiques, hématologiques, microbiologiques, biochimiques, sérologiques... Le prélèvement de ces liquides est toujours invasif et doit s'effectuer dans des conditions stériles. Les urines, liquides les plus fréquemment analysés au laboratoire, les liquides articulaires et les liquides péricardiques ne sont pas traités dans cette étude. Nous nous sommes intéressés aux liquides d'ascite, aux liquides pleuraux, aux liquides céphalo-rachidiens (LCR) et aux liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA).

I.1.1. Liquide d'ascite ou liquide péritonéal

I.1.1.1. Physiopathologie

L'ascite est définie par la présence d'un épanchement liquidien sérofibrineux non hémorragique dans la cavité péritonéale. Le terme « ascite » vient du grec « askos », traduit par sac ou bagage (4). Sa principale cause est la cirrhose dans les pays industrialisés ; environ 85 % des malades ayant une ascite ont une cirrhose (5). Environ 50 % des malades atteints de cirrhose compensée développent une ascite dans les dix ans qui suivent le diagnostic (6). L'apparition d'une ascite marque un tournant évolutif dans l'évolution de la maladie hépatique avec une mortalité de 30 à 50 % au cours de l'année qui suit la première poussée d'ascite (5). L'ascite peut également être secondaire à une carcinose péritonéale (cancer de l'ovaire, tumeurs digestives), à une tuberculose péritonéale ou à d'autres causes (7).

On distingue deux formes d'ascite. Les ascites avec hypertension portale se caractérisent par la présence d'un transsudat, liquide séreux suintant du péritoine non altéré, en raison de phénomènes de stase sous-jacents (hypertension portale ou hypoalbuminémie), la résorption du liquide est diminuée. Ce dernier est pauvre en protéides, souvent aussi en cellules. On compte en général dans le liquide moins de 1000 leucocytes par millimètre cube ou microlitre (mm^3 ou μL). Les transsudats sont retrouvés principalement dans les cas de cirrhose, d'insuffisance cardiaque et de métastases hépatiques. En revanche, la pression portale est normale dans le cas d'exsudat, liquide séreux suintant du péritoine altéré par un processus inflammatoire (augmentation de la production de liquide). Le liquide est riche en protéides, souvent aussi en cellules (plus de 1000 leucocytes par mm^3). La cause est alors extérieure : ascite maligne, tuberculose péritonéale, ascite pancréatique, ascite chyleuse... (8).

Les principales complications de l'ascite sont les infections spontanées du liquide d'ascite (ISLA) et les complications mécaniques (dyspnée et hernies pariétales) (7).

L'infection spontanée du liquide d'ascite (ISLA) est une complication fréquente et grave chez les malades atteints de cirrhose. Elle survient chez 8 à 25 % des malades hospitalisés ayant une ascite (9). L'ISLA est asymptomatique dans 10 % des cas. Dans 25 % des cas, il n'existe pas de signes biologiques généraux (8). La porte d'entrée digestive est la porte d'entrée principale. Le mécanisme le plus fréquemment évoqué dans la pathogénicité de

l'infection du liquide d'ascite est une translocation de bactéries d'origine intestinale à travers la paroi digestive dans les canaux et les ganglions lymphatiques mésentériques, puis le passage de ces bactéries dans le courant sanguin avec colonisation secondaire de l'ascite. Ce phénomène de translocation intéresse essentiellement les bacilles Gram négatif (majoritairement *Escherichia coli*) et très peu les bactéries anaérobies. Ceci explique la fréquence des infections du liquide d'ascite dues aux bacilles Gram négatif et leur caractère monomicrobien habituel. D'autres mécanismes sont également possibles : une bactériémie secondaire lors d'une hémorragie digestive ou une contamination lors d'un geste médical traumatique. D'autres portes d'entrée sont rarement mises en cause : transfallopienne (femmes porteuses de stérilet), urinaire et pulmonaire (9).

I.1.1.2. Ponction d'ascite

Les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés au cours de l'ascite sont une augmentation du volume de l'abdomen, le plus souvent indolore, souvent associée à des œdèmes des membres inférieurs, à une prise de poids et à un ballonnement abdominal (8). L'ascite est détectable cliniquement lorsque son volume atteint 2,5 litres. A l'examen clinique, on retrouve une peau tendue et lisse, une matité mobile à la percussion, les signes du flot (transmission transabdominale liquidienne d'une pression controlatérale) et du glaçon (choc en retour dû à la remontée du foie au sein du liquide d'ascite lorsque le médecin donne une impulsion sur la paroi abdominale) (10). L'échographie est l'examen le plus sensible pour poser le diagnostic d'ascite, notamment pour les ascites de faible volume (11).

La ponction d'ascite se fait au lit du malade, en position décubitus dorsal, au niveau de la fosse iliaque gauche, plus précisément au niveau du tiers externe de la ligne joignant l'ombilic à l'épine iliaque antéro-supérieure gauche, en pleine matité. Une anesthésie locale peut être utile chez les patients redoutant le geste (7). La ponction peut éventuellement être guidée par échographie (8). Ce geste n'est pas contre-indiqué par la présence de troubles importants de la coagulation (5). Les complications surviennent dans moins de 1 % des cas (hématome de la paroi abdominale ou fuite d'ascite post-ponction). Les complications plus sérieuses à type d'hémopéritoine ou de perforation de l'intestin par l'aiguille à ponction sont exceptionnelles (moins de 1/1000 des ponctions) (12). La ponction d'ascite est réalisée à visée diagnostique, mais également à visée thérapeutique (ponction évacuatrice).

Le liquide s'écoule naturellement. Il est recueilli dans trois flacons stériles dont l'un devrait contenir un anticoagulant (EDTA ou citrate). Deux flacons d'hémocultures (aérobie et anaérobie) sont remplis avec chacun 5 à 10 millilitres (mL) d'ascite pour la culture bactérienne (ascitoculture). L'acheminement au laboratoire doit être rapide (le délai idéal est inférieur à 30 minutes) (8).

L'aspect macroscopique est rapidement mis en évidence et permet de distinguer les transsudats des exsudats. Les transsudats peuvent être jaune citrin clair, lactescents ou troubles ; les exsudats sont jaune citrin, orangés, ambrés, lactescents ou hémorragiques. Il donne ainsi une première orientation diagnostique (8).

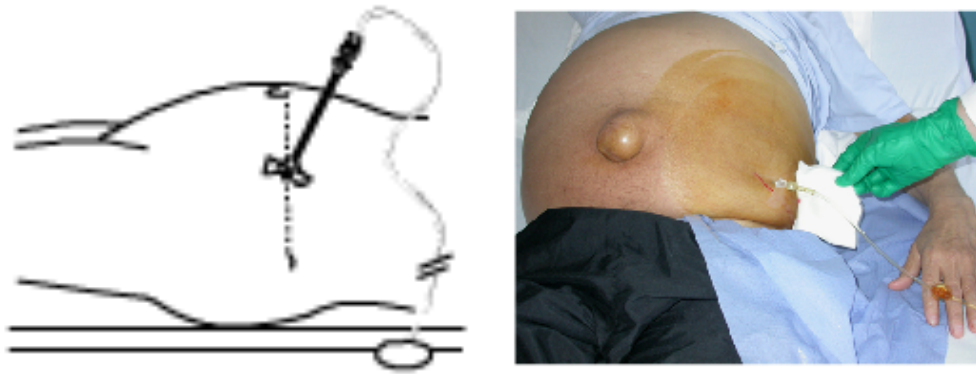


Figure 1 : Illustration d'une ponction d'ascite

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

I.1.1.3. Cytologie

Les cellules habituellement observées sont les cellules mésothéliales. Elles tapissent l'intérieur de la cavité péritonéale en une couche monocellulaire ; ce sont des cellules autochtones. Elles sont de petite taille au sein du revêtement mésothélial : entre 5 à 7 micromètres (μm). Elles augmentent de volume dans le liquide d'ascite, lorsqu'elles se détachent de leur support histologique, en réponse à une agression. Elles mesurent alors 15 à 25 μm de diamètre. Elles sont de forme arrondie avec un contour net. Le rapport nucléocytoplasmique est souvent faible. Leur cytoplasme est finement granulaire et basophile. Leur noyau est unique, volumineux et rond, aux contours lisses, avec parfois un petit nucléole. La chromatine est réticulée avec une condensation homogène (8).

Au cours des épanchements, les cellules mésothéliales peuvent subir des transformations importantes. On peut alors distinguer plusieurs types de cellules mésothéliales : les cellules mésothéliales en transformation histioïde (vacuolisation du cytoplasme avec parfois des images de phagocytose), les cellules en « bague à chaton » (fusion des vacuoles cytoplasmiques avec noyau rejeté à la périphérie) et les syncytium de cellules mésothéliales (fusion de plusieurs cellules mésothéliales qui donnent naissance à une cellule multinucléée, parfois difficile à différencier d'un amas métastatique) (8).

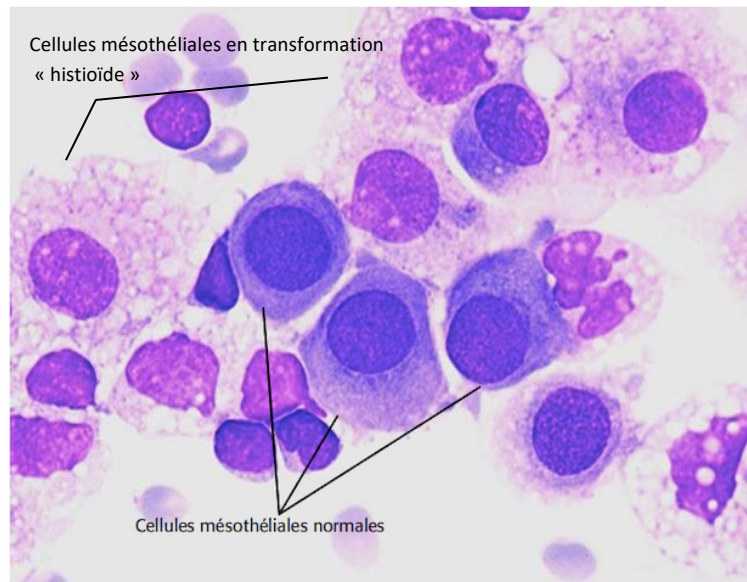


Figure 2 : Cellules mésothéliales non altérées et en transformation « histioïde » dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

Les autres cellules pouvant être observées dans un liquide d'ascite sont d'origine extérieure à la cavité péritonéale. On retrouve des polynucléaires neutrophiles (PNN), des lymphocytes, des monocytes, des macrophages, plus rarement des polynucléaires éosinophiles (PNE), des polynucléaires basophiles (PNB), des plasmocytes... Ces cellules ont un aspect similaire à leur aspect sur frottis sanguin.

Les liquides peuvent être classés en fonction de leur population cellulaire dominante (8).

- **Ascites à polynucléaires neutrophiles (PNN)**

Chez un cirrhotique, la présence d'un taux de PNN supérieur ou égal à 250 par mm^3 dans le liquide d'ascite oriente vers une infection du liquide et impose la mise sous traitement antibiotique probabiliste avant les résultats bactériologiques et l'identification bactérienne. Le taux de protéines totales montre le plus souvent un transsudat. Des frottis avec prédominance de PNN sont également retrouvés au cours des pancréatites (taux de PNN supérieur ou égal à 250 par mm^3 , mais avec une formule panachée et un exsudat) et au cours des hépatocarcinomes (taux de PNN inférieur à 250 par mm^3 avec un frottis monotone à PNN).

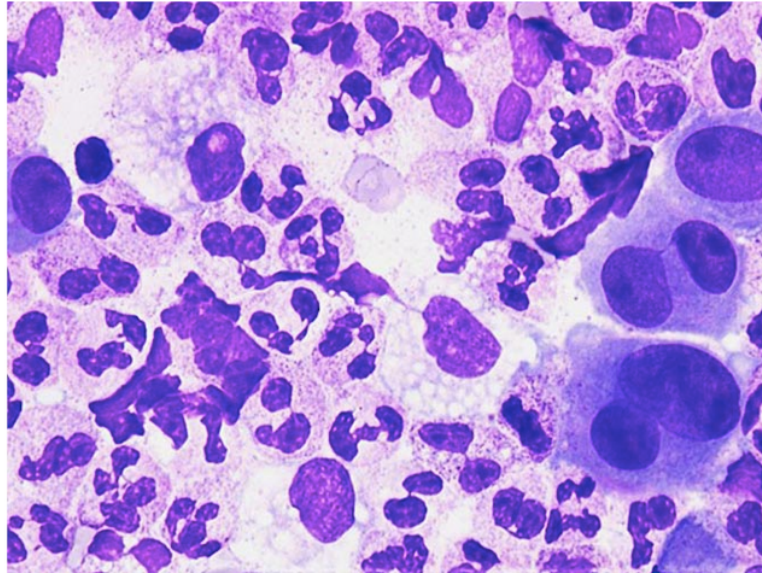


Figure 3 : Ascite à polynucléaires neutrophiles (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

- **Ascites à polynucléaires éosinophiles (PNE)**

La formule est composée de plus de 10 % de PNE. L'étiologie la plus fréquente est la gastro-entérite à éosinophiles. Nausées, vomissements, diarrhées et douleurs abdominales en sont les manifestations cliniques les plus fréquentes. Le taux d'éosinophiles dans l'ascite est supérieur à 90 % des leucocytes. Une hyperéosinophilie sanguine y est associée dans 80 % des cas. Les autres étiologies sont les suivantes : le syndrome hyperéosinophilique, les lymphomes abdominaux, les parasitoses péritonéales (hydatidose, anguillulose) et la dialyse péritonéale.

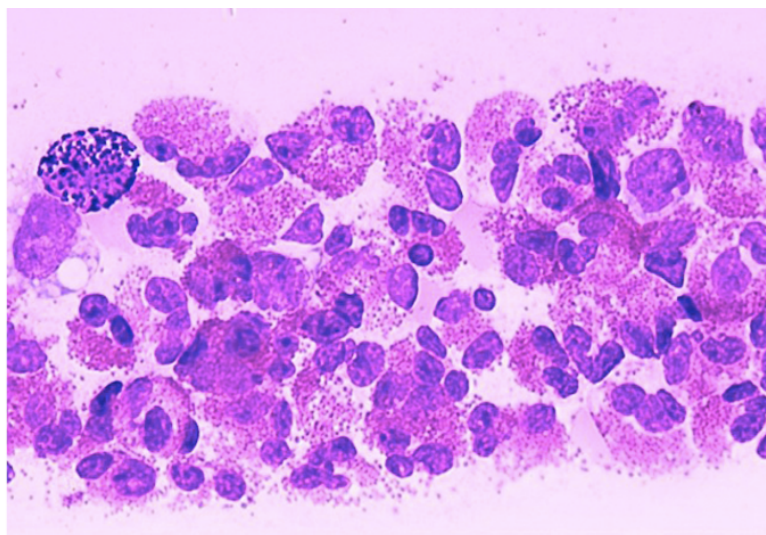


Figure 4 : Ascite à polynucléaires éosinophiles (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

- **Ascites à lymphocytes d'aspect normal**

Un exsudat riche en lymphocytes (taux supérieur à 70 %) peut être en faveur d'une tuberculose péritonéale ; les cultures sont souvent décevantes. La tuberculose péritonéale est responsable de 2 % des ascites. Les transsudats peuvent également être riches en lymphocytes sans signification particulière.

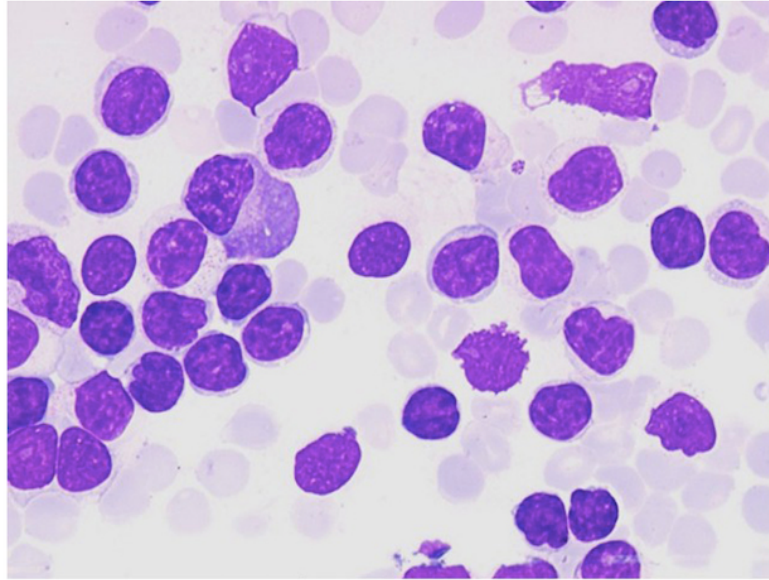


Figure 5 : Ascite lymphocytaire (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

- **Ascites à cellules lymphomateuses**

Le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin et les autres lymphomes non hodgkiniens peuvent diffuser dans la cavité péritonéale. Les cellules lymphomateuses retrouvées dans le liquide d'ascite présentent des caractéristiques proches de celles présentes dans le sang. La cyto centrifugation pouvant parfois altérer de façon significative la morphologie des cellules, l'examen anatomopathologique et/ou l'immunophénotypage des lymphocytes sont des examens complémentaires indispensables au diagnostic.

Les cellules de Burkitt présentent une basophilie marquée du cytoplasme. La forme du noyau est souvent irrégulière. Ces cellules peuvent parfois être disposées en amas. La présence de mitoses sur le frottis est fréquente.

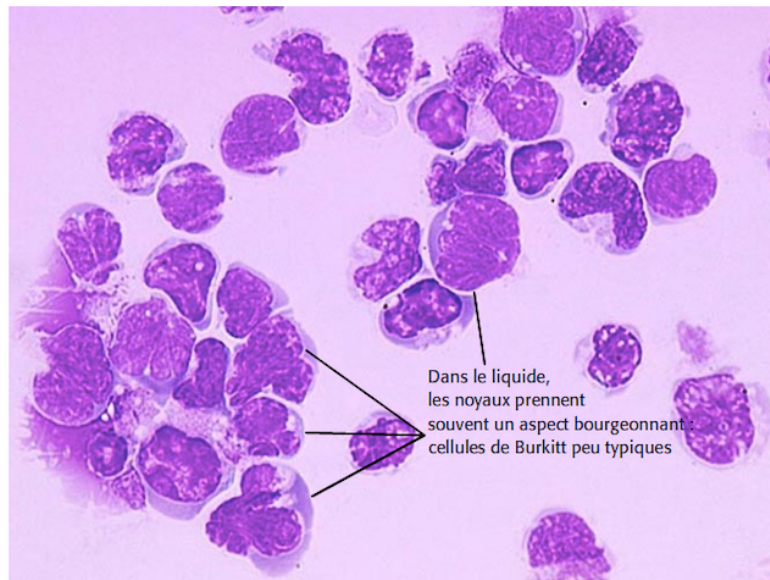


Figure 6 : Cellules de Burkitt dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

L'ascite est le plus souvent observée au cours d'une maladie de Hodgkin évoluée. L'atteinte péritonéale du lymphome hodgkinien est suggérée par la présence de cellules isolées de grande taille (40 à 200 μm) appelées cellules de Reed-Sternberg. Le noyau est dystrophique, boursoufflé voire polylobé. La chromatine est réticulée parfois plus condensée à certains endroits du noyau. Le noyau peut présenter des nucléoles marqués, parfois nombreux. Le cytoplasme est gris-bleu, aux limites mal définies.

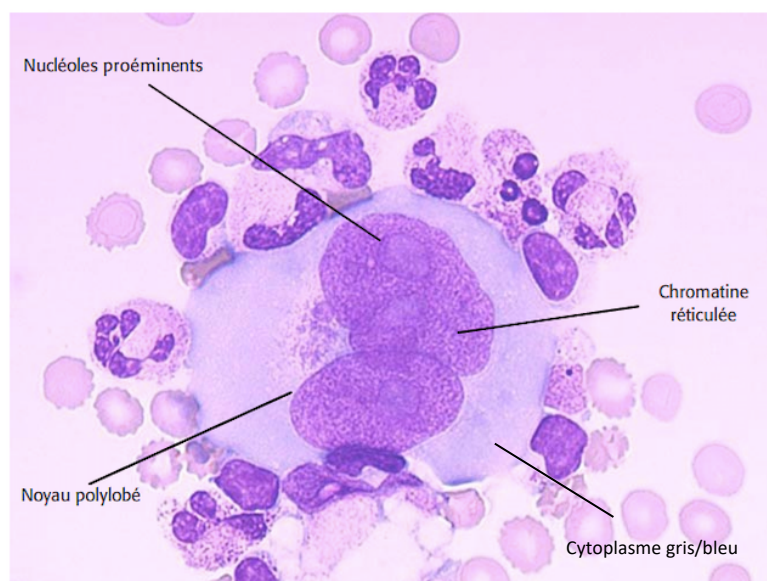


Figure 7 : Cellule de Reed-Sternberg (maladie de Hodgkin) dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

La morphologie des cellules lymphomateuses des autres lymphomes non hodgkiniens (LNH) est semblable à celles des cellules rencontrées dans les ganglions. La cellularité est souvent importante et les cellules sont disposées de façon homogène dans le liquide (absence d'amas).

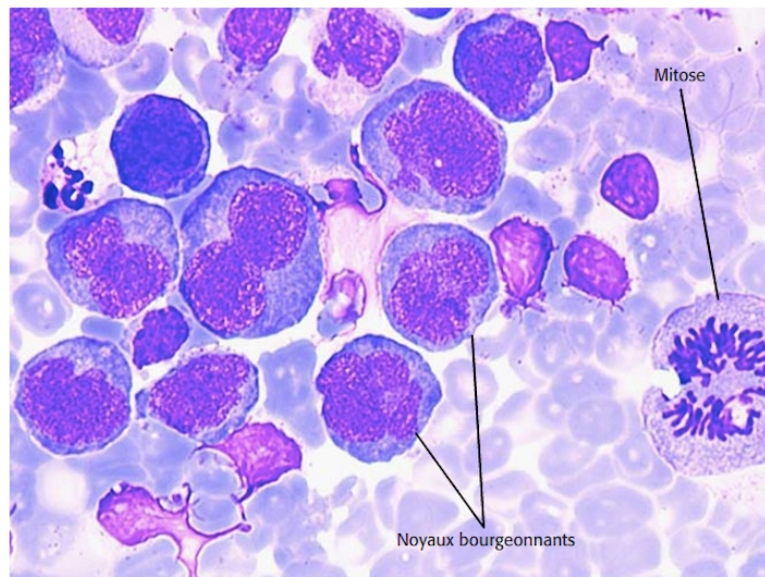


Figure 8 : Lymphome B dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

- **Ascites avec prédominance de cellules mésothéliales**

Elles se rencontrent au cours des transsudats (cirrhose, insuffisance cardiaque). Les cellules mésothéliales se détachent de la paroi péritonéale et se retrouvent dans le liquide d'ascite. Du fait de la chronicité de ces épanchements, les cellules mésothéliales peuvent apparaître « irritées » ou avoir un aspect histioïde, c'est-à-dire présentant une vacuolisation du cytoplasme, atteignant parfois une morphologie presque néoplasique.

Le mésothéliome est une cause rare d'ascite maligne. Il est lié à une exposition à l'amiante dans la majorité des cas. La présence, au faible grossissement, de gros amas de cellules d'aspect mésothélioïde (aspect de « baie ») fera suspecter le diagnostic.

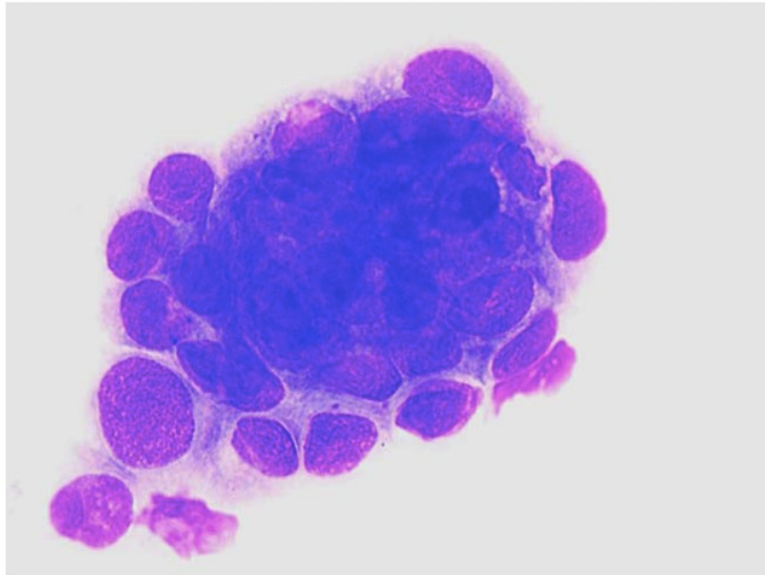


Figure 9 : Mésothéliome dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

- **Ascites à cellules métastatiques**

La carcinose péritonéale est la deuxième grande cause d'ascite après la cirrhose. La recherche de cellules anormales est positive dans environ 60 % des carcinoses péritonéales. On distingue l'adénocarcinome (type cellulaire le plus fréquemment rencontré) et le carcinome épidermoïde. Les origines les plus fréquentes d'adénocarcinome sont l'ovaire, le sein, le pancréas, le colon et l'estomac. Les cellules d'adénocarcinome sont généralement regroupées en amas et de très grande taille. Le rapport nucléo-cytoplasmique est souvent élevé. Le noyau est de forme et de taille très variables (anisocaryose), aux contours irréguliers, avec un ou plusieurs gros nucléoles. La chromatine est souvent fine, avec une condensation inhomogène. Les origines les plus fréquentes de carcinome épidermoïde sont l'œsophage, le poumon, le vagin et l'utérus. Les cellules sont dans ce cas isolées, elles peuvent également former des amas peu cohésifs. Leur rapport nucléo-cytoplasmique est souvent élevé. Le noyau présente une forme et une taille très variables avec des contours irréguliers ; les cellules sont parfois multinucléées. La chromatine est assez dense avec une condensation inhomogène. Un nucléole est rarement présent. Le cytoplasme est basophile, souvent inhomogène dans la cellule. Dans tous les cas, les cellules métastatiques sont de taille bien supérieure aux autres éléments.

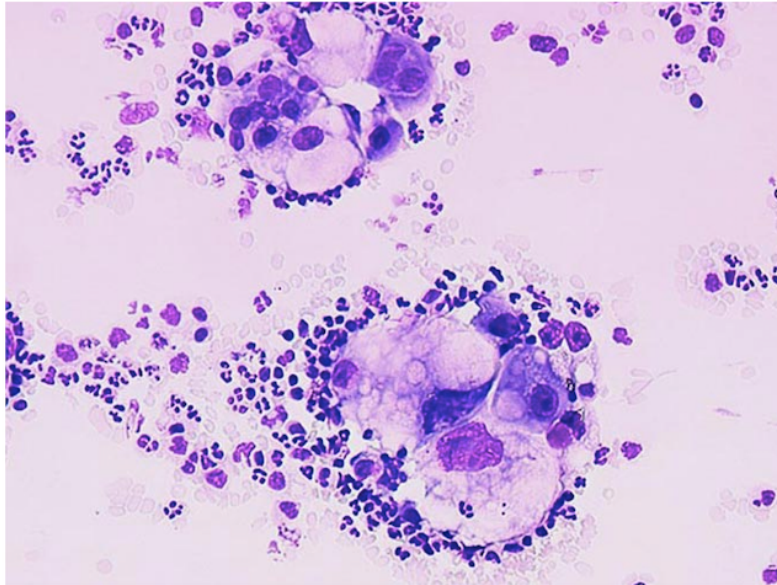


Figure 10 : Adénocarcinome ovarien dans un liquide d'ascite (Objectif 10)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

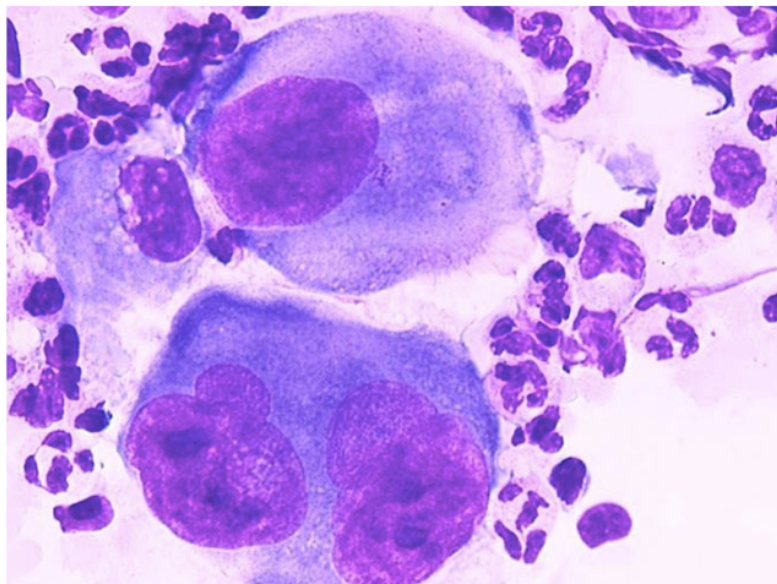


Figure 11 : Adénocarcinome ovarien dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

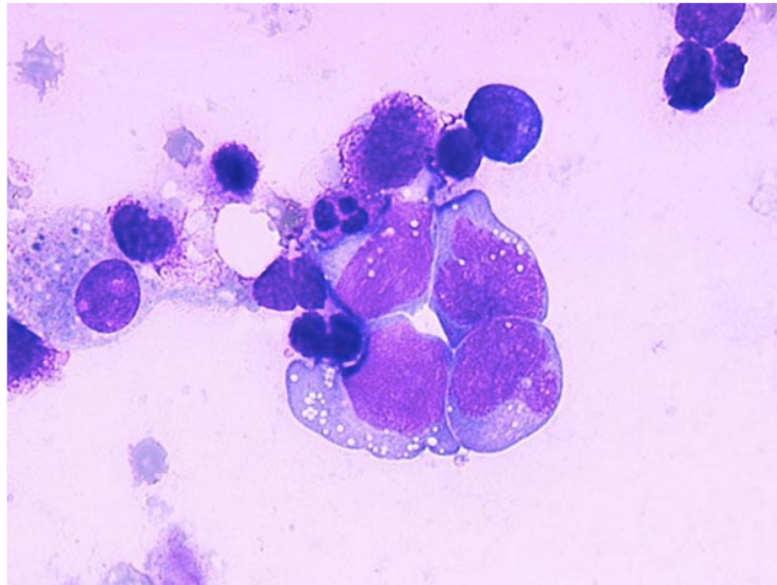


Figure 12 : Carcinose épidermoïde de l'œsophage dans un liquide d'ascite (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

I.1.1.4. Autres analyses biologiques

La biochimie du liquide d'ascite comprend au minimum le dosage des protides, et plus rarement le dosage de l'albumine. Un taux de protides supérieur ou égal à 25 grammes par litre (g/L) signe un exsudat, un taux inférieur à 25 g/L un transsudat, rencontré essentiellement au cours des cirrhoses (11).

D'autres analyses peuvent être plus rarement prescrites : le dosage des triglycérides, le dosage de la lipase et le dosage du cholestérol. En effet, un taux de triglycérides supérieur à 1,1 g/L ou 1,2 millimole par litre (mmol/L) définit l'ascite chyleuse, un taux élevé de lipase est en faveur d'une origine pancréatique et un taux de cholestérol supérieur ou égal à 1,1 mmol/L ou 0,43 g/L évoque fortement une ascite maligne (8).

Pour la Bactériologie, un examen direct avec coloration de Gram est effectué systématiquement ainsi que la mise en culture en milieu conventionnel, mais aussi dans des flacons d'hémoculture, prélevés au lit du malade.

En cas de suspicion de cellules tumorales dans le liquide d'ascite, ce dernier doit être adressé au laboratoire d'Anatomopathologie. En cas d'infiltrat lymphoïde suspect, l'immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux permettra de connaître rapidement la nature clonale ou non des cellules observées, en attendant la confirmation anatomopathologique.

I.1.2. Liquide pleural

I.1.2.1. Physiopathologie

La plèvre est une membrane séreuse qui recouvre la partie supérieure de la cavité thoracique (les poumons, la cage thoracique, le diaphragme et le médiastin). Elle est composée de deux feuillets : le feuillet viscéral, en contact avec le parenchyme pulmonaire, et

le feuillet pariétal, qui tapisse la cavité thoracique. L'espace entre les deux feuillets est la cavité pleurale, un espace quasi virtuel. Le rôle de cette cavité est de répartir les pressions intrathoraciques lors de l'inspiration. Le fluide pleural est constitué et résorbé au niveau du feuillet pariétal. Son rôle est de faciliter le glissement des deux feuillets pleuraux l'un contre l'autre. Sa quantité normale est de 2 à 5 mL par hémithorax (8).

Une pleurésie (ou épanchement pleural) est une accumulation excessive de liquide pleural entre les feuillets constituant la plèvre, elle est due à un déséquilibre entre production et résorption du liquide (8).

On distingue deux formes de pleurésie. Les pleurésies à plèvre normale se caractérisent par la présence d'un transsudat, liquide séreux suintant de la plèvre non altérée, en raison de phénomènes de stase sous-jacents. Le liquide est pauvre en protéides, souvent aussi en cellules (moins de 1000 leucocytes par mm^3). Les trois causes principales sont l'insuffisance cardiaque, la cirrhose et le syndrome néphrotique. A l'inverse, les pleurésies à plèvre pathologique se caractérisent par la présence d'un exsudat, liquide séreux suintant de la plèvre altérée par un processus inflammatoire ou tumoral ; le liquide est riche en protéides, souvent aussi en cellules (plus de 1000 leucocytes par mm^3). Les causes les plus fréquentes sont les néoplasies, la tuberculose, les pneumonies bactériennes (épanchements parapneumoniques), les pneumonies virales et l'embolie pulmonaire (8).

Les pleurésies bactériennes sont une des causes principales d'épanchement pleural. On estime que 40 à 50 % des pneumopathies bactériennes se compliquent d'un épanchement pleural. La propagation à partir d'un foyer pulmonaire est la porte d'entrée la plus fréquente (50 à 65 % des cas). La propagation par inoculation directe lors d'une chirurgie thoracique ou d'une ponction pleurale (10 à 15 % des cas) et la propagation à partir d'un foyer sous-phrénique (1 à 5 % des cas) sont plus rares. On distingue les pleurésies parapneumoniques simples ou non compliquées (réaction pleurale à une infection pulmonaire sans bactérie dans le liquide pleural ni argument biologique en faveur d'un métabolisme local important), les pleurésies parapneumoniques compliquées où l'on retrouve la présence de bactéries dans le liquide pleural (métabolisme local important) et les pleurésies purulentes ou emphysemes (infections pleurales avec pus franc à la ponction). Les principales bactéries pathogènes dans les pleurésies infectieuses sont : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, les streptocoques oraux et *Pseudomonas aeruginosa*. Une antibiothérapie probabiliste doit être mise en place avant les résultats bactériologiques (8).

I.1.2.2. Ponction pleurale

Les signes cliniques des épanchements pleuraux sont une douleur basithoracique augmentant à l'inspiration, une dyspnée proportionnelle à l'importance de l'épanchement et une toux sèche aux changements de position. L'examen clinique révèle un trepied pleurésique, c'est-à-dire une abolition de la transmission des vibrations vocales, une matité franche à la percussion et une diminution ou une abolition du murmure vésiculaire (silence auscultatoire) (8). L'épanchement peut être unilatéral (pathologie pleurale ou pulmonaire) ou bilatéral (atteinte systémique). Ces signes d'appel imposent la réalisation d'une radiographie thoracique et d'une ponction pleurale (13).

La ponction pleurale est effectuée en pleine matité, sous anesthésie locale, au niveau du bord supérieur de la côte inférieure de l'espace intercostal (13). Elle peut être guidée par échographie. La ponction pleurale est utile pour le diagnostic (ponction exploratrice) mais aussi pour soulager le patient (ponction évacuatrice).

Le liquide est recueilli dans trois flacons dont l'un devrait contenir un anticoagulant. Deux flacons d'hémocultures (aérobie et anaérobie) sont remplis avec chacun 5 à 10 mL de liquide pour la culture bactérienne. L'acheminement au laboratoire doit être rapide (le délai idéal est inférieur à 30 minutes) (8).

L'aspect macroscopique est la première étape dans la distinction entre transsudats et exsudats. Les transsudats sont le plus souvent jaune citrin ou légèrement hémorragiques. Les exsudats peuvent être jaune citrin, légèrement hémorragiques, sanglants, troubles, purulents ou lactescents (8). Un liquide purulent oriente vers une infection, un liquide hémorragique oriente vers un hémothorax ou un épanchement néoplasique, un liquide lactescent oriente vers un chylothorax (13).

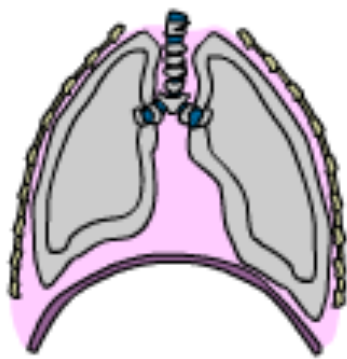


Figure 13 : Illustration d'une ponction pleurale

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

I.1.2.3. Cytologie

Les cellules retrouvées dans les liquides pleuraux sont les mêmes que celles retrouvées dans les liquides d'ascite. Les cellules mésothéliales présentent les mêmes caractéristiques.

Les liquides peuvent être classés en fonction de leur population cellulaire dominante (8).

- **Pleurésies à polynucléaires neutrophiles (PNN)**

Une majorité de PNN signe un phénomène aigu, résultant d'un processus inflammatoire ou infectieux. Cytologiquement, on retrouve un taux de leucocytes supérieur à 1000 par mm^3 avec plus de 50 % de PNN dans les pleurésies bactériennes. Une antibiothérapie initiale probabiliste est instaurée le plus rapidement possible.

- **Pleurésies à polynucléaires éosinophiles (PNE)**

La formule est composée de plus de 10 % de PNE. Ces pleurésies ne concernent que 10 % des épanchements pleuraux. Leur présence n'est pas spécifique d'une pathologie. Les étiologies les plus fréquentes sont l'hémothorax et le pneumothorax, mais également les néoplasies, les pleurésies parapneumoniques, l'insuffisance cardiaque, la cirrhose et l'embolie

pulmonaire. Des pleurésies à PNE peuvent être provoquées également par certains médicaments ainsi que par des ponctions pleurales répétées.

- **Pleurésies à lymphocytes d'aspect normal**

Elles sont définies par un taux de lymphocytes supérieur à 50 %. Il faut penser en premier lieu à une tuberculose (leucocytes compris entre 1000 et 10000 par mm³). Les pleurésies tuberculeuses se caractérisent par une prédominance de lymphocytes supérieurs à 70 % dans 95 % des cas et par un frottis pauvre en cellules mésothéliales qui ne dépassent pas 5 % du nombre total de cellules. On les retrouve également dans les pleurésies virales et dans les pneumonies à chlamydia ou à mycoplasme.

- **Pleurésies à cellules lymphomateuses**

Les lymphocytes représentent aussi plus de 50 % de la formule. Différents types de syndromes lymphoprolifératifs existent : les lymphomes non hodgkiniens (LNH) (lymphome folliculaire, lymphome lymphoblastique, lymphome de Burkitt, lymphome pleural primitif...), le lymphome hodgkinien, la maladie de Waldenström... Les lymphocytes présentent les mêmes caractéristiques dans le liquide pleural que dans le sang. La cyto centrifugation pouvant altérer la morphologie lymphocytaire, l'examen anatomopathologique et/ou l'immunophénotypage des lymphocytes sont indispensables.

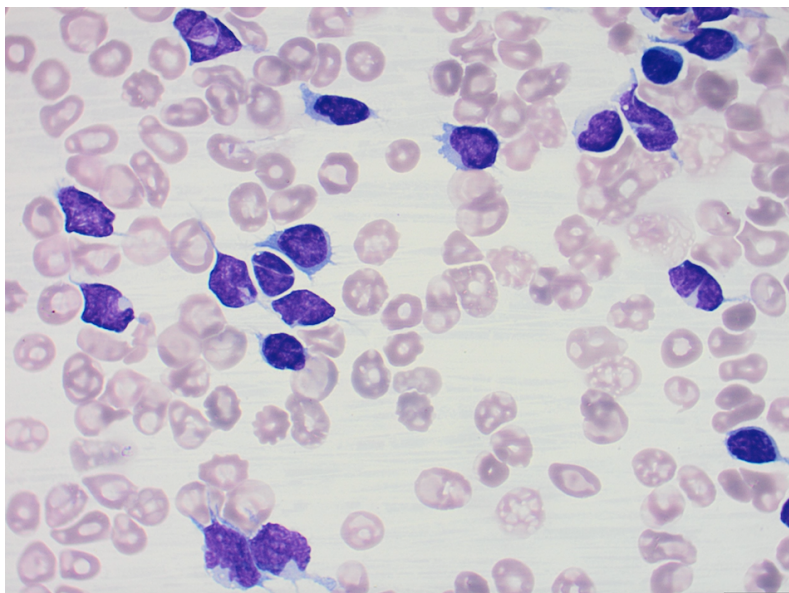


Figure 14 : LNH folliculaire dans un liquide pleural (Objectif 50)

Source : Photographie personnelle

- **Pleurésies avec prédominance de cellules mésothéliales**

On retrouve une prédominance de cellules mésothéliales essentiellement au cours des transsudats, dans le mésothéliome et dans les cas d'embolie pulmonaire. Le mésothéliome est un cancer primitif de la plèvre lié à l'amiante dans environ 70 % des cas. La sensibilité de la ponction pleurale est faible (25 à 30 %). Un frottis de mésothéliome se caractérise par la présence de gros amas de cellules mésothéliales ou plus rarement de cellules mésothéliales

dystrophiques isolées. En cas d'embolie pulmonaire, le frottis peut montrer une hyperplasie mésothéliale avec des images d'hémophagocytose.

- **Pleurésies avec cellules métastatiques**

Le type cellulaire le plus fréquent est l'adénocarcinome ; l'origine des cellules étant le poumon, le sein, l'ovaire... Dans le cas du carcinome épidermoïde, l'origine des cellules est le poumon, le larynx, le pharynx... Les cellules présentent les mêmes caractéristiques que dans le liquide d'ascite. Dans le cancer anaplasique à petites cellules pulmonaires, les cellules se présentent sous forme de petits amas ou de cellules isolées. Le noyau présente des contours irréguliers ou lisses, la chromatine est très immature avec une condensation inhomogène. Le noyau possède rarement un petit nucléole. Le cytoplasme est basophile. Le rapport nucléocytoplasmique est très élevé. Cet aspect peut poser des difficultés de diagnostic différentiel avec des blastes ou des cellules de lymphome de haut grade.

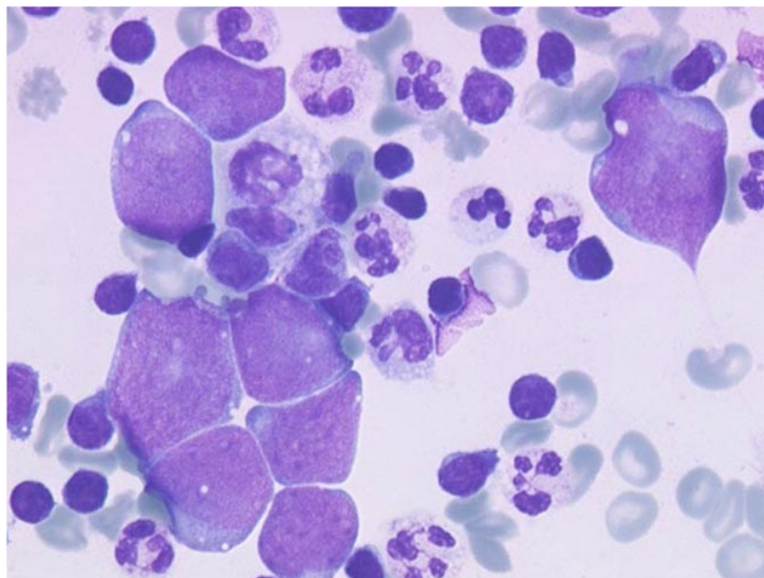


Figure 15 : Cancer anaplasique à petites cellules dans un liquide pleural (Objectif 50)

Source : Biologie des liquides d'épanchement (8)

I.1.2.4. Autres analyses biologiques

La biochimie est indispensable pour le dosage des protides pleuraux, témoins de l'augmentation de la perméabilité pleurale, et de la lactate déshydrogénase (LDH), reflet de son inflammation. Un taux de protides pleuraux supérieur ou égal à 30 g/L signe un exsudat. Les critères de Light de 1972 (14) permettent de distinguer les transsudats des exsudats ; au moins un des trois critères suivants définit un exsudat : un ratio protéines pleurales / protéines sériques supérieur ou égal à 0,5, un ratio LDH pleurales / LDH sériques supérieur ou égal à 0,6, un taux de LDH pleurales supérieur à 200 unité internationale par litre (UI/L). Les critères de Light présentent une robustesse et une précision diagnostique élevées (90 %) (15).

D'autres analyses peuvent être réalisées mais présentent peu d'intérêt : le dosage du cholestérol (chylothorax), de la lipase (pleurésie d'origine pancréatique), du glucose et du pH

(épanchement fébrile) (8). De plus, un rapport hémocrite pleural / hémocrite sanguin supérieur à 0,5 oriente vers un hémithorax vrai, plutôt que vers un contexte traumatique (13).

Pour la Bactériologie, un examen direct avec coloration de Gram est effectué systématiquement ainsi que la mise en culture en milieu conventionnel, mais aussi dans des flacons d'hémoculture, prélevés au lit du malade.

En cas de suspicion de liquide malin, le prélèvement doit être adressé au laboratoire d'Anatomopathologie. Un immunophénotypage peut aussi être réalisé en cas de doute sur des cellules d'hémapathie maligne notamment lymphoïde.

I.1.3. Liquide céphalo-rachidien

I.1.3.1. Physiopathologie

Le système nerveux central (SNC) est composé du cerveau et de la moelle épinière. Il est enveloppé par les méninges, constituées de trois membranes protectrices : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (de l'extérieur vers l'intérieur). Entre la dure-mère et l'arachnoïde, on trouve l'espace sous-dural. L'espace entre l'arachnoïde et la pie-mère est nommé espace sous-arachnoïdien (16).

Le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou liquide cérébro-spinal (LCS) est un liquide biologique transparent dans lequel baigne le système nerveux central (SNC). Le LCR est réparti dans deux espaces distincts : l'espace sous-arachnoïdien qui est un espace externe au SNC et le système ventriculaire qui est un espace situé à l'intérieur du cerveau. Il est majoritairement produit au niveau du plexus choroïdien, principalement au niveau des ventricules V1, V2 et V4, mais également au niveau des capillaires des espaces sous-arachnoïdien, spinal et péri-encéphalique et pour une faible part au niveau des vaisseaux intraparenchymateux. Il est produit par filtration et sécrétion active et est renouvelé trois fois par jour. La résorption a lieu entre les espaces sous-arachnoïdiens et le sang veineux, par différence de pression au niveau des villosités de l'arachnoïde. Il sort du cerveau pour s'écouler dans les espaces sous-arachnoïdiens via les foramens de Luschka et Magendie. Le volume total de LCR est de 140 mL chez l'adulte, 100 mL chez l'enfant de 10 ans et 50 mL chez le nourrisson. Les échanges entre le LCR et le SNC se font au niveau de la barrière méningo-encéphalique, et ceux entre le sang et le LCR au travers de la barrière hémato-méningée (17).

Le LCR présente tout d'abord une fonction mécanique, il protège le SNC contre les chocs par amortissement des mouvements, maintient le SNC dans un environnement physico-chimique constant, sert de tampon et agit comme un réservoir régulateur du volume encéphalique. Il possède également une fonction biologique (transport des hormones, nutriments, neurotransmetteurs, anticorps...), une fonction d'élimination des déchets provenant du cerveau et un rôle de nutrition du tissu nerveux (16).

I.1.3.2. Ponction lombaire

Une ponction lombaire en urgence doit être réalisée dans les situations cliniques suivantes : suspicion de méningite, d'encéphalite ou de méningo-encéphalite, suspicion d'hémorragie sous-arachnoïdienne, suspicion d'hypertension intracrânienne, suspicion d'une pathologie inflammatoire aiguë du système nerveux (encéphalomyélite aiguë disséminée, myélite, polyradiculonévrite aiguë, sclérose en plaques...), pathologie tumorale (leucémies, métastases...) (18).

Les méningites infectieuses touchent le SNC avec une atteinte limitée aux méninges par opposition aux méningo-encéphalites touchant le parenchyme cérébral. On distingue les méningites virales généralement bénignes et d'évolution spontanée favorable, les méningites fongiques, rares et le plus souvent liées à une immunodépression, et enfin les méningites bactériennes (19).

Le syndrome méningé est défini par la triade : céphalées intenses, diffuses, exagérées par la lumière (photophobie) et le bruit (phonophobie), vomissements, classiquement en jet, raideur et douleur de la nuque, majorées par le maintien des jambes en extension (signe de Brudzinski). Si on ramène les jambes, laissées en extension, sur le tronc, la tête se rejette en arrière et les céphalées augmentent ; c'est le signe de Kernig. Des troubles du comportement sont souvent associés.

Les signes cliniques les plus fréquents au cours d'une méningite carcinomateuse sont des céphalées, des troubles des fonctions supérieures (perte de la mémoire, changement de comportement, confusion, altération des fonctions cognitives...) et des troubles de la marche. L'atteinte des nerfs crâniens est dominée par une diplopie par atteinte des nerfs oculomoteurs. Des troubles multiples d'aires neurologiques non contiguës doivent faire penser à une méningite carcinomateuse.

Le prélèvement de LCR se fait habituellement par ponction lombaire dans la région lombaire basse, dans l'espace L4-L5 ou L5-S1. Exceptionnellement, chez le nouveau-né, le prélèvement peut se faire par ponction transfontanellaire ou par ponction ventriculaire directe (19). Le choix de la position assise ou allongée est laissé à l'appréciation du médecin et du patient. Une anesthésie locale peut être envisagée dans les cas prévisibles de ponction difficile. Les complications graves sont exceptionnelles. Les contre-indications formelles sont l'hypertension intracrânienne (en raison du risque d'engagement cérébral), une thrombopénie sévère avec des plaquettes inférieures à 50 Giga par litre (G/L), des troubles de la coagulation, la notion de traitement anticoagulant à dose thérapeutique (18).

Le LCR est recueilli dans trois tubes à hémolyse stériles devant chacun contenir au moins 0,5 mL pour les examens de routine (19).

Du fait de l'importance du diagnostic, de la fragilité des bactéries à tout écart de température et en raison de la lyse rapide des polynucléaires, le LCR, aussitôt prélevé, doit être acheminé au laboratoire, à l'abri du froid, le plus rapidement possible. Il s'agit toujours d'un examen d'urgence à traiter le plus rapidement possible (19).

L'examen macroscopique permet une première orientation diagnostique. Le LCR normal est limpide et classiquement dit « eau de roche ». Différents aspects pathologiques peuvent être observés : eau de riz ou trouble, xanthochromique, hématiche, voire hémorragique. En cas de ponction lombaire hémorragique, l'aspect xanthochromique du LCR après centrifugation peut témoigner d'une hémorragie méningée ancienne (19).

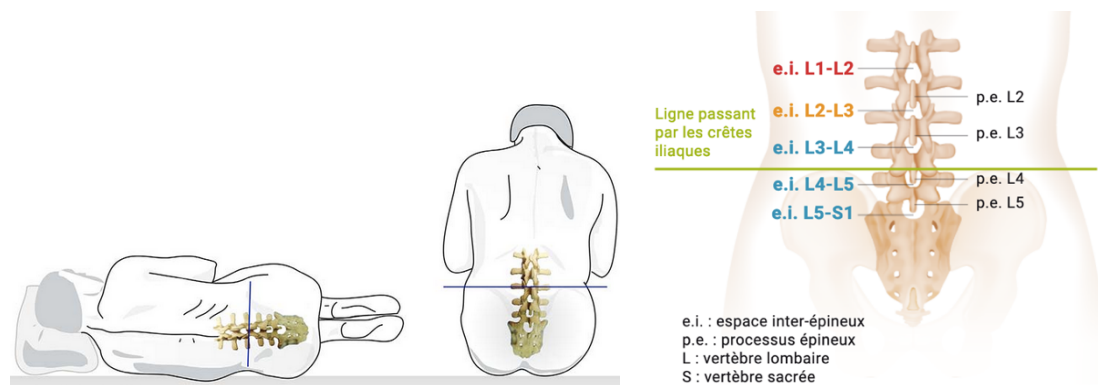


Figure 16 : Illustration d'une ponction lombaire

Source : Ponction lombaire. Modalités de réalisation et recommandations pour en limiter les effets secondaires HAS (20)

I.1.3.3. Cytologie

Le LCR est normalement stérile, sans cellules.

Les données cytologiques orientent le clinicien vers différentes hypothèses diagnostiques (19).

- **LCR avec prédominance de polynucléaires neutrophiles (PNN)**

La présence de plus de 10 éléments par mm^3 chez l'adulte (10 à 30 éléments chez l'enfant) avec un taux de PNN supérieur à 50 % oriente vers une méningite bactérienne (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus*...) Un traitement probabiliste antibiotique doit être administré en urgence au patient. Une hypoglycorachie et une hyperprotéinorachie sont souvent associées.

- **LCR avec prédominance lymphocytaire**

La présence de plus de 10 éléments par mm^3 avec plus de 50 % de lymphocytes et une hyperprotéinorachie peut être en faveur d'une méningite bactérienne à *Listeria monocytogenes* (hypoglycorachie), d'une méningite tuberculeuse (hypoglycorachie et hypochlorurachie) ou d'une méningite virale (normoglycorachie).

- **LCR panaché**

La présence d'autant de PNN que de lymphocytes dans un LCR avec plus de 10 éléments par mm^3 , avec une protéinorachie et une glycorachie normales, peut avoir diverses étiologies : listériose (*Listeria monocytogenes*), méningite purulente ou lymphocytaire à son début, abcès cérébral. En cas de méningite virale, notamment à entérovirus de type Echovirus, le nombre d'éléments peut être supérieur à 1000 par mm^3 ; initialement, on peut observer une majorité de PNN, comme dans les méningites bactériennes, avec évolution rapide vers une cellularité majoritairement lymphocytaire.

- **LCR hémorragique**

La contamination du LCR par des globules rouges fait discuter un traumatisme lors de la ponction lombaire ou une hémorragie sous-arachnoïdienne (associée à une pléiocytose et parfois une hypoglycorachie).

En cas de ponction lombaire traumatique non coagulée, une dilution dans du sérum physiologique permet de calculer le rapport hématies / leucocytes. S'il est supérieur à 1000, il reflète le rapport sanguin, alors que s'il est inférieur à 1000, il peut témoigner d'un processus infectieux *in situ* (19). Lorsque le LCR est contaminé par des hématies, la protéinorachie devient alors difficilement interprétable puisque la présence de 1000 globules rouges augmente la protéinorachie de 0,1 g/L. Une diminution progressive des globules rouges constatée sur un compte séquentiel des cellules dans trois tubes de LCR est en faveur d'un traumatisme vasculaire lors du prélèvement.

- **Méningite carcinomateuse**

Le LCR est envahi par des cellules néoplasiques métastatiques d'un cancer primitif. Les hémopathies sont les étiologies les plus fréquentes. Le LCR peut en effet être le siège d'une atteinte tumorale au cours des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) ou myéloïdes (LAM) au diagnostic initial ou lors de leur évolution. L'identification d'une atteinte méningée blastique au diagnostic d'une leucémie aiguë (LA) est de mauvais pronostic. Un nombre de leucocytes supérieur à 5 par mm³ et la présence de blastes sont signes d'une localisation méningée (17). Parmi les tumeurs solides, ce sont les cancers du sein, les cancers bronchiques (adénocarcinomes, cancers bronchiques à petites cellules...) et les mélanomes qui sont le plus souvent en cause. D'autre part, différents types de syndromes lymphoprolifératifs peuvent diffuser au niveau du SNC : les lymphomes non hodgkiniens (lymphome folliculaire, lymphome lymphoblastique, lymphome de Burkitt, lymphome pleural primitif...), le lymphome hodgkinien...

I.1.3.4. Autres analyses biologiques

Deux paramètres biochimiques sont systématiquement dosés dans le LCR : la glycorachie et la protéinorachie. La glycorachie doit toujours être déterminée simultanément à la glycémie, une glycorachie normale étant égale aux deux tiers de la glycémie. Une hypoglycorachie est souvent associée à une méningite bactérienne. Les valeurs normales de la protéinorachie sont comprises entre 0,10 et 0,45 g/L. Lors de méningites purulentes, la protéinorachie varie entre 1 et 5 g/L. Au cours du traitement, la protéinorachie est plus longue à se normaliser que la glycorachie ou la réaction cellulaire. Des hyperprotéinorachies sont également observées dans certaines pathologies neurologiques. Par ailleurs, en cas de suspicion de méningite tuberculeuse, le dosage des chlorures montre une hypochlorurachie (19).

Pour la Bactériologie, un examen direct avec coloration de Gram et la mise en culture du liquide sont effectués.

En cas de suspicion de liquide malin, le prélèvement doit être adressé au laboratoire d'Anatomopathologie. Un immunophénotypage par cytométrie en flux peut aussi être réalisé en cas de doute sur des cellules d'hémopathie maligne (cellules lymphomateuses, blastes).

I.1.4. Liquide de dialyse péritonéale continue ambulatoire

I.1.4.1. Principe de la dialyse péritonéale continue ambulatoire

La dialyse péritonéale est, avec l'hémodialyse et la transplantation rénale, l'une des trois modalités de prise en charge de l'insuffisance rénale chronique (IRC) terminale. Elle utilise les capacités de filtration du péritoine. Ce dernier est la membrane enveloppant les organes de la cavité abdominale et le tube digestif. Les feuillets pariétal et viscéral du péritoine

délimitent une cavité fermée, la cavité péritonéale. La dialyse péritonéale permet des échanges entre le sang du patient et un liquide stérile dénommé dialysat, au travers du péritoine, à l'intérieur de l'organisme. Le but est d'épurer le sang de ses déchets (urée, créatinine...), des électrolytes (sodium, potassium, magnésium...), habituellement évacués par le rein, et de retirer l'eau en excès de l'organisme (21).

La dialyse péritonéale requiert la présence d'un cathéter mis en place chirurgicalement dans le cul-de-sac de Douglas. Le cathéter doit faire l'objet de soins quotidiens. La première étape d'un cycle consiste à instiller une quantité de dialysat prédéfinie dans la cavité péritonéale à travers le cathéter. C'est la phase d'infusion qui dure 5 à 15 minutes. La deuxième étape correspond à un temps de stase pendant lequel les échanges entre le plasma sanguin et le dialysat s'effectuent à travers la membrane péritonéale (3 à 12 heures). A l'issue de cette période, le liquide contenant les déchets est vidangé après drainage par gravité et manuellement (par le patient ou un aidant), dans le cas de la dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA), ou bien grâce à une machine appelée cycleur, généralement la nuit (10 à 20 minutes), lors de la dialyse péritonéale automatisée (DPA). Les cycles (infusion, stase, drainage) se succèdent de façon continue. On distingue donc deux types de dialyse péritonéale : la DPCA manuelle et la DPA (22). Toutes les deux peuvent se pratiquer à domicile. Le patient doit se rendre tous les uns à deux mois dans un centre de dialyse pour une consultation médicale (23).

La dialyse péritonéale continue ambulatoire a été décrite en 1976, son principe est simple. Cette technique utilise des cycles longs et des échanges manuels. Avec une stratégie classique, quatre cycles de 2 à 3 litres de dialysat chacun sont réalisés pendant les 24 heures (trois cycles diurnes et un cycle long nocturne). La DPCA est habituellement quotidienne, sept jours par semaine. La contrainte imposée au malade est celle des changements de poches : de 20 à 30 minutes quatre fois par jour (22).

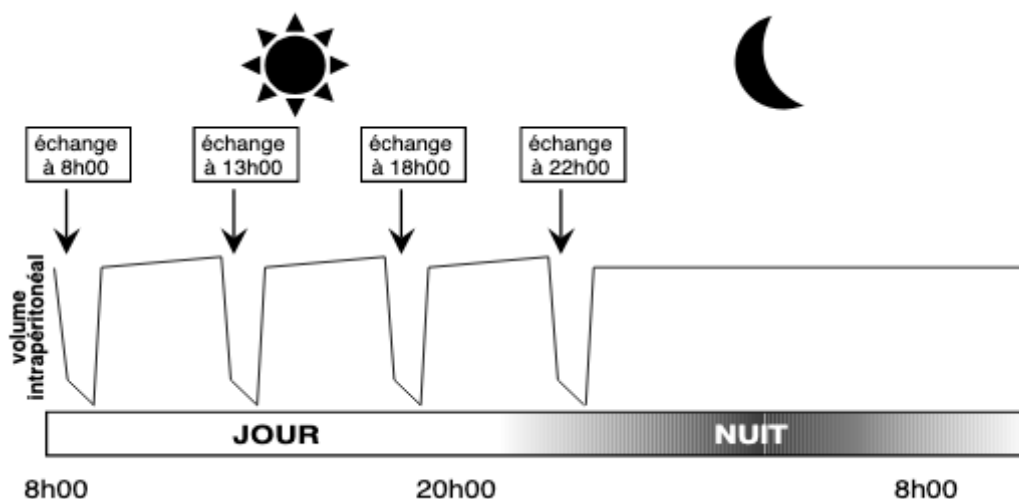


Figure 17 : Exemple d'une stratégie de DPCA

Source : Indications et non-indications de la dialyse péritonéale chronique chez l'adulte. Recommandations professionnelles HAS (22)

I.1.4.2. Complications de la dialyse péritonéale continue ambulatoire

Malgré l'amélioration des techniques au cours des dernières décennies, deux grands types d'infections peuvent compliquer une dialyse péritonéale : les infections du liquide de dialyse (les péritonites) et les infections de la voie d'abord vasculaire. Ces dernières comprennent les infections de l'orifice de sortie du cathéter de dialyse et les infections du tunnel (trajet sous-cutané du cathéter) appelées tunnelites. Ces infections peuvent mettre en jeu à la fois la survie du patient et celle de la technique de dialyse (24).

Les infections de la voie d'abord vasculaire se manifestent par une fièvre, par la présence d'un écoulement purulent au niveau de l'orifice de sortie, d'une inflammation et d'une douleur. Lors des infections de la voie d'abord vasculaire, les micro-organismes les plus souvent en cause sont les cocci à gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*...) et les bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*...) (24). Lors de la suspicion d'une infection de la voie d'abord vasculaire, c'est l'écoulement purulent qui est étudié.

Le diagnostic de péritonite est évoqué devant l'association de douleurs abdominales d'intensité et de localisation variables et d'une fièvre le plus souvent modérée. Dans les formes sévères, le tableau peut évoquer un abdomen chirurgical. La contamination a lieu via le cathéter de dialyse péritonéale, le plus souvent lors d'une erreur de manipulation ou lors d'une infection d'organe abdominale (sigmoïdite, cholécystite...), voire très exceptionnellement au cours d'une infection systémique. Les micro-organismes de la flore cutanée sont les plus fréquents. Les germes les plus souvent rencontrés sont les staphylocoques (Staphylocoques à coagulase négative, majoritairement *Staphylococcus epidermidis*, et *Staphylococcus aureus*), les Streptocoques et les bacilles à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp). Les infections à bacilles à Gram positif (corynébactéries), à cocci à Gram négatif et à levures (*Candida*...) sont plus rares (24). Lors d'une suspicion de péritonite, le liquide de dialyse est prélevé et analysé.

I.1.4.3. Prélèvement

Le recueil du liquide de dialyse permet tout d'abord l'examen cytologique.

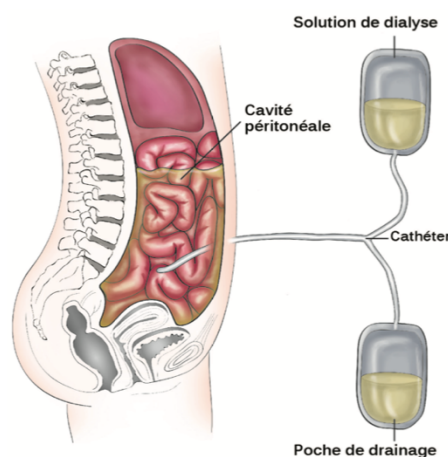


Figure 18 : Illustration du recueil du liquide de DPCA

Source : France Rein. Fiche Pratique. La dialyse péritonéale (23)

I.1.4.4. Cytologie

Les cellules retrouvées dans le liquide de DPCA sont comparables à celles du liquide d'ascite (cellules mésothéliales, macrophages, PNN, lymphocytes, monocytes...) car la solution de dialyse se trouve également dans la cavité péritonéale. Le nombre de cellules dans le dialysat dépend, en partie, de la durée du séjour.

Le dialysat normal contient très peu de cellules : absence de PNN, présence éventuelle de macrophages et de cellules mésothéliales.

Les liquides peuvent être classés en fonction de leur population cellulaire dominante.

- **Liquide à prédominance de polynucléaires neutrophiles (PNN)**

Le diagnostic de péritonite est posé lorsque le dialysat comprend plus de 100 éléments par mm^3 dont plus de 50 % de PNN. Le prélèvement du liquide peut être effectué après une stase d'une à deux heures (24). Une antibiothérapie probabiliste est indispensable. La société internationale pour la dialyse péritonéale (ISPD) recommande de toujours évoquer le diagnostic de péritonite lorsqu'au moins deux des critères suivants sont remplis : caractéristiques cliniques compatibles avec une péritonite (douleur abdominale et/ou dialysat trouble), liquide de dialyse contenant plus de 100 leucocytes par mm^3 avec plus de 50 % de PNN (après un temps de stase d'au moins deux heures), culture du dialysat positive (25).

- **Liquide à prédominance de polynucléaires éosinophiles (PNE)**

Une réaction allergique peut être causée par certains constituants du système de dialyse péritonéale (26).

I.1.4.5. Autres analyses biologiques

Concernant les analyses biochimiques, peuvent être réalisés les dosages du sodium, de l'urée, de la créatinine et du glucose.

Pour la Bactériologie, un examen direct avec coloration de Gram est effectué systématiquement ainsi que la mise en culture sur milieu conventionnel, mais aussi dans des flacons d'hémoculture, prélevés au lit du malade.

I.2. Numération et formule cellulaires des liquides biologiques : techniques de référence manuelles

I.2.1. Numération en cellule de comptage

La numération cellulaire s'effectue sur le liquide sans anticoagulant en l'absence de coagulum. Elle est réalisée en cellule de numération ou de comptage (type Malassez ou Kova®) appelée hémocytomètre, sur liquide dilué ou non, éventuellement additionné de cristal violet pour faciliter le comptage cellulaire. La chambre de comptage est lue au microscope optique (8).

Le décompte cellulaire rapporté est une valeur calculée qui dépend du nombre et du type de carrés comptés de la chambre de comptage, ainsi que du facteur de dilution le cas échéant.

Les éléments nucléés totaux (comprenant les leucocytes et les autres cellules, c'est-à-dire les macrophages, les cellules mésothéliales...), et les hématies sont comptés et exprimés par mm^3 ou μL . Les amas cellulaires pouvant correspondre à des métastases sont exclus des

comptes car indénombrables. Le mode de comptage des leucocytes et/ou des éléments nucléés totaux est propre à chaque laboratoire, faute de recommandations nationales ou internationales.

I.2.2. Formule cellulaire

Il est nécessaire de concentrer les cellules par cyto-centrifugation, en particulier pour le liquide céphalo-rachidien, du fait de la faible cellularité des échantillons.

Quelques gouttes de liquide sont versées dans un tube conique de cytospin qui est centrifugé pendant quelques minutes. La quantité de gouttes à mettre dans le tube conique dépend du nombre d'éléments comptés. Les cellules sont alors concentrées dans une petite zone circulaire sur une lame de verre. Une modification de la morphologie des cellules est possible par la cyto-centrifugation (par exemple, certaines cellules mésothéliales peuvent paraître suspectes). La lame est colorée selon la technique de May Grünwald-Giemsa (MGG). La coloration MGG peut être faite manuellement ou par un automate (8).

Selon l'aspect macroscopique et la numération cellulaire, un autre étalement peut servir à la coloration de Gram pour identification bactérienne (8).

Un examen attentif au faible grossissement est nécessaire pour détecter les cellules atypiques, de taille anormale ou les amas cellulaires. L'examen à un grossissement supérieur (objectif 50 ou objectif 100 à l'immersion) permet d'étudier la morphologie des cellules suspectes détectées à l'objectif 10, d'évaluer les éléments cellulaires prédominants et d'établir une formule cellulaire. La lecture au microscope optique permet de distinguer les polynucléaires neutrophiles (PNN), les polynucléaires éosinophiles (PNE), les polynucléaires basophiles (PNB), les lymphocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules mésothéliales et les cellules néoplasiques (8).

Chaque population cellulaire peut être exprimée en valeur absolue par mm^3 ou μL , mais également en pourcentage par rapport au nombre total d'éléments nucléés. On parle de formule cellulaire.

La plupart des laboratoires excluent les métastases et les cellules cancéreuses de la formule, car elles se regroupent en amas et sont alors difficiles à dénombrer. Certains laboratoires rassemblent dans un même groupe les monocytes, les macrophages et les cellules mésothéliales pour la lecture des liquides d'ascite et des liquides pleuraux ; d'autres classent les cellules mésothéliales dans un groupe à part entière, voire même aussi les macrophages.

I.2.3. Contraintes et limites

Ces techniques manuelles présentent des inconvénients majeurs : une durée d'analyse importante (technique chronophage), un faible débit, un nombre de cellules comptées faible, une variabilité inter-opérateur et intra-opérateur importante et donc une imprécision des résultats par manque de reproductibilité et de standardisation (27).

La précision de lecture de la chambre de comptage dépend d'un certain nombre de variables : le chargement correct du volume d'échantillon (précision des pipettes), la réalisation de dilutions appropriées et le nombre de cellules et de carrés comptés. Un haut niveau d'expertise technique est nécessaire. Si l'observateur est expérimenté, ces inconvénients sont minorés (26).

La centrifugation peut entraîner la perte de cellules, notamment des polynucléaires neutrophiles, et les déformer (28). La durée et la vitesse de cyto-centrifugation doivent être contrôlées. De plus, la centrifugation peut engendrer le regroupement des macrophages ou des cellules mésothéliales qui peuvent alors être confondus avec des amas de cellules malignes (26).

Par ailleurs, il existe un risque de générer des erreurs post-analytiques lors de la transcription des données manuelles (27).

I.3. Vérification et validation de méthode

I.3.1. Définitions

Suite à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 (29) relative à la Biologie Médicale ratifiée par la loi du 30/05/2013 et dans le cadre de l'accréditation des laboratoires exigée par la norme NF EN ISO 15189 (30), toute méthode de dosage utilisée dans un laboratoire de Biologie Médicale (LBM) doit, avant sa mise en place et son utilisation en routine, bénéficier d'une vérification ou d'une validation de méthode initiale, afin de garantir la fiabilité des résultats rendus.

L'accréditation est délivrée par un organisme national d'accréditation sur demande du LBM. En France, cet organisme est le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). L'accréditation est la reconnaissance de la compétence du LBM par les pairs que sont les autres biologistes médicaux en exercice (mise en œuvre de moyens avec des résultats satisfaisants), à la différence de la certification qui est la reconnaissance de la conformité (mise en œuvre de moyens uniquement).

Une vérification de méthode correspond à la confirmation par des preuves objectives que les exigences spécifiées ont été satisfaites, alors qu'une validation de méthode correspond à la confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites (31). Pour la plupart des analyses, les LBM devront réaliser des vérifications de méthode. Il s'agit alors simplement de s'assurer que les performances attendues par le laboratoire et annoncées par le fournisseur sont atteintes dans les conditions d'utilisation choisies par ce laboratoire (32). On parle de portée standard A (33), c'est cette méthode qui a été retenue pour notre étude.

Les examens de Biologie Médicale sont classés en deux types de méthodes. Les méthodes quantitatives fournissent des résultats issus de données numériques (la majorité des examens de Biochimie, d'Hémostase...). Les méthodes qualitatives fournissent des résultats issus de données non numériques (examens à lecture subjective : identification macroscopique et/ou microscopique en Microbiologie..., résultats binaires : présence ou absence, positif ou négatif...) (33).

Un processus analytique correspondant à l'ensemble des méthodes permettant l'obtention de résultats d'examens aboutissant au diagnostic biologique. On distingue deux types de processus : les processus simples et les processus complexes (33). Pour ce qui nous concerne, il s'agit d'un processus complexe associant plusieurs étapes utilisant des méthodes différentes : la numération cellulaire, puis la formule cellulaire.

I.3.2. Référentiels

La norme NF EN ISO 15189 (version de décembre 2012) (30) est fondée sur l'ISO/CEI 17025 (Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) et sur l'ISO 9001 (Systèmes de management de la qualité – Exigences). Elle a été élaborée par les comités techniques de l'Organisation internationale de normalisation (ISO). Elle spécifie les exigences de qualité et de compétence applicables aux LBM.

Les documents utiles à l'accréditation sont disponibles sur le site internet du Comité Français d'Accréditation (COFRAC) (34) dans la section « Santé Humaine ». Il s'agit de documents de référence (REF), de documents d'information (INF), de guides techniques d'accréditation (GTA) et de formulaires (FORM).

Le SH REF 02 révision 06 « Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870 » (35) et le document SH REF 08 révision 06 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » (36) sont les principaux documents de référence. Leur non-respect peut être l'objet d'un écart ; ce sont des documents opposables.

Les autres documents utiles sont les suivants : le SH GTA 01 révision 02 « Guide technique d'accréditation en Biologie Médicale » (37), le SH GTA 04 révision 01 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale » (33), le SH GTA 06 révision 00 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en Biologie Médicale » (38), le SH GTA 14 révision 00 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en Biologie Médicale » (39) et le document SH INF 50 révision 07 « Portées-types d'accréditation » (39).

I.3.3. Dossier de vérification / validation de méthode

Les dossiers de vérification / validation de méthode proprement dits sont des enregistrements (dont les différentes versions doivent être gérées), s'appuyant généralement sur le SH FORM 43 (40), apportant des éléments de preuve, de bibliographie, des choix et spécifications, des données brutes, des calculs et des conclusions attestées par un biologiste médical quant à l'aptitude de la méthode. Un dossier doit être réalisé pour chaque paramètre analysé par le laboratoire et conservé pendant toute la durée d'utilisation de la méthode. Chaque dossier comprend les points suivants : description du processus et de la méthode, maîtrise des risques, détermination des critères de performance à vérifier, détermination des limites acceptables, vérification des critères de performances et conclusion (déclaration d'aptitude de la méthode) (33).

Le laboratoire doit, tout d'abord, décrire, du prélèvement au compte-rendu, étape par étape, phase pré-analytique et prétraitement compris, les différentes étapes de la méthode (manuelle ou automatique, processus simple ou complexe...) (33).

Une analyse de risques doit être effectuée, comprenant l'ensemble du processus, les risques encourus, l'estimation du risque (gravité, fréquence et détectabilité) et les éléments de leur maîtrise (33).

Les critères de performance à vérifier pour déclarer la mise en service de la méthode sont choisis par le biologiste en fonction de la portée et du type de méthode (33).

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

Figure 19 : Tableau des performances à évaluer lors d'une vérification ou d'une validation de méthode quantitative ou qualitative

Source : SH GTA 04 (33)

Le choix des limites acceptables se fait en amont de la vérification expérimentale et de la vérification bibliographique de la méthode. Le LBM compare ses propres résultats aux données de référence dont il dispose (fournisseur, bibliographie, sociétés savantes...). Toute discordance avec les performances annoncées par le fournisseur doit être investiguée (33).

Les deux principales références en Biologie Médicale sont les limites données par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) (41) et les limites données par Ricos (42). Les bases de données élaborées par les différentes sociétés savantes ne contiennent cependant pas toutes les analyses de Biologie Médicale. Dans ce cas, le laboratoire pourra s'appuyer sur d'autres publications, sur les performances annoncées par le fournisseur ou sur des limites qu'il a définies.

La vérification expérimentale des critères de performance consiste à réaliser les différents essais nécessaires et à en exploiter les résultats afin d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions de routine du laboratoire. Certains paramètres ne peuvent cependant pas être évalués de manière expérimentale, les critères de performance sont alors recherchés dans les documents du fournisseur (manuels d'utilisation, fiches techniques), dans des articles scientifiques... On parle alors de vérification bibliographique.

La déclaration d'aptitude de la méthode est sous la responsabilité du biologiste habilité à cet effet (33).

II. Objectifs

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer les performances d'une technique automatisée de comptage des liquides d'ascite, des liquides pleuraux et des liquides céphalo-rachidiens (les plus fréquents) sur l'automate d'Hématologie BC-6200.

Les objectifs secondaires étaient, dans un premier temps, d'élargir l'utilisation de cette technique à l'analyse des liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA), matrice non validée par le fournisseur, et dans un second temps, d'estimer l'impact sur les délais de rendu des résultats pour envisager la mise en place de la technique en routine 7 jours sur 7 et 24 heures sur 24 (amélioration du service rendu).

III. Matériels et méthodes

III.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude monocentrique et expérimentale. Les échantillons ont été recrutés de manière prospective au laboratoire HOSPILAB47. Il s'agit d'un laboratoire de Biologie Médicale multisite comportant le laboratoire du Centre Hospitalier Agen-Nérac (CHAN) et le laboratoire du Pôle de Santé du Villeneuvois à Villeneuve-sur-Lot. Tous les examens de Bactériologie, dont l'analyse des liquides de ponction, sont réalisés sur le site du CHAN.

III.2. Sélection des échantillons

Les critères d'inclusion des échantillons biologiques ont été les suivants : tout liquide d'ascite, liquide pleural, liquide céphalo-rachidien (LCR) et liquide de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA) conforme, arrivant de 9h à 18h, du lundi au vendredi, au laboratoire du CHAN, du 7 février 2020 au 26 mai 2020, à des fins de diagnostic de routine. Ces échantillons provenaient de patients hospitalisés pendant cette période, de tout âge, et présentant un large éventail de maladies. Les liquides ont été prélevés soit dans les services cliniques de l'hôpital d'Agen pour la grande majorité, soit dans les services cliniques de l'hôpital de Villeneuve-sur-Lot, soit à l'hôpital de Nérac. Ils ont été transportés à température ambiante jusqu'au site d'Agen où ils ont tous été analysés.

Les critères d'exclusion ont été les suivants : les échantillons non conformes (liquides coagulés, liquides souillés...) et les échantillons en quantité insuffisante ne permettant pas de réaliser toutes les analyses.

101 échantillons ont été analysés au total. Les 27 liquides pleuraux et les 26 liquides d'ascite ont été collectés dans des tubes avec anticoagulant de type EDTA (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) pour l'analyse cytologique automatisée seulement et dans des pots stériles. Les 32 LCR et les 16 liquides de DPCA ont été collectés dans des pots stériles sans anticoagulant.

III.3. Recueil de données

Pour chaque prélèvement, les données suivantes ont été recueillies : nom, prénom, sexe, date de naissance du patient, numéro du dossier, date et heure du prélèvement, hôpital prescripteur, service prescripteur, type et aspect du liquide, contexte du prélèvement, résultats de Biochimie, de Bactériologie (coloration de Gram et culture), de Virologie et d'Anatomopathologie. De plus, l'heure de réalisation de chaque étape de l'analyse cytologique des liquides a été notée.

III.4. Analyse statistique

La base de données ainsi que les calculs simples ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel version 16.35 (Microsoft Corporation, Redmont, USA).

L'analyse statistique de la comparaison de méthodes et de l'étude de validité des mesures données par l'automate par rapport à la méthode manuelle a été réalisée à l'aide du logiciel Stata/SE, version 14.2, mise à jour le 29 janvier 2018 (StataCorp LLC, College Station, Texas, USA).

III.5. Mesures éthiques et réglementaires

L'étude a été réalisée conformément à la Déclaration d'Helsinki et était conforme à toute législation locale pertinente.

III.6. Description de la technique manuelle

La technique actuellement en place au laboratoire est une méthode manuelle. Il s'agit de la méthode de référence dite « gold standard ». Chaque liquide de ponction de l'étude a donc été analysé dans un premier temps par cette technique.

III.6.1. Numération cellulaire

Le comptage microscopique des éléments nucléés (leucocytes, cellules mésothéliales, macrophages...) et des hématies a été effectué à l'aide d'une chambre de comptage de type Kova® (Kova Glasttic Slide 10, Fischer Scientific, Pittsburgh, Massachusetts, USA) jetable.

Cette cellule de comptage permet la détermination de la concentration cellulaire du liquide biologique étudié, c'est-à-dire le nombre de cellules par unité de volume. Chaque lame compte 10 puits de comptage. Chaque puits de comptage comprend une grille comportant 9 grands carrés, chacun découpé en 9 petits carrés.

Les échantillons ont été dilués si nécessaire avec du chlorure de sodium (NaCl). Par capillarité, à l'aide d'une pipette ou d'une oese de 10 μL , le liquide migre dans la cellule de Kova® depuis l'encoche. Le dépôt de l'échantillon a été fait en une seule fois, sans bulle d'air et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Avant lecture, une sédimentation des éléments cellulaires de la chambre (bien à l'horizontale) a été nécessaire pendant quelques minutes. Les cellules ont ensuite été quantifiées à l'aide du microscope optique (Olympus BX43, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japon) au grossissement 20 ou 40 en ne comptant que les cellules à l'intérieur des traits de la grille. L'examen de plusieurs champs a été nécessaire pour obtenir une moyenne représentative. La moyenne des cellules comptées par petits carrés a été multipliée par 90 pour obtenir le nombre de cellules par mm^3 (ou μL).

Cette première étape a été réalisée par le technicien au poste d'ensemencement (J0).

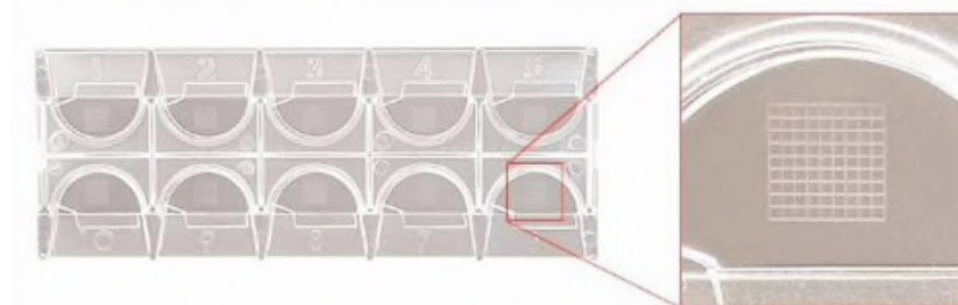


Figure 20 : Cellule de Kova® permettant la numération cellulaire des différents liquides biologiques corporels

Source : Site Fisher Scientific (43)

III.6.2. Formule cellulaire

Lorsque le liquide biologique comprenait plus de 10 éléments nucléés par mm^3 (ou μL), une formule cellulaire a été réalisée.

Les lames (Thermo Scientific Lames Cytoslides Shandon simples, Fischer Scientific, Pittsburgh, Massachusetts, USA) ont été préparées par cyto-centrifugation des liquides à 500 tours par minute (rpm) pendant 10 minutes (Cytospin Aerospray[®] Gram, ELITech France, Puteaux, France) par le technicien du poste J0.



Figure 21 : Aerospray[®] Gram Series 2 (colorateur de lame / cyto-centrifugeuse)

Source : Brochure du fabricant

Elles ont ensuite été colorées par l'étaleur-colorateur SC-120 de la chaîne CAL 6000 dans le secteur d'Hématologie. Elles ont enfin été lues au microscope optique (Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japon) au grossissement 10, puis au grossissement 100 avec huile à immersion (DropStick, RAL Diagnostics, Martillac, France), par le biologiste en poste d'Hématologie.

Pour les liquides d'ascite et pleuraux, la lecture au microscope optique a permis de séparer les polynucléaires neutrophiles (PNN), les polynucléaires éosinophiles (PNE), les polynucléaires basophiles (PNB), les lymphocytes et un groupe nommé « autres cellules » comprenant les monocytes, les macrophages et les cellules mésothéliales. Les monocytes et les macrophages ne sont pas séparés car ces deux populations cellulaires sont difficiles à différencier l'une de l'autre sur les lames de cyto-centrifugation. Cette approximation n'a pas d'impact clinique. La confusion est également possible entre les cellules mésothéliales vacuolisées et les monocytes et les macrophages.

Pour les LCR et les liquides de DPCA, ont été différenciés les PNN, les PNE, les PNB, les lymphocytes et les monocytes.

Les cellules atypiques (notamment les métastases) ont été signalées par un commentaire biologique et ont été exclues de la formule. Elles se présentent en effet sous forme d'amas et ne peuvent être dénombrées.

III.7. Description du principe analytique du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200

Pour l'étude, les liquides biologiques ont ensuite été analysés par les deux modules de la chaîne CAL 6000 en mode BodyFluid™, dans un délai le plus court possible (moins d'une heure) suivant la méthode manuelle. Cette étape a été réalisée après l'étape d'ensemencement bactériologique et coloration de Gram éventuelle. Chaque module BC-6200 a permis de déterminer la cytologie cellulaire, mais également, lorsque le liquide contenait plus de 10 éléments nucléés par mm³, la formule. Les échantillons ont été analysés indifféremment en mode ouvert ou fermé.

Les informations de cette partie proviennent principalement du manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44) et du mode opératoire simplifié de Menarini® (45).

III.7.1. Chaîne CAL 6000

La chaîne d'automates d'Hématologie cellulaire CAL 6000 est fabriquée par Mindray® (Mindray, Shenzhen, Chine) et distribuée par Menarini® (A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L., Rungis, France).

Le laboratoire du CHAN utilise une chaîne CAL 6000 qui est composée de trois modules, les modules en miroir BC-6200 #1 et BC-6200 #2 et le module SC-120 qui est l'étaleur-colorateur, ainsi que d'un convoyeur d'échantillons (trois zones de chargement et trois zones de déchargement). Chaque BC-6200 comprend tous les canaux d'analyses permettant de réaliser la numération et la formule sanguine (NFS), la numération des plaquettes, des réticulocytes et des érythroblastes, ainsi que le mode « BodyFluid™ » (BF) pour l'analyse des liquides biologiques. La chaîne CAL 6000 a été mise en service le 02/07/2018 au CHAN.

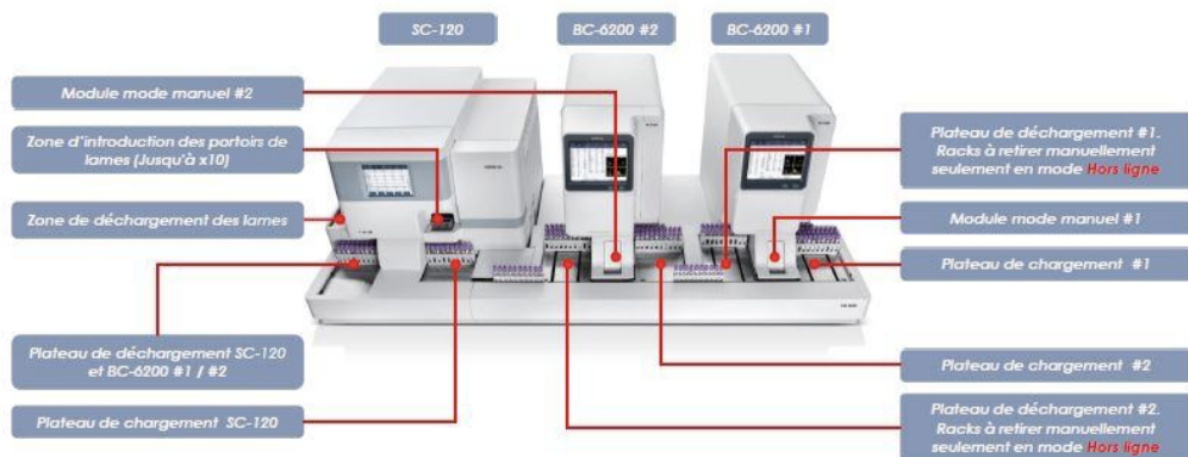


Figure 22 : Présentation de la chaîne CAL 6000

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

Le logiciel concentrateur LabXpert (Menarini®) est l'unité de traitement de l'information (système expert) et une plateforme de connexion des analyseurs et d'échange de données. Il transmet les résultats au concentrateur EVM Byg (Byg Informatique, L'Union, France), lui-

même en connexion bidirectionnelle avec le Système d'Information de Laboratoire (SIL), InLog LaboServeur (Inlog Haemonetics, Limonest, France).

III.7.1.1. Module BC-6200

III.7.1.1.1. Caractéristiques

Les BC-6200 sont conçus pour analyser des échantillons prélevés sur anticoagulant de type EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) K2 ou K3. Menarini® conseille le K2 (sel d'EDTA dipotassique) pour des raisons de meilleure stabilité du volume cellulaire dans le temps. Un échantillon sanguin est stable jusqu'à 8 heures après son prélèvement à température ambiante (18 à 26°C). La cadence en routine est de 110 échantillons par heure en mode sanguin (65 échantillons s'il faut doser les réticulocytes en plus de la NFS) et 40 échantillons par heure pour les liquides de ponctions, pour chacun des deux modules.

III.7.1.1.2. Modes d'analyse

Le mode automatique (AL-WB) est le mode de routine pour les échantillons sanguins. Il ne sera pas développé.

Le mode manuel permet d'analyser plusieurs types d'échantillons : les liquides d'épanchement (tubes ouverts ou fermés) prélevés sur tube EDTA ou sur tube sec (CT-BF), les tubes de sang EDTA ouverts ou fermés (CT-WB), les microtubes et les godets ouverts (CT-MICRO). Le mode manuel ne permet pas de réaliser l'homogénéisation automatique des échantillons. Un minimum de dix retournements complets manuels des échantillons est donc nécessaire avant toute analyse.

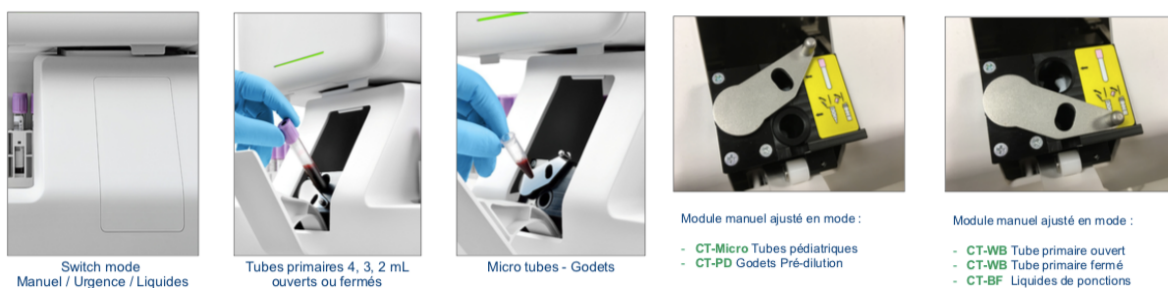


Figure 23 : Illustration du mode manuel du BC-6200

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

III.7.1.1.3. Principes d'analyse

Cet appareil effectue des analyses d'Hématologie suivant les méthodes de comptage par impédance, par cytofluorométrie en flux et par spectrophotométrie. Ces méthodes s'appliquent à plusieurs canaux de comptage : le canal HB, le canal GR-PLT, le canal WNB, le canal DIFF et le canal ERP.

III.7.1.1.3.1. Spectrophotométrie : canal hémoglobine (HB)

Il s'agit du canal utilisé pour la mesure de l'hémoglobine dans le sang. Ce canal n'est pas utilisé en mode BF et ne sera donc pas détaillé.

III.7.1.1.3.2. Impédance : canal globules rouges / plaquettes (GR-PLT)

La mesure par impédance repose sur le principe Coulter, du nom de ses inventeurs (Wallace et Joe Coulter, 1953). La méthode Coulter effectue avec précision le comptage et l'analyse volumétrique des cellules en détectant et en mesurant les variations de résistance électrique observées lorsqu'une cellule se trouvant dans un liquide conducteur passe par un micro-orifice.

L'analyse des hématies et des plaquettes se fait par impédance grâce au courant direct qui permet de mesurer la taille des cellules passant à travers l'orifice. De part et d'autre de cet orifice se trouvent deux électrodes entre lesquelles passe le courant électrique. Ainsi, à chaque passage d'une cellule dans l'orifice, le courant électrique diminue, ce qui provoque une variation d'impédance (augmentation de la résistance électrique) produisant une impulsion électrique mesurable. Le nombre d'impulsions donne le nombre de cellules ayant traversées l'orifice. La hauteur de chaque impulsion est proportionnelle au volume de la cellule.

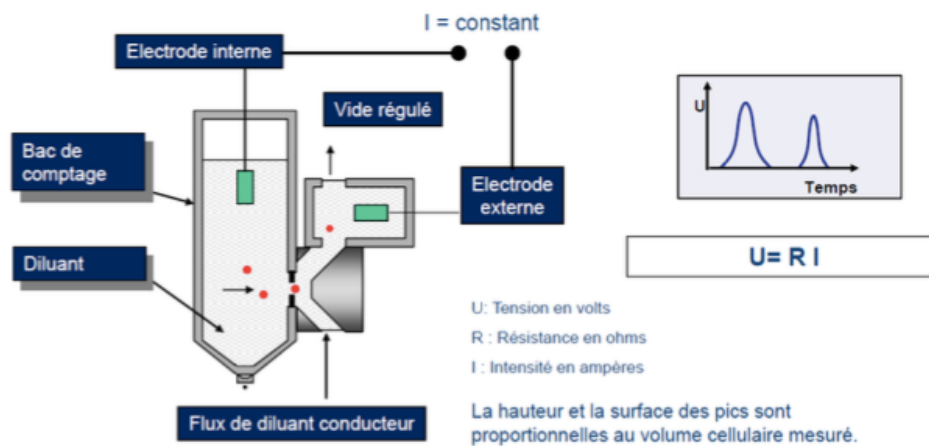


Figure 24 : Analyse par impédance (canal globules rouges / plaquettes)

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

Toute cellule d'un volume supérieur à 40 femtolitre (fL) et inférieur à 250 fL est comptée comme un globule rouge. Toute cellule d'un volume supérieur à 2 fL et inférieur à 40 fL est comptée comme une plaquette. Chaque cellule est placée dans un histogramme de distribution volumétrique, comme illustré dans la figure suivante.

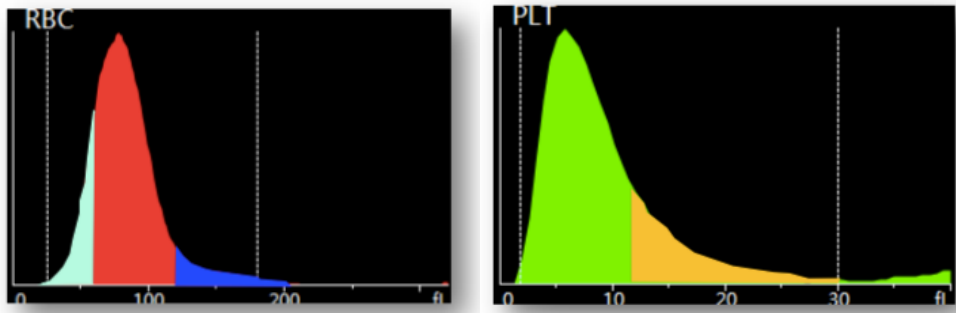


Figure 25 : Histogrammes de distribution volumétrique des globules rouges (RBC) et des plaquettes (PLT)

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

Le résultat est assujéti à une correction dite « correction de coïncidence ». En effet, occasionnellement, deux ou trois cellules peuvent traverser l'orifice de comptage en même temps. Une impulsion de grande amplitude est alors générée. La fréquence de ces passages en coïncidence est statistiquement prévisible en fonction du nombre de cellules. Cette correction est réalisée automatiquement par l'analyseur.

III.7.1.1.3.3. Cytofluorométrie en flux

Pour les canaux WNB, DIFF et ERP, la méthode utilisée est l'analyse optique en cytofluorométrie en flux. Le système utilise un laser semi-conducteur par diode d'une longueur d'onde de 635 nanomètres (nm). Ce laser passe au travers d'une chambre de mesure (Flowcell) dans laquelle les cellules sont amenées une à une grâce à une focalisation hydrodynamique (écoulement laminaire des cellules en file indienne).

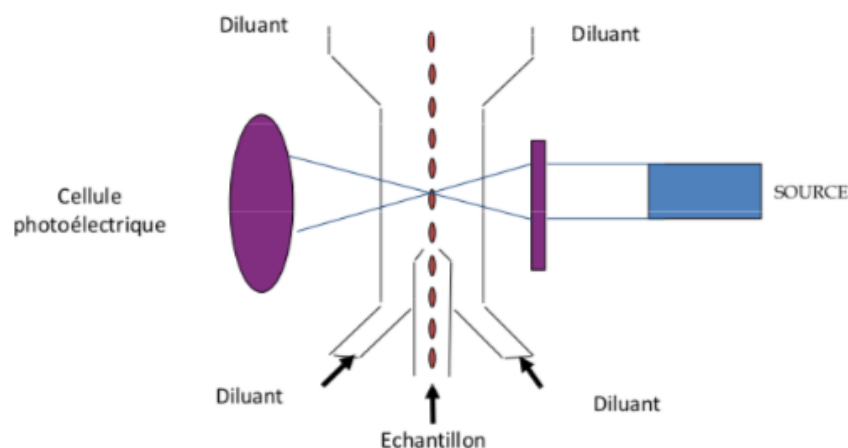


Figure 26 : Mesure optique en cytofluorométrie en flux

Source : Automatisation de l'hémogramme, Bruno Flamand, IUT Dijon

Pour chaque cellule passant devant le faisceau laser, trois récepteurs analysent conjointement :

- La diffraction lumineuse à 6° (diffraction en petit angle) : information sur la taille des cellules (Forward Scatter : FS). Plus la cellule est grande, plus la diffraction est importante.
- La diffraction lumineuse à 90° (diffraction en grand angle) : information sur la complexité et la granularité cellulaires (Side Scatter : SS). Plus la cellule est granuleuse ou le noyau complexe, plus la diffraction est importante.
- L'émission de la fluorescence (FL). Plus la cellule est jeune ou activée, plus l'ADN est accessible au marquage par le fluorochrome et plus la fluorescence est importante.

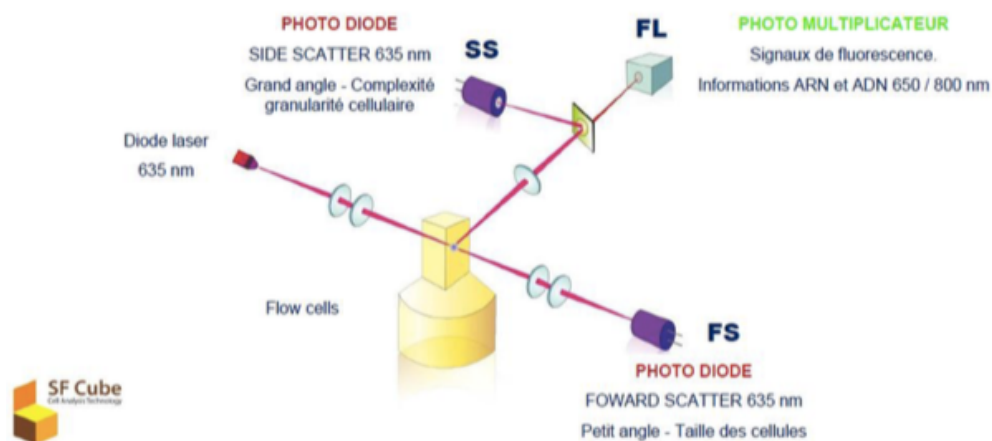


Figure 27 : Analyse par fluorocytométrie (mise en évidence des trois paramètres exploitables : SS, FL, FS)

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

- **Canal WNB**

Les réactifs utilisés dans le canal WNB sont le LN Lyse, qui permet l'hémolyse des globules rouges, et le FN Dye, fluorochrome spécifique marquant l'ARN et l'ADN des érythroblastes, des polynucléaires basophiles (PNB) et des leucocytes. Ce canal permet la détermination des globules blancs totaux, des PNB et des érythroblastes.

- **Canal DIFF**

Les réactifs utilisés sont le LD Lyse, qui permet la lyse des GR, et le FD Dye, fluorochrome spécifique marquant l'ARN et l'ADN des lymphocytes, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles, des polynucléaires éosinophiles, des immatures granuleux, des blastes et des lymphocytes atypiques. Ce canal donne le compte des leucocytes et la formule leucocytaire.

- **Canal ERP**

Les réactifs utilisés sont le DR Diluant, qui est un diluant sphérisant pour les globules rouges et les plaquettes, et le FR Dye, fluorochrome spécifique marquant l'ARN et l'ADN présents dans les réticulocytes et les plaquettes. Les réticulocytes et les plaquettes répondent à la fluorescence proportionnellement à leur immaturité. Ce canal sépare les hématies (dépourvues de fluorescence) des réticulocytes et des plaquettes (fluorescents).

III.7.1.2. Étaleur colorateur SC-120

La chaîne CAL 6000 comprend, en plus des deux modules BC-6200, un étaleur-colorateur nommé SC-120.



Figure 28 : SC-120, de face et de profil

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

Le SC-120 peut fonctionner en automatique sur demande de la CAL 6000 mais permet aussi le chargement de tubes ou de lames en manuel pour étalement et coloration ou coloration seule (possibilité de coloration seule ou étalement seul ou impression seule).

La coloration réalisée par le SC-120 est une coloration de type May-Grünwald Giemsa (MGG), utilisée pour les frottis sanguins et médullaires, ainsi que pour la coloration des liquides de ponction, après une étape de séchage puis de fixation au méthanol. Lors de la coloration MGG, l'ARN, le cytoplasme des lymphocytes et des monocytes ainsi que les nucléoles apparaissent en bleu, l'ADN (chromatine) et les granulations primaires en rouge-violet, l'hémoglobine et les granulations des éosinophiles en rouge-orangé.

Les liquides de ponction sont colorés selon le programme MGG des frottis sanguins.

Tableau 1 : Description du programme « MGG1 » (frottis sanguins, liquides de ponction)

Étapes	Temps	Concentrations
Méthanol	1 minute	
May-Grünwald	3 minutes	300 µL : dilution au 1/18 ^{ème}
Giemsa	8,5 minutes	300 µL : dilution au 1/18 ^{ème}
Lavage tampon pH 6,8	4 minutes	
Séchage	Actif	

III.7.2. Mode BodyFluid™

Chaque module BC-6200 (BC-6200 #1 et BC-6200 #2) de la chaîne CAL 6000 possède un mode BodyFluid™ (BF) pour l'analyse de certains liquides biologiques.

Le mode BF permet l'analyse automatisée, sans prétraitement manuel, des liquides d'ascite, des liquides pleuraux et des liquides céphalo-rachidiens (LCR), notamment la numération des hématies, des leucocytes et des éléments nucléés, mais aussi une approche de la formule leucocytaire. Dans notre étude, nous avons testé en plus les liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA). Ce mode ne nécessite pas de licence supplémentaire. Les réactifs et les contrôles de qualité internes (CIQ) utilisés sont les mêmes que pour les analyses sanguines. Le temps de comptage est par contre allongé (multiplié par trois) par rapport au mode sanguin. Un blanc réactif (cycle de rinçage) est systématiquement effectué lors de chaque sélection du mode BF afin de vérifier la validité de la ligne de base et d'éviter une contamination par du sang. Le volume de prise d'échantillon est de 85 µL sur tube EDTA ouvert ou fermé ou sur tube stérile ouvert. Un volume minimum de 1 mL est nécessaire. L'analyse se fait en mode manuel (CT-BF).

En mode BF, chaque BC-6200 utilise deux canaux : le canal DIFF et le canal impédance GR-PLT, permettant de rendre les 18 paramètres.

III.7.2.1. Numération cellulaire

L'analyse par le canal GR-PLT permet d'obtenir la concentration en hématies (GR-BF) dans le liquide biologique. L'analyse par le canal DIFF permet d'obtenir les paramètres suivants : la concentration totale en cellules nucléées dans l'échantillon (TC-BF), c'est-à-dire la totalité des cellules présentes dans le canal DIFF sauf les débris non fluorescents (ghost), et la concentration en globules blancs dans l'échantillon (GB-BF). Le mode BodyFluid™ permet donc de rendre dans un premier temps une numération cellulaire.

III.7.2.2. Formule leucocytaire

L'automate, grâce au canal DIFF, sépare en deux populations les leucocytes (GB-BF). Il établit ainsi le pourcentage et la valeur absolue des cellules polynucléées (PMN% et PMN#) et des cellules mononucléées (MN% et MN#). Les cellules polynucléées comprennent les polynucléaires neutrophiles et les polynucléaires éosinophiles et les cellules mononucléées les monocytes et les lymphocytes.

L'automate permet donc d'obtenir 7 paramètres d'analyse de routine : GB-BF, TC-BF, PMN#, PMN%, MN#, MN% et GR-BF.

Le mode BodyFluid™ permet également d'obtenir des paramètres de recherche, au nombre de 11, grâce au canal DIFF. Ces derniers ne sont pas validés par le fabricant comme paramètres de diagnostic utilisables pour les résultats du patient.

La zone HF-BF correspond aux cellules fortement fluorescentes (cellules mésothéliales, macrophages, cellules malignes non hématopoïétiques...), situées au-dessus de la zone GB-BF. Ces cellules sont incluses dans le nombre de TC-BF. La numération des cellules de cette zone est rendue soit en valeur absolue (HF-BF#), soit en pourcentage (HF-BF%) pour 100 GB-BF.

La formule leucocytaire de recherche est calculée par l'automate. Elle permet de déterminer le pourcentage et la valeur absolue des polynucléaires neutrophiles (NEU-BF% et

NEU-BF#), des polynucléaires éosinophiles (EOS-BF% et EOS-BF#), des lymphocytes (LY-BF% et LY-BF#) et des monocytes (MO-BF% et MO-BF#) par rapport au nombre total de globules blancs (GB-BF). Le paramètre NEU-BF# a été simplifié par PNN# dans la suite du manuscrit.

GR-BF(S) est le onzième paramètre de recherche, il représente la concentration en globules rouges de l'échantillon biologique, avec une plus grande précision que le paramètre GR-BF.

III.7.2.3. Expression des résultats

Les paramètres TC-BF, GB-BF, PMN#, MN#, NEU-BF#, EO-BF#, LY-BF#, MO-BF# et HF-BF# sont exprimés en nombre de cellules $\times 10^9 / L$, soit en nombre de cellules $\times 10^3 / \mu L$ (ou $10^3 / mm^3$). Les paramètres GR-BF et GR-BF(R) sont exprimés en nombre de cellules $\times 10^{12} / L$, soit en nombre de cellules $\times 10^6 / \mu L$ (ou $10^6 / mm^3$). Le nombre de décimales est cependant différent (GR-BF : x.xxx ; GR-BF(R) : x.xxxx).

Les paramètres PMN%, MN%, NEU-BF%, EO-BF%, LY-BF% et MO-BF% sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de leucocytes (GB-BF). Le paramètre HF-BF% est exprimé en quantité de cellules hautement fluorescentes pour 100 leucocytes (GB-BF).

III.7.2.4. Représentation graphique en scattergramme

Toutes les cellules sont regroupées en fonction de leur complexité interne (axe SS), de leur taille (axe FS) et de leur teneur en acides nucléiques (axe FL).

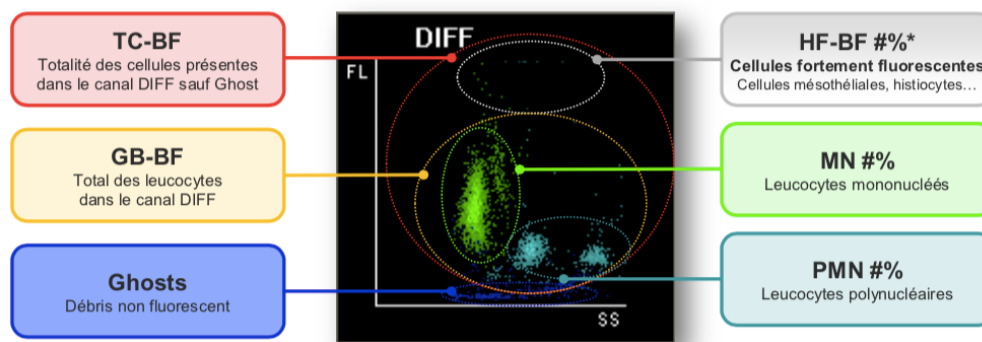


Figure 29 : Scattergramme DIFF du mode BodyFluid™

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

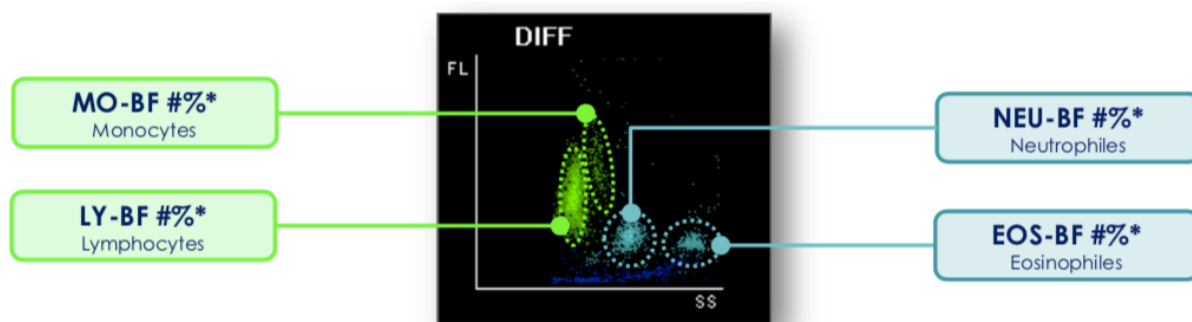


Figure 30 : Obtention de la formule leucocytaire de recherche du mode BodyFluid™ grâce au canal DIFF

Source : Manuel d'utilisation de la chaîne CAL 6000 rédigé par Menarini® (Formation Opérateur) (44)

III.8. Evaluation des performances de la méthode automatisée

Nous avons réalisé une vérification quantitative de méthode en portée A, les équipements et les réactifs étant utilisés dans les conditions préconisées par le fournisseur, pour les liquides d'ascite, les liquides pleuraux et les liquides céphalo-rachidiens. Nous avons donc vérifié les performances du couple automate / réactif annoncées par le fabricant. Il n'existe pas de recommandations de sociétés savantes (SFBC, Ricos...) pour les liquides biologiques. L'analyse d'un liquide biologique comprend plusieurs étapes, dont l'analyse cytologique étudiée ici ; on parle de processus complexe.

La vérification expérimentale des critères de performances du module BF sur site comprend : l'évaluation de la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), l'approche de la justesse et de l'exactitude, l'évaluation de l'incertitude de mesure, la comparaison à une autre méthode, la détermination de la limite de détection, de la limite de quantification et de la contamination.

Les limites de linéarité, les données d'interférences, de robustesse, de stabilité des réactifs et les intervalles de référence (valeurs usuelles) ont été fournis par la bibliographie.

III.8.1. Répétabilité

La répétabilité du mode BodyFluid™ (BF) de chaque BC-6200 a été évaluée à partir d'échantillons patients. Pour les paramètres TC-BF, GB-BF et PNN#, deux liquides d'ascite, deux liquides pleuraux et deux liquides de DPCA (deux niveaux de concentration pour chaque liquide, proches des zones décisionnelles) ont été analysés chacun dix fois, sur chacun des deux modules BC-6200, dans un délai le plus court possible, et dans des conditions strictement identiques : même opérateur, même lot de réactifs, même étalonnage. Pour le paramètre GR-BF, un liquide d'ascite et deux liquides pleuraux ont été analysés de la même façon. Le nombre d'hématies dans les liquides de DPCA n'est pas contributif. Le nombre de détermination a été de dix pour chaque niveau, en raison de la faible quantité d'échantillons présente et de la durée d'analyse conséquente. Les LCR n'ont pas pu être analysés en raison du faible volume de ceux-ci.

Pour chaque niveau, pour chaque paramètre, pour chaque liquide et pour chaque module, l'exploitation des résultats a consisté à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le

coefficient de variation (*CV*) exprimé en pourcentage (%) des valeurs expérimentales de chaque série, selon la formule suivante :

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

III.8.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire

Selon le fournisseur, le mode BF peut être validé en routine par les contrôles de qualité internes (CIQ) utilisés pour la NFS. Ces derniers valident les canaux d'analyse par impédance et DIFF. Par définition, seulement deux paramètres sont utilisables : les globules blancs (GB) et les globules rouges (GR). La fidélité intermédiaire a été établie sur 15 jours, avec 27 ou 28 déterminations par paramètre, sur trois niveaux (bas, normal, haut).

Cependant, afin de vérifier les performances des automates, un CIQ spécifique BF, le Body Fluid-I Control d'Eurocell® (Biotechn Eurocell Diagnostics, Noyal-Chatillon-sur-Seiche, France), a été analysé sur chacun des deux automates. Du fait des difficultés logistiques en lien avec la pandémie de COVID-19, seules 9 valeurs ont pu être obtenues et analysées, pour chacun des trois niveaux. Les paramètres disponibles sont : GB-BF et GR-BF.

Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité, avec calcul de la moyenne (*m*), de l'écart-type (*s*) et du coefficient de variation (*CV*) exprimé en pourcentage (%) des valeurs expérimentales de chaque série, pour chaque niveau, pour chaque paramètre et pour chaque module.

III.8.3. Approche de la justesse

La justesse a été déterminée, dans un premier temps, pour les paramètres GB et GR, grâce à l'externalisation des CIQ quotidiens sanguins (trois niveaux : bas, normal, haut) validant le mode BF. Le biais (ou erreur de justesse ou erreur systématique) a été estimé, pour chaque module, pour chaque niveau de CIQ et pour les deux paramètres, en comparant la moyenne (*m*) des CIQ du laboratoire à la valeur cible attendue (*v*), la moyenne du groupe de pairs, qui est assimilée à la « valeur vraie ». Le biais a été exprimé en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

Dans un second temps, nous avons tenté d'évaluer la justesse grâce à l'externalisation des CIQ BF, mais le groupe de pairs était insuffisant.

III.8.4. Approche de l'exactitude

L'inexactitude de la méthode a été déterminée grâce à l'exploitation de deux lots d'évaluation externe de la qualité (EEQ). Il s'agit des EEQ Body Fluid Cells 2020 (Biotechn Eurocell Diagnostics, Noyal-Chatillon-sur-Seiche, France). Chaque lot (2002B et 2008B) comprenait deux échantillons (2002B1 et 2002B2 ; 2008B1 et 2008B2) analysés sur chacun des deux modules. Deux paramètres ont pu être étudiés : GB-BF et GR-BF.

Nous avons comparé, pour chaque paramètre, pour chaque échantillon et pour chaque module, la valeur trouvée (x) lors de l'EEQ à la valeur cible attendue (la moyenne des participants ou du groupe de pairs), assimilée à la valeur « vraie » (v), de l'échantillon testé.

L'inexactitude (erreur d'exactitude ou biais) a été exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

L'inexactitude a été étudiée également par le calcul du Z-score. Il permet de positionner le résultat du laboratoire par rapport aux autres participants. Ce n'est qu'un indicateur statistique. Une valeur différente de zéro indique le nombre d'écart-types dont la valeur s'écarte de zéro. La zone idéale se situe entre -1 et $+1$, la zone inacceptable entre -3 et $+3$.

$$Z - score = \frac{x - v}{S}$$

S est l'écart-type du groupe de comparaison.

III.8.5. Estimation de l'incertitude de mesure

Pour chacun des deux paramètres GB-BF et GR-BF, les niveaux des CIQ sanguins ne sont pas proches des seuils de décision thérapeutique des différents liquides biologiques. Nous avons donc utilisé les CIQ BF, mais peu de valeurs ont pu être obtenues. De plus, nous avons seulement quatre valeurs d'EEQ pour chaque automate. Nous avons néanmoins essayé de calculer une incertitude de mesure selon la méthode CIQ/EEQ qui repose sur l'exploitation de données internes (CIQ) et de données externes (EEQ).

L'incertitude composée est obtenue en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et de l'EEQ. Elle s'exprime de la façon suivante :

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

$u^2(CIQ)$ représente la variance (carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du CIQ. Il s'agit de l'incertitude liée à la fidélité intermédiaire. Elle s'exprime ainsi :

$$u^2(CIQ) = \left(\frac{CV_{CIQ} \times m_{CIQ}}{100} \right)^2$$

$u^2(EEQ)$ représente la variance (carré de l'écart-type) liée à la justesse (biais) calculée grâce à l'exploitation des EEQ. Elle s'exprime ainsi :

$$u^2(EEQ) = \left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}} \right)^2 + \sigma_E^2$$

$$\text{Avec } \bar{E} = \sum \frac{(x-v)_i}{n} \text{ et } \sigma_E = \sqrt{\frac{\sum (E_i - \bar{E})^2}{n-1}}$$

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

σ_E : écart-type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

x : résultat du laboratoire

v : valeur assignée de la comparaison

n : nombre de valeurs d'EEQ

L'incertitude élargie U est obtenue en multipliant l'incertitude composée par un facteur d'élargissement k égal à 2, ce qui correspond à un intervalle de confiance (IC) d'environ 95 % si la loi de distribution est normale :

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

D'autre part, même si les paramètres analysés sont des paramètres quantitatifs, l'interprétation clinique des résultats de cytologie est semi-quantitative (liquide pathologique / liquide non pathologique) et l'interprétation finale dépend aussi des autres examens associés : la formule, la coloration de Gram, la culture bactériologique, les analyses biochimiques et les examens anatomopathologiques. Nous avons donc estimé l'incertitude de mesure autour des valeurs seuils thérapeutiques en vérifiant la concordance entre la méthode automatique et la méthode de référence.

La validité des mesures réalisées par l'automate BC-6200 #1, avec comme méthode de référence la méthode manuelle, pour le diagnostic d'épanchement inflammatoire, a été évaluée. Les seuils retenus sont les suivants : pour le liquide d'ascite, un nombre de cellules nucléées supérieur à 1000 par μL et de polynucléaires neutrophiles supérieur à 250 par μL ; pour le liquide pleural, un nombre de cellules nucléées supérieur à 1000 par μL et de polynucléaires neutrophiles supérieur à 500 par μL . Le liquide céphalorachidien n'a pas été évalué.

La sensibilité avec son intervalle de confiance à 95 % (IC95%), la spécificité avec son IC95%, l'aire sous la courbe (AUC) de la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) (46) avec son IC95% et le coefficient Kappa de Cohen avec son IC95%, par rapport à la technique de référence (méthode manuelle), ont été rapportés. Les valeurs du coefficient Kappa de Cohen vont de -1 à $+1$, avec -1 un désaccord total, 0 un hasard pur, et $+1$ un accord total (47).

Nous avons de plus réalisé une analyse de risques, détaillée dans la partie Maîtrise des risques, qui fait apparaître les principaux facteurs pouvant influencer les résultats.

III.8.6. Comparaison de méthodes

Les échantillons, frais, ont été analysés successivement par la méthode manuelle et par les deux modules de la chaîne dans un délai le plus court possible pour limiter une éventuelle dérive de stabilité (dégénérescence cellulaire). Ces différents échantillons couvrent la gamme de mesure des valeurs rencontrées au laboratoire pendant la période étudiée.

Nous avons comparé les mesures effectuées par la méthode manuelle avec celles effectuées par le BC-6200 #1 et ensuite les mesures données par les deux modules BC-6200 #1 et BC-6200 #2 entre elles, par plusieurs méthodes. Les méthodes de régression linéaire sont inadaptées pour comparer deux méthodes différentes de mesure d'une même grandeur.

Elles négligent la variabilité de la méthode de mesure de référence. Une étude de concordance entre ces deux mesures est dans ce cas plus judicieuse (48).

Les échantillons avec alarme ont été exclus pour la comparaison des polynucléaires neutrophiles.

Le test des rangs signés de Wilcoxon pour données appariées a d'abord été réalisé. Une valeur de p inférieure à 0,05 traduit une différence statistiquement significative. Les variables quantitatives sont décrites par la médiane et la distance interquartile (DIQ), étant donné que leurs distributions s'écartent de la loi normale.

L'étude de la concordance entre deux méthodes de mesure a, dans un premier temps, été réalisée à l'aide d'une régression de Passing-Bablok, en rapportant pour chaque comparaison la pente et son intervalle de confiance à 95 % (IC95%) (ce qui correspond à une différence proportionnelle entre les deux mesures), ainsi que l'ordonnée à l'origine et son IC95% (ce qui correspond à une différence systématique entre les deux mesures). La concordance est retenue si la valeur 1 est comprise dans l'IC95% de la pente, et la valeur 0 dans l'IC95% de l'ordonnée à l'origine. La condition de linéarité entre les mesures, nécessaire pour la validité du test, est vérifiée par le test du CUSUM. Sur les graphiques correspondant, la ligne noire pleine représente la régression de y par x . Idéalement, elle doit passer par 0 sur l'axe des ordonnées (absence de différence systématique entre les deux mesures) et être inclinée à 45° (pas de différence proportionnelle entre les deux mesures) ; ce qui veut alors dire que les deux méthodes donnent des mesures parfaitement identiques. Les lignes en pointillés représentent les IC95% de la régression.

Une analyse complémentaire de Bland et Altman a ensuite été effectuée, en rapportant pour chaque comparaison la moyenne des différences entre les paires de mesures et l'IC95%. L'absence de biais est retenue si la valeur 0 est comprise dans l'IC95% de la moyenne des différences. La condition de normalité de la distribution, nécessaire pour la validité du test, est vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Sur les graphiques correspondant, la ligne noire pleine représente la moyenne des différences entre les deux mesures, c'est-à-dire le biais (différence systématique entre les deux mesures). Si elle passe par 0, cela veut dire qu'il n'y a pas de différence systématique entre les deux mesures (donc que les deux méthodes donnent en moyenne les mêmes valeurs et qu'il n'y a pas de biais). Les lignes noires en pointillés représentent les limites de concordance, il s'agit de la moyenne des différences $\pm 1,96 \times$ son écart-type. C'est entre ces bornes qu'est censée se situer la majorité des différences entre les deux mesures. La ligne rouge pleine représente la régression linéaire de la différence par la moyenne et donne une information sur la tendance des données. Idéalement, cette ligne est parallèle à l'axe des abscisses.

Enfin, le coefficient de concordance de Lin a été calculé ; il quantifie la précision de la concordance, ainsi que l'exactitude de la concordance. Ses valeurs vont de -1 à $+1$, avec -1 une discordance parfaite, 0 une concordance nulle, et $+1$ une concordance parfaite.

Concernant la comparaison du nombre d'hématies entre la méthode manuelle et l'automate BC-6200 #1, la méthode manuelle ne donnant plus le nombre exact d'hématies pour les valeurs supérieures à 100000 par mm^3 (ou par μL), les valeurs supérieures à 100000 par mm^3 (ou par μL) données par l'automate 1 ont été remplacées par 100000 par mm^3 (ou par μL) par convention et pour permettre les comparaisons entre les deux méthodes.

Aucune imputation n'a été réalisée sur les données manquantes.

III.8.7. Limite de détection et limite de quantification

Pour estimer la limite de détection et la limite de quantification, nous avons, dans un premier temps, effectué 30 mesures répétées de DS Diluant (qui correspond au blanc matrice dépourvu de l'analyte à doser), dans une même série, sur chacun des deux modules. Nous avons ensuite calculé l'écart-type (s_b) exprimé en concentration de ces trente mesures. Les limites de détection et de quantification ont été calculées selon les formules suivantes :

$$\text{Limite de détection} = 3 \times S_b$$

$$\text{Limite de quantification} = 10 \times S_b$$

Nous avons, dans un second temps, analysé un liquide pleural au départ richement cellulaire, à différentes dilutions, puis six fois au 1/1000^{ème}, sur le BC-6200 #1, pour déterminer la limite de quantification.

III.8.8. Contamination inter-échantillons

Après rinçage de l'appareil, un liquide d'ascite richement cellulaire a été analysé trois fois consécutivement (H1, H2, H3 ; moyenne mH) suivi du DS Diluant également analysé trois fois (B1, B2, B3). Cette séquence de mesure (H1, H2, H3, B1, B2, B3) a été répétée trois fois de suite afin de réduire les erreurs aléatoires. La moyenne des B1 (mB1), la moyenne des B3 (mB3) et la moyenne des H (mH) ont été calculées. Le pourcentage de contamination entre les échantillons a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{mB1 - mB3}{mH - mB3} \times 100$$

Ce taux a été évalué pour les paramètres suivants : TC-BF et GB-BF, et pour les deux automates.

III.9. Maîtrise des risques

Nous avons utilisé la méthode des 5M pour identifier les principaux facteurs d'incertitude susceptibles d'influencer significativement les résultats. Il s'agit d'un outil d'aide à l'analyse du processus de mesure qui permet d'examiner le processus à l'aide de cinq éléments (Moyens, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matière).

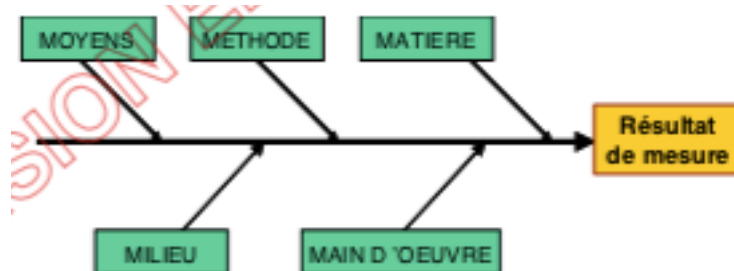


Figure 31 : Diagramme des 5M (diagramme d'Ishikawa) pour l'élaboration de l'analyse de risques

Source : SH GTA 14 (39)

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

III.10. Etude des délais de rendu des résultats

Pour chacun des liquides étudiés, nous avons noté les dates et heures de toutes les étapes d'analyse détaillées ci-dessous :

- Réception au laboratoire (horodatage par les agents déposant les prélèvements au laboratoire)
- Enregistrement sur le SIL par les secrétaires ou les techniciens à la réception
- Montage de la chambre de comptage par le technicien du poste ensemencement J0
- Début de lecture de la chambre de comptage par le technicien du J0
- Obtention du résultat de la numération (lecture terminée) par le technicien du J0
- Validation technique du résultat de la numération (scan de la maquette), si formule non nécessaire, par le technicien du J0
- Début de réalisation de la cytopspin au J0
- Fin de réalisation de la cytopspin au J0
- Transfert de la lame du J0 vers le secteur Hématologie par le technicien du J0 pour coloration MGG
- Début de la coloration MGG par le SC-120 dans le secteur Hématologie
- Fin de coloration MGG par le SC-120 dans le secteur Hématologie
- Mise à disposition de la lame au biologiste pour lecture dans le secteur Hématologie
- Début de lecture par le biologiste dans le secteur Hématologie
- Obtention du résultat (lecture terminée) dans le secteur Hématologie
- Mise à disposition du résultat (validation technique) de la cytologie (scan de la maquette), par le biologiste, à la réception
- Passage de l'échantillon sur le module BC-6200 #1 dans le secteur Hématologie
- Rendu du résultat (numération cellulaire et formule leucocytaire) par le module BC-6200 #1
- Passage de l'échantillon sur le module BC-6200 #2 dans le secteur Hématologie
- Rendu du résultat (numération cellulaire et formule leucocytaire) par le module BC-6200 #2

Pour chacun des 101 liquides analysés, nous avons calculé le délai de rendu des résultats selon la méthode manuelle : délai entre l'enregistrement et la validation technique de la numération seule (quand seulement la numération a été faite) et délai entre l'enregistrement et la validation technique de l'ensemble numération et formule (lorsque la formule a aussi été faite). Nous avons également comparé le temps technique nécessaire pour la numération, le temps technique nécessaire pour la formule et le temps technique total entre les deux techniques.

IV. Résultats

IV.1. Caractéristiques des échantillons

Au total, 101 échantillons de sujets adultes (97/101) ou d'enfants (4/101) ont été évalués en parallèle par technique manuelle et par technique automatisée. Les comparaisons ont été établies en considérant la méthode manuelle comme la méthode de référence. Ces échantillons représentent une gamme importante d'échantillons normaux et pathologiques.

L'âge moyen des patients était de 67,4 ans (allant de 9 jours à 97 ans) et l'âge médian de 71 ans, avec une répartition de 51 hommes pour 50 femmes.

Tableau 2 : Présentation des 101 échantillons étudiés

Nombre total de liquides	101
Liquides d'ascite	26/101 (25,7 %)
Liquides pleuraux	27/101 (26,7 %)
LCR	32/101 (31,7 %)
Liquides de DPCA	16/101 (15,8 %)

LCR : liquides céphalo-rachidiens ; DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire

Tableau 3 : Aspect des différents échantillons étudiés

Liquides d'ascite	26
Clairs	7/26 (26,9 %)
Hémorragiques	4/26 (15,4 %)
Troubles	5/26 (19,2 %)
Légèrement troubles	10/26 (38,5 %)
Liquides pleuraux	27
Citrin	2/27 (7,4 %)
Hémorragiques	8/27 (29,6 %)
Troubles	11/27 (40,7 %)
Légèrement troubles	6/27 (22,2 %)
LCR	32
Eau de roche	26/32 (81,3 %)
Xanthochromiques	2/32 (6,3 %)
Troubles	1/32 (3,1%)
Légèrement troubles	3/32 (9,4 %)

Liquides de DPCA	16
Clairs	12/16 (75,0 %)
Troubles	1/16 (6,3 %)
Légèrement troubles	3/16 (18,8 %)

LCR : liquides céphalo-rachidiens ; DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire

Tableau 4 : Contexte des 101 échantillons étudiés

Liquides d'ascite	
Cirrhose alcoolique	17/26 (65,4 %)
ISLA	2/26 (7,7 %)
Oncologie	7/26 (26,9 %)
Liquides pleuraux	
Pneumologie	17/27 (63,0 %)
Oncologie	8/27 (29,6 %)
Traumatisme post-chute	1/27 (3,7 %)
Insuffisance cardiaque	1/27 (3,7 %)
LCR	
Méningite infectieuse	10/32 (31,3 %)
Neurologie	19/32 (59,4 %)
Oncologie	3/32 (9,4 %)
Liquides de DPCA	
IRC terminale	16/16 (100,0 %)

ISLA : infection spontanée du liquide d'ascite ; LCR : liquides céphalo-rachidiens ; DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire ; IRC : insuffisance rénale chronique

IV.2. Evaluation des performances de la méthode automatisée

IV.2.1. Vérifications expérimentales

IV.2.1.1. Répétabilité

Tableau 5 : Résultats de la répétabilité (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	Liquides d'ascite		Liquides pleuraux	
		<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	1	158	6,91	232	6,06
	2	1569	6,56	784	4,59
GB-BF	1	149	6,88	226	5,88
	2	1500	5,45	775	4,22
GR-BF	1	44900	2,21	18800	5,49
	2	/	/	6000	7,86
PNN#	1	259	8,70	43	22,14
	2	13	66,27	118	11,74

m : moyenne des 10 passages ; *CV* : coefficient de variation

Les valeurs en gras se rapprochent des seuils décisionnels thérapeutiques de chaque liquide.

Tableau 6 : Résultats de la répétabilité (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	Liquides d'ascite		Liquides pleuraux	
		<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	1	154	7,09	196	3,37
	2	1469	7,40	752	2,22
GB-BF	1	145	6,93	193	3,04
	2	1410	6,60	745	1,94
GR-BF	1	43500	5,11	19000	3,51
	2	/	/	6100	9,31
PNN#	1	260	19,28	14,6	25,87
	2	12	49,70	110	5,10

m : moyenne des 10 passages ; *CV* : coefficient de variation

Les valeurs en gras se rapprochent des seuils décisionnels thérapeutiques de chaque liquide.

Chaque *CV* calculé a été comparé au *CV* limite acceptable retenu, celui du fournisseur Menarini® à 10 %.

Les *CV* obtenus sont conformes, sauf pour les niveaux très bas de PNN#.

IV.2.1.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire

Tableau 7 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	<i>n</i>	<i>m</i> (/μL)	<i>s</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
GB	Bas	27	3880	98	2,5
	Normal	28	7630	148	1,9
	Haut	28	21290	327	1,5
GR	Bas	27	2450000	22000	0,9
	Normal	28	4690000	46000	1,0
	Haut	28	5710000	52000	0,9

CIQ : contrôle interne de qualité ; *n* : nombre d'échantillons de CIQ analysés par le laboratoire ; *m* : moyenne des CIQ du laboratoire ; *s* : écart-type des CIQ du laboratoire ; *CV* : coefficient de variation des CIQ du laboratoire

Tableau 8 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	<i>n</i>	<i>m</i> (/μL)	<i>s</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
GB	Bas	30	3860	158	4,1
	Normal	29	7560	135	1,8
	Haut	28	21190	263	1,2
GR	Bas	30	2450000	23000	0,9
	Normal	29	4680000	50000	1,1
	Haut	28	5750000	45000	0,8

CIQ : contrôle interne de qualité ; *n* : nombre d'échantillons de CIQ analysés par le laboratoire ; *m* : moyenne des CIQ du laboratoire ; *s* : écart-type des CIQ du laboratoire ; *CV* : coefficient de variation des CIQ du laboratoire

Chaque *CV* calculé a été comparé au *CV* limite admissible de fidélité intermédiaire correspondant aux cibles de Westgard données pour les paramètres sanguins (GB : 5,5 % et GR : 1,6 %).

Pour les deux automates, les *CV* correspondant au paramètre GB sont tous inférieurs à 5,5 % et donc conformes aux spécifications retenues. Les *CV* correspondant au paramètre GR sont tous inférieurs à 1,6 % et donc conformes aux spécifications retenues.

Les deux tableaux suivants présentent les résultats des différents passages du contrôle spécifique Body Fluid-I Control (CIQ BF).

Tableau 9 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	<i>n</i>	<i>m</i> (/μL)	<i>s</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
GB-BF	1	9	25	3	12,7
	2	9	134	4	2,7
	3	9	1036	24	2,4
GR-BF	1	9	24000	1000	3,6
	2	9	64000	2000	2,9
	3	9	435000	13000	2,9

CIQ : contrôle interne de qualité ; *n* : nombre d'échantillons de CIQ BF analysés par le laboratoire ; *m* : moyenne des CIQ BF du laboratoire ; *s* : écart-type des CIQ BF du laboratoire ; *CV* : coefficient de variation des CIQ BF du laboratoire

Tableau 10 : Résultats de la fidélité intermédiaire : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	<i>n</i>	<i>m</i> (/μL)	<i>s</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
GB-BF	1	9	24	4	16,1
	2	9	126	6	5,0
	3	9	988	21	2,2
GR-BF	1	9	23000	5000	19,9
	2	9	57000	18000	31,01
	3	9	430000	19000	4,4

CIQ : contrôle interne de qualité ; *n* : nombre d'échantillons de CIQ BF analysés par le laboratoire ; *m* : moyenne des CIQ BF du laboratoire ; *s* : écart-type des CIQ BF du laboratoire ; *CV* : coefficient de variation des CIQ BF du laboratoire

Chaque *CV* calculé a été comparé au *CV* du fournisseur Eurocell® (GB-BF : 14,3 %, 6,3 % et 1,9 % pour les niveaux 1, 2 et 3 respectivement ; GR-BF : 4,0 %, 1,6 % et 0,7 % pour les niveaux 1, 2 et 3 respectivement).

Pour le niveau bas des GB-BF et pour les GR-BF, les *CV* obtenus sont supérieurs à ceux préconisés par le fournisseur Eurocell® et à ceux observés pour les CIQ sanguins.

IV.2.1.3. Approche de la justesse

Tableau 11 : Résultats de la justesse : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)
GB	Bas	16	70	1,84
	Normal	16	150	2,01
	Haut	16	460	2,21
GR	Bas	16	20000	0,82
	Normal	16	30000	0,64
	Haut	16	20000	0,35

CIQ : contrôle interne de qualité ; N : nombre de laboratoires (groupe de pairs)

Tableau 12 : Résultats de la justesse : CIQ sanguins quotidiens de mars 2020 (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)
GB	Bas	16	50	1,31
	Normal	16	80	1,07
	Haut	16	370	1,78
GR	Bas	16	10000	0,41
	Normal	16	30000	0,64
	Haut	16	70000	1,23

CIQ : contrôle interne de qualité ; N : nombre de laboratoires (groupe de pairs)

Chaque biais calculé a été comparé aux limites retenues par le laboratoire qui sont les cibles de Westgard pour la justesse données pour les paramètres sanguins (GB : 6,05 % et GR : 1,7 %).

Pour les deux automates, les biais correspondant au paramètre GB sont tous inférieurs à 6,05 % et donc conformes aux spécifications retenues. Les biais correspondant au paramètre GR sont tous inférieurs à 1,7 % et donc conformes aux spécifications retenues.

Les deux tableaux suivants présentent les résultats du contrôle spécifique Body Fluid-I Control (CIQ BF).

Tableau 13 : Résultats de la justesse : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)
GB-BF	1	3	3	11,11
	2	3	-11	-7,80
	3	3	-70	-6,31
GR-BF	1	3	-3000	-13,04
	2	3	-2000	-3,23
	3	3	-17000	-3,81

CIQ : contrôle interne de qualité ; N : nombre de laboratoires (groupe de pairs)

Tableau 14 : Résultats de la justesse : CIQ Body Fluid-I Control d'août 2020 (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)
GB-BF	1	3	3	11,11
	2	3	-11	-7,80
	3	3	-120	-10,81
GR-BF	1	3	-3000	-13,04
	2	3	-12000	-19,35
	3	3	-17000	-3,80

CIQ : contrôle interne de qualité ; N : nombre de laboratoires (groupe de pairs)

Chaque biais calculé a été comparé au biais limite admissible de la justesse donné par le fournisseur Menarini® (10 %).

La justesse évaluée grâce à l'externalisation des résultats des CIQ Body Fluid-I Control est ininterprétable car il n'y a que trois pairs (dont deux correspondent à nos automates).

IV.2.1.4. Approche de l'exactitude

Tableau 15 : Résultats des EEQ par rapport au groupe de pairs (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)	Z-score	Note
GB-BF	2002B1	6	99	3,066	1,005	B+
	2002B2	6	-8	-3,556	-0,742	B-
	2008B1	6	-7	-1,316	-0,321	TB-
	2008B2	6	40	5,413	1,864	AB+
GR-BF	2002B1	6	-1500	-2,804	-1,088	TB-
	2002B2	6	333	2,437	0,645	TB+
	2008B1	6	-1000	-2,632	-0,645	TB-
	2008B2	6	-500	-3,704	-0,913	B-

EEQ : évaluation externe de la qualité ; N : nombre de résultats ; TB : très bien ; B : bien ; AB : assez bien

Tableau 16 : Résultats des EEQ par rapport à l'ensemble des participants (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)	Z-score	Note
GB-BF	2002B1	51	155	4,885	1,240	B+
	2002B2	51	-16	-6,867	-1,138	AB-
	2008B1	50	-11	-2,052	-0,533	TB-
	2008B2	50	30	4,005	1,068	B+
GR-BF	2002B1	48	-4048	-7,222	-2,017	AB-
	2002B2	48	608	4,540	0,737	B+
	2008B1	49	-2297	-5,845	-1,332	B-
	2008B2	49	-1160	-8,192	-2,058	AB-

EEQ : évaluation externe de la qualité ; N : nombre de résultats ; TB : très bien ; B : bien ; AB : assez bien

Tableau 17 : Résultats des EEQ par rapport au groupe de pairs (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)	Z-score	Note
GB-BF	2002B1	6	4	0,124	0,041	TB+
	2002B2	6	-8	-3,556	-0,742	B-
	2008B1	6	-14	-2,632	-0,642	TB-
	2008B2	6	-11	-1,488	-0,513	TB-
GR-BF	2002B1	6	500	0,935	0,363	TB+
	2002B2	6	-667	-4,880	-1,292	B-
	2008B1	6	0	0,000	0,000	TB+
	2008B2	6	-500	-3,704	-0,913	B-

EEQ : évaluation externe de la qualité ; N : nombre de résultats ; TB : très bien ; B : bien

Tableau 18 : Résultats des EEQ par rapport à l'ensemble des participants (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	N	Biais (/μL)	Biais (%)	Z-score	Note
GB-BF	2002B1	51	60	1,891	0,480	TB+
	2002B2	51	-16	-6,867	-1,138	AB-
	2008B1	50	-18	-3,358	-0,872	B-
	2008B2	50	-21	-2,804	-0,748	B-
GR-BF	2002B1	48	-2048	-3,654	-1,021	B-
	2002B2	48	-392	-2,927	-0,475	TB-
	2008B1	49	-1297	-3,301	-0,752	TB-
	2008B2	49	-1160	-8,192	-2,058	AB-

EEQ : évaluation externe de la qualité ; N : nombre de résultats ; TB : très bien ; B : bien ; AB : assez bien

La comparaison avec l'ensemble des participants a été donnée du fait de l'effectif réduit du groupe de pairs (BC-6800 et BC-6200 : 6 automates). Les autres participants utilisent les automates Sysmex® (séries XN, XE, XT : 42 automates), Beckman Coulter® (DxH : 2 automates) et Horiba® (1 automate).

Pour les deux automates, pour chacun des deux paramètres et pour les quatre valeurs d'EEQ, le biais absolu est toujours inférieur à 10 % et le Z-score inférieur à 2. L'exactitude est donc conforme aux spécifications retenues (fournisseur Menarini®).

IV.2.1.5. Estimation de l'incertitude de mesure

Tableau 19 : Résultats de l'incertitude de mesure (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	Quantification de l'incertitude	
GB-BF	2	134 ± 12 /μL	134 /μL \pm 9,0 %
	3	1036 ± 125 /μL	1036 /μL \pm 12,1 %
GR-BF	1	24000 ± 2323 /μL	24000 /μL \pm 9,7 %
	2	64000 ± 4311 /μL	64000 /μL \pm 6,7 %

Tableau 20 : Résultats de l'incertitude de mesure (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	Quantification de l'incertitude	
GB-BF	2	126 ± 19 /µL	126 /µL ± 15,1 %
	3	988 ± 47 /µL	988 /µL ± 4,8 %
GR-BF	1	23000 ± 10025 /µL	23000 /µL ± 43,6 %
	2	57000 ± 36008 /µL	57000 /µL ± 63,2 %

Les résultats ont été comparés aux limites acceptables proposées par le fournisseur Menarini® (10 %). Il n'existe cependant pas de recommandations internationales, ni de sociétés savantes sur ce point.

Les incertitudes de mesure sont satisfaisantes, mise à part celles correspondant au paramètre GR-BF sur l'automate BC-6200 #2.

Nous avons de plus étudié l'incertitude de mesure autour des valeurs seuils thérapeutiques en vérifiant la concordance entre la méthode automatique et la méthode de référence, pour le diagnostic d'épanchement inflammatoire. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant. Pour chaque liquide et pour chaque paramètre, la courbe ROC a été faite au seuil cité, et la sensibilité et la spécificité ont été calculées à ce seuil.

Tableau 21 : Validation de l'automate BC-6200 #1 pour le diagnostic d'épanchement inflammatoire avec comme référence la méthode manuelle

Liquide biologique	Valeur seuil (/µL)	Sensibilité (IC95%)	Spécificité (IC95%)	AUC (IC95%)	Kappa (IC95%)
Liquide d'ascite (n = 26)	Cellules nucléées > 1000	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)
	PNN > 250	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)
Liquide pleural (n = 27)	Cellules nucléées > 1000	1.00 (1.00 à 1.00)	0.88 (0.75 à 1.00)	0.93 (0.83 à 1.00)	0.85 (0.64 à 1.00)
	PNN > 500	0.50 (0.25 à 0.75)	1.00 (1.00 à 1.00)	0.95 (0.85 à 1.00)	0.59 (0.05 à 1.00)

IC95% : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre d'échantillons ; PNN : polynucléaires neutrophiles

Pour les liquides d'ascite, les résultats sont très bons. Pour les liquides pleuraux, au seuil de PNN à 500 par μL , la sensibilité est égale à 50 %. La spécificité est égale à 100 %, ce qui signifie que tous les échantillons définis comme pathologiques par la méthode manuelle ont bien été classés pathologiques par la méthode automatisée.

Une autre composante de l'incertitude de mesure repose sur la maîtrise des risques, du fait de l'aspect semi-quantitatif des résultats. Elle est détaillée dans la partie Maîtrise des risques et en annexe.

IV.2.1.6. Comparaison de méthodes

Les résultats des différentes comparaisons sont illustrés dans cette partie. Nous avons étudié la concordance entre la méthode manuelle et le BC-6200 #1 et entre le BC-6200 #1 et le BC-6200 #2.

Tableau 22 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #1 et la méthode manuelle

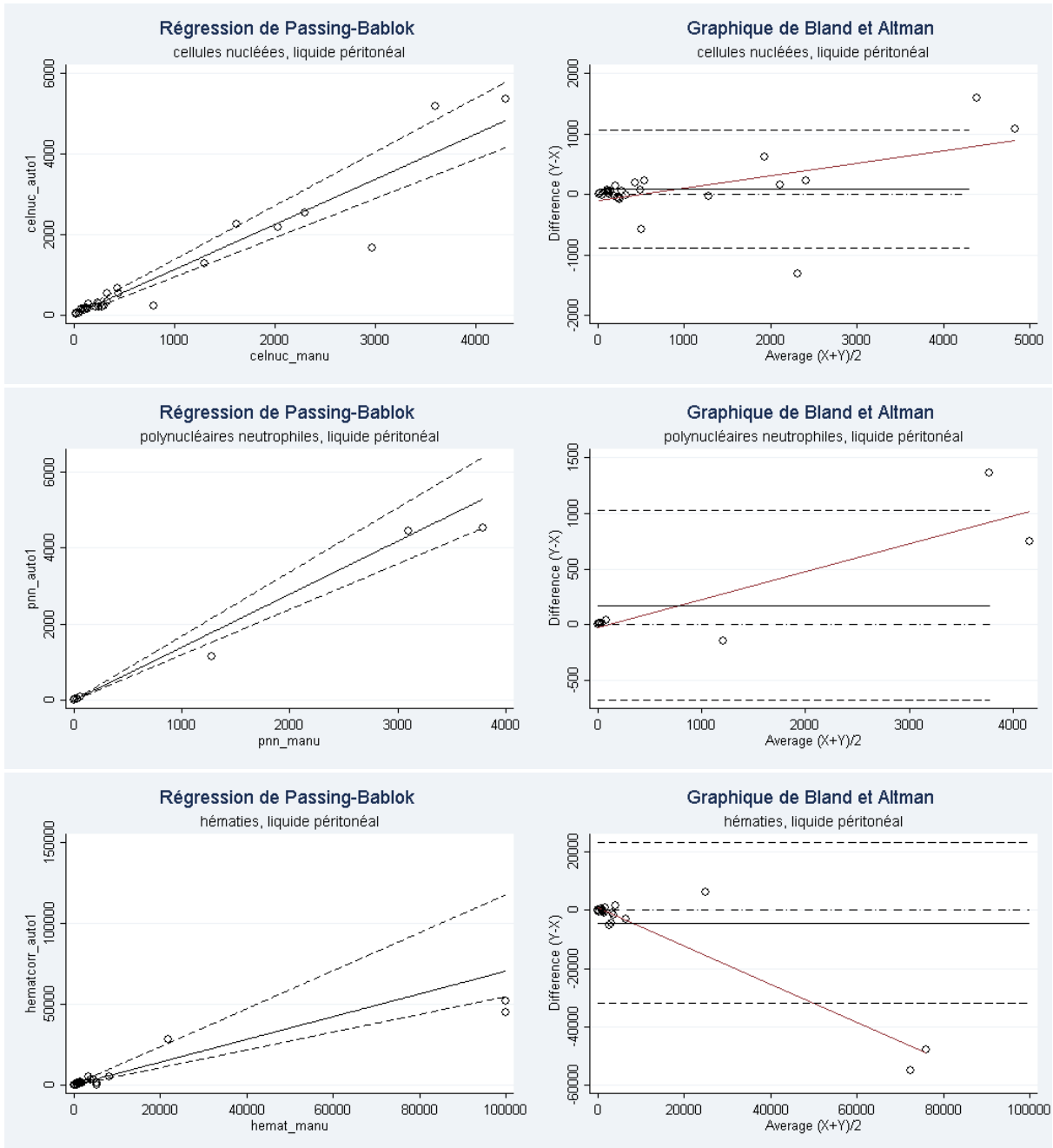
Liquide biologique	Cellules (médiane \pm DIQ) (μL)			Régression de Passing-Bablok		Analyse de Bland-Altman	Coefficient de concordance de Lin
	BC-6200 #1	Méthode manuelle	p	Pente (IC95%)	Intercept (IC95%)	Moyenne des différences (μL) (IC95%)	
Liquide d'ascite (n = 26)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 26)	246 \pm 1121	290 \pm 1181	0.089	1.12 (0.98 à 1.34)	3 (-38 à 35)	91 (-109 à 291)*	0.930
PNN (n = 12)	27 \pm 615	11 \pm 668	0.023	1.39 (1.19 à 1.68)	3 (3 à 6)	173 (-103 à 448)*	0.955
Hématies (n = 26)	1000 \pm 3000	1429 \pm 4356	0.006	0.70 (0.55 à 1.18)	-81 (-412 à -12)	-4400 (-10072 à 1273)*	0.766
Liquide pleural (n = 27)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 27)	818 \pm 1219	855 \pm 1511	0.435	0.90 (0.72 à 1.16)	21 (-188 à 174)	-5 (-268 à 259)*	0.818
PNN (n = 15)	222 \pm 355	204 \pm 469	0.233	0.83 (0.55 à 1.12)	4 (-28 à 42)	-4 (-260 à 253)*	0.840
Hématies (n = 27)	3000 \pm 19000	4000 \pm 27517	0.009	0.94 (0.76 à 1.03)	-582 (-1170 à -99)	-2297 (-7249 à 2655)*	0.937
Liquide céphalo-rachidien (n = 32)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 32)	1 \pm 3	2 \pm 6	<0.001	0.81 (0.5 à 0.89)	-1 (-1 à 0)	-25 (-64 à 13)*	0.987

Hématies 0 ± 0 5 ± 133 <0.001 / / -73 (-185 à 39)* 0.311

(n = 32)

DIQ : distance interquartile ; IC95% : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre d'échantillons ; PNN : polynucléaires neutrophiles

* : Condition d'application du test non respectée (distribution non normale selon le test de Shapiro-Wilk)



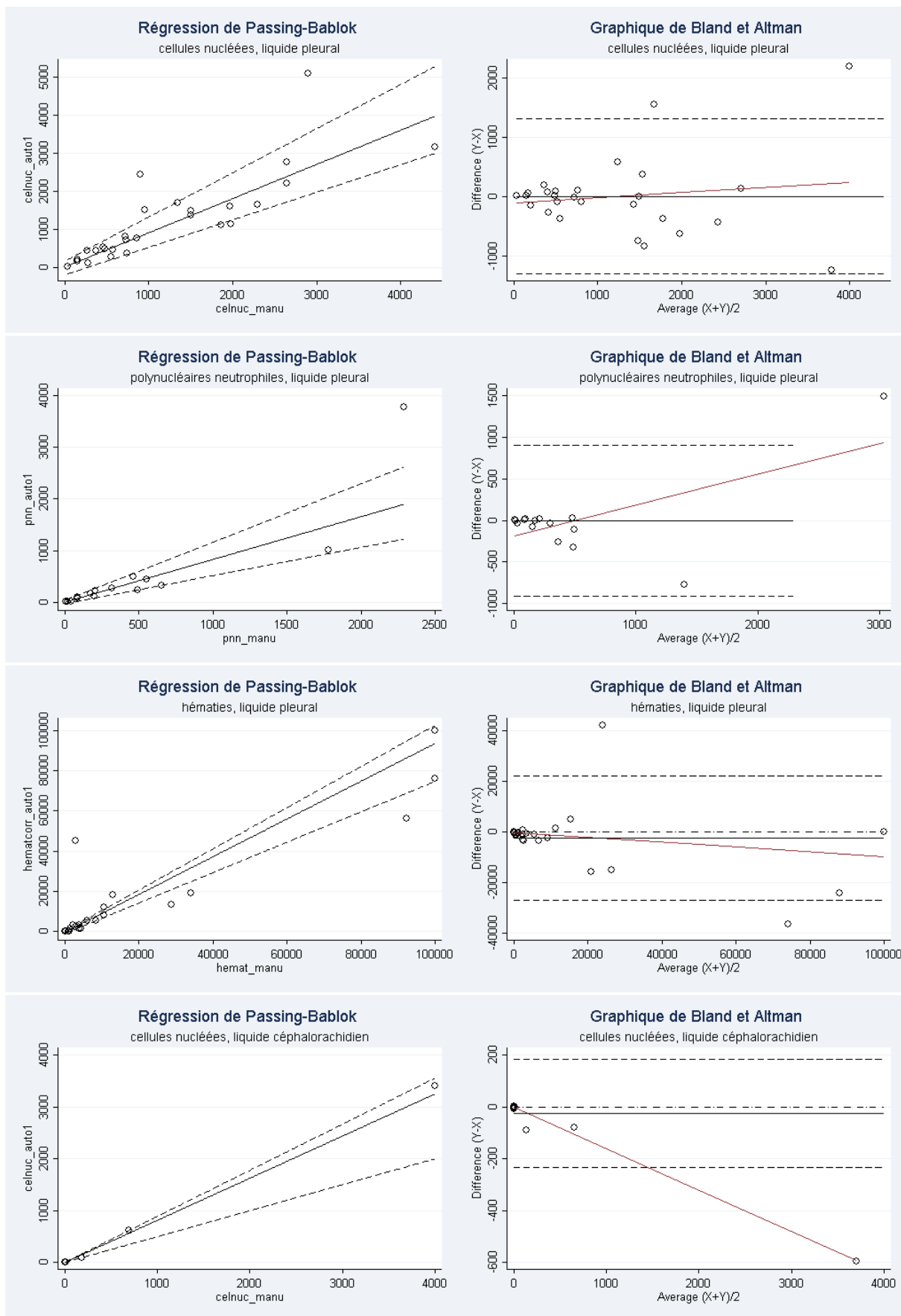


Figure 32 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et méthode manuelle
Source : Logiciel Stata/SE 14.2

L'analyse numérique montre qu'il n'existe aucune différence entre les résultats des cellules nucléées donnés par la méthode manuelle et par l'automate, pour les liquides d'ascite et les liquides pleuraux. L'analyse des graphiques le confirme. Pour les cellules nucléées, en particulier dans les liquides d'ascite, la différence entre les méthodes s'accroît dans les valeurs élevées.

Concernant le paramètre polynucléaire neutrophile, il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes pour les liquides pleuraux, d'après les données numériques et graphiques. Pour les liquides d'ascite, p est inférieur à 0,005 et les données numériques du Passing-Bablok traduisent une non-concordance entre les deux méthodes. Celles du Bland et Almand et du coefficient de Lin montrent des résultats non significativement différents entre les deux méthodes. Cependant, graphiquement, le point sortant correspond à une valeur élevée, supérieure au seuil critique et donc sans impact clinique.

Les résultats obtenus pour les hématies sont corrects pour les liquides d'ascite et les liquides pleuraux. La précision des hématies est discutable aux faibles concentrations.

Concernant l'étude des cellules nucléées dans le LCR, p est inférieur à 0,005, les données du Passing-Pablok traduisent une non-concordance entre les deux méthodes, alors que celles du Bland et Altman et du coefficient de Lin suggèrent des résultats non significativement différents. Graphiquement, le point sortant correspond à une valeur élevée, sans impact clinique. Ces liquides sont généralement peu cellulaires.

Tableau 23 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #2 et le BC-6200 #1

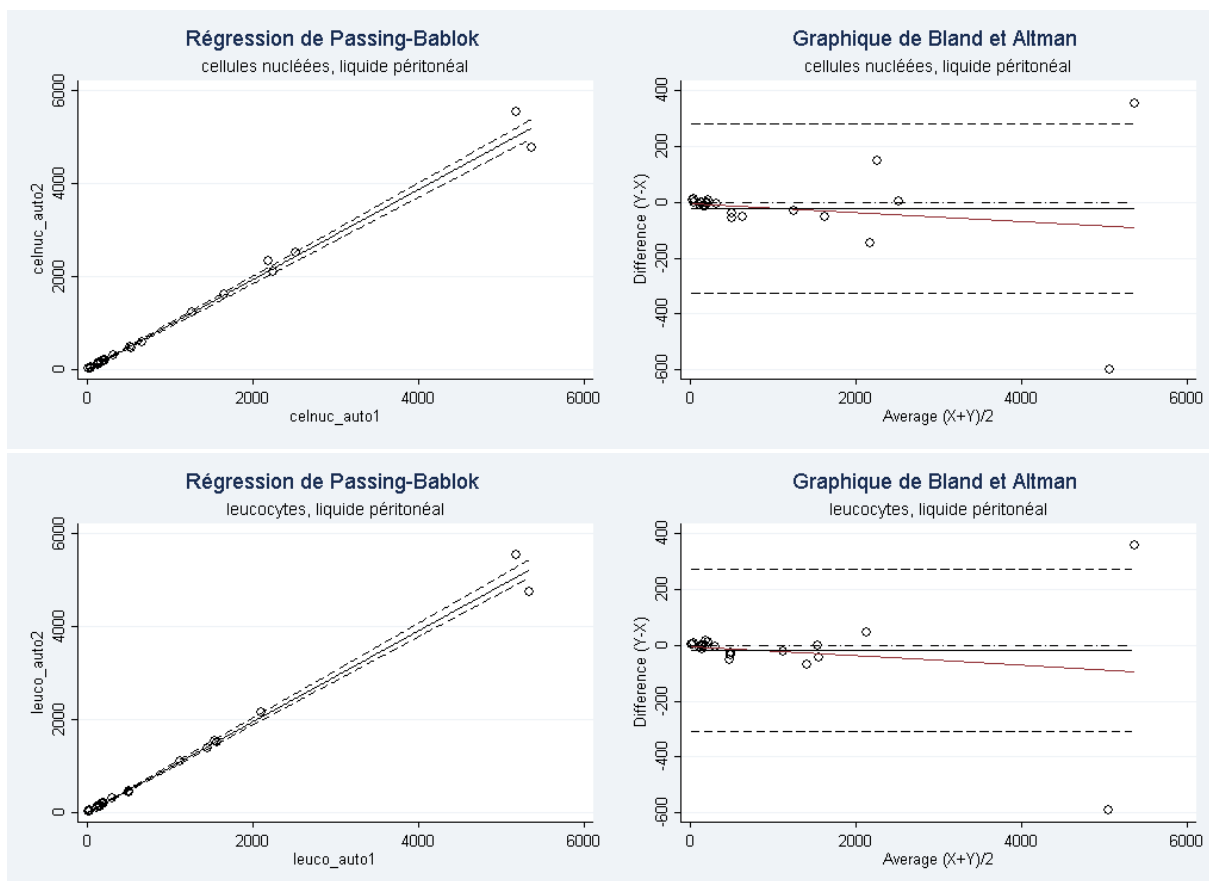
Liquide biologique	Cellules (médiane ± DIQ) (/μL)		p	Régression de Passing-Bablok		Analyse de Bland-Altman	Coefficient de concordance de Lin
	BC-6200 #2	BC-6200 #1		Pente (IC95%)	Intercept (IC95%)	Moyenne des différences (/μL) (IC95%)	
Liquide d'ascite (n = 23)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 23)	221 ± 1468	215 ± 1519	0.088	0.97 (0.93 à 1.00)	3 (-4 à 10)	-22 (-89 à 45)*	0.995
Leucocytes (n = 23)	221 ± 1249	209 ± 1319	0.128	0.98 (0.95 à 1.02)	2 (-5 à 6)	-19 (-83 à 45)*	0.995
PNN (n = 10)	40 ± 1162	37 ± 1133	0.646	1.02 (0.89 à 1.07)	1 (-6 à 5)	-22 (-157 à 113)*	0.995
Hématies (n = 23)	1000 ± 3000	1000 ± 3000	0.167	1.00 (0.98 à 1.00)†	0 (0 à 0)†	-348 (-846 à 151)*	0.997
Liquide pleural (n = 24)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 24)	920 ± 1205	965 ± 1225	<0,001	0.97 (0.96 à 0.99)	-3 (-14 à 12)	-41 (-74 à -8)*	0.997
Leucocytes (n = 24)	895 ± 976	933 ± 998	0.002	0.97 (0.96 à 1.00)	-2 (-14 à 12)	-34 (-67 à -1)*	0.997
PNN (n = 14)	197 ± 356	199 ± 355	0.017	0.93 (0.91 à 0.99)	3 (-7 à 10)	-31 (-70 à 8)*	0.997
Hématies (n = 24)	4000 ± 18500	4000 ± 18500	0.641	1.00 (0.97 à 1.04)	0 (0 à 26)	1583 (-8897 à 12064)*	0.999

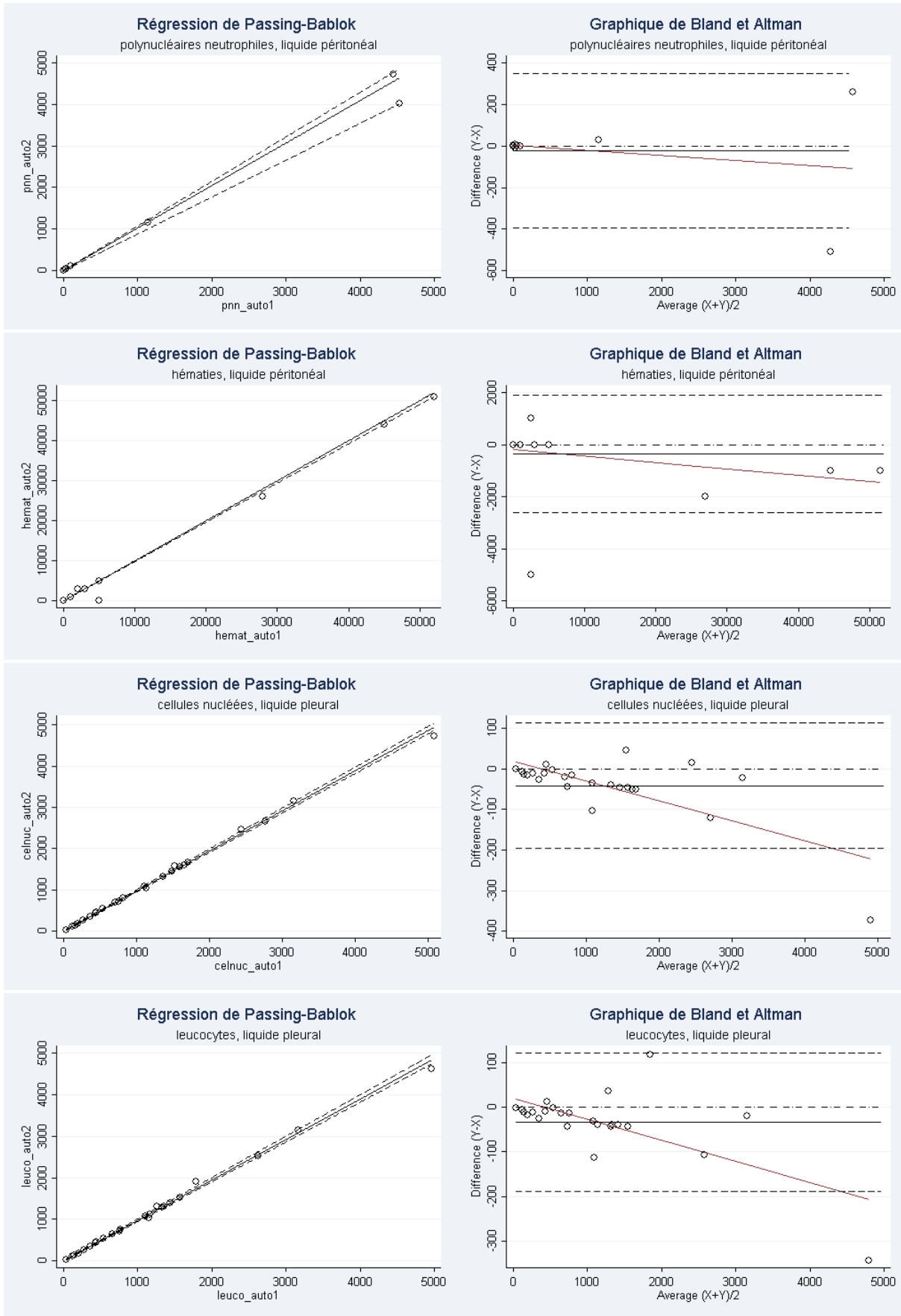
Liquide céphalo-rachidien (n = 29)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 29)	0 ± 1	0 ± 3	0.010	0.81 (0.33 à 1.00)	0 (0 à 0)	-23 (-68 à 22)*	0.978
Leucocytes (n = 29)	0 ± 0	0 ± 3	0.010	0.81 (0.33 à 1.7)	0 (0 à 0)	-23 (-67 à 22)*	0.979
Hématies (n = 29)	0 ± 0	0 ± 0	0.317	/	/	-34 (-105 à 36)*	0.651

DIQ : distance interquartile ; IC95% : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre d'échantillons ; PNN : polynucléaires neutrophiles

* : Condition d'application du test non respectée (distribution non normale selon le test de Shapiro-Wilk)

† : Condition d'application du test non respectée (relation non linéaire selon le test de CUSUM)





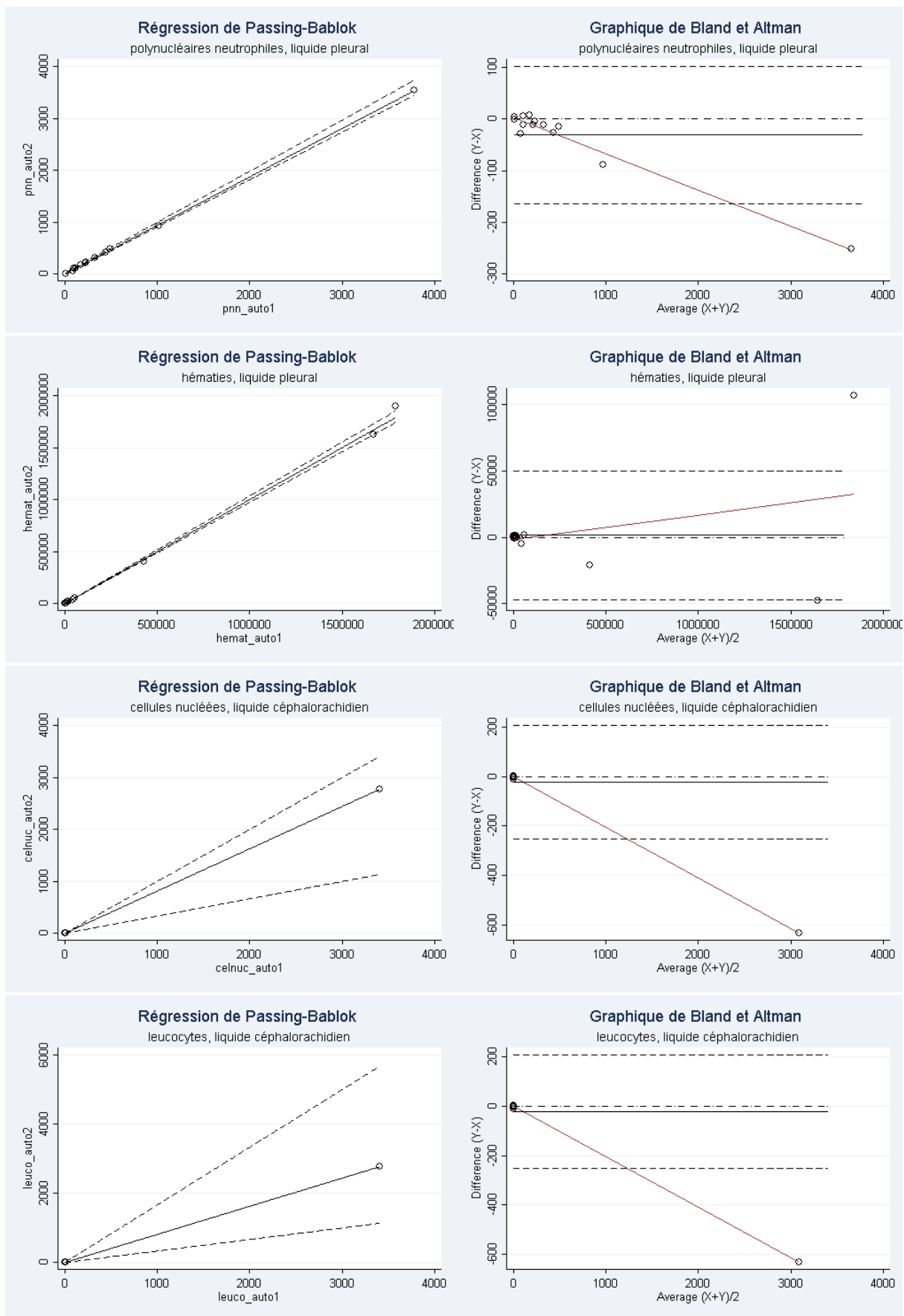


Figure 33 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et le BC-6200 #2
 Source : Logiciel Stata/SE 14.2

L'étude de concordance entre les deux automates est bonne. Il n'existe pas de différence significative pour les paramètres étudiés, pour tous les liquides.

IV.2.1.7. Limite de détection et limite de quantification

Tableau 24 : Limite de détection et limite de quantification calculées (BC-6200 #1)

Paramètre	Moyenne (/L)	Ecart-type (/L)	Limite de détection (/L)	Limite de quantification (/L)
TC-BF	$0,000 \times 10^9$	$0,000 \times 10^9$	$0,000 \times 10^9$	$0,001 \times 10^9$
GB-BF	$0,000 \times 10^9$	$0,000 \times 10^9$	$0,000 \times 10^9$	$0,001 \times 10^9$
GR-BF	$0,000 \times 10^{12}$	$0,000 \times 10^{12}$	$0,000 \times 10^{12}$	$0,000 \times 10^{12}$

Les données obtenues sont très satisfaisantes.

IV.2.1.8. Contamination inter-échantillons

Tableau 25 : Résultats de la contamination inter-échantillons (BC-6200 #1 et BC-6200 #2)

Paramètre	BC-6200 #1				BC-6200 #2			
	mH (/μL)	mB1 (/μL)	mB3 (/μL)	%	mH (/μL)	mB1 (/μL)	mB3 (/μL)	%
TC-BF	6189	0	0	0	6479	0	0	0
GB-BF	6069	0	0	0	6467	0	0	0

mH : moyenne des valeurs hautes (H) ; mB1 : moyenne des B1, mB3 : moyenne des B3 ; % : pourcentage de contamination ou indice de contamination

Le pourcentage de contamination a été comparé aux limites retenues par le laboratoire (1 % selon le fournisseur Menarini®).

La contamination est nulle et donc conforme aux spécifications du fournisseur.

IV.2.2. Vérifications bibliographiques

Les recommandations du fournisseur sont spécifiées dans le mode opératoire simplifié de Menarini® (45).

IV.2.2.1. Limites de linéarité

Les limites de linéarité annoncées par le fournisseur sont les suivantes : de 0 à $10,000 \times 10^9$ par litre (soit de 0 à $10,000 \times 10^3$ par μL) pour les paramètres TC-BF et GB-BF, et de $0,000$ à $5,000 \times 10^{12}$ par litre (soit de $0,000$ à $5,000 \times 10^6$ par μL) pour le paramètre GR-BF.

Les limites d'affichage annoncées par le fournisseur sont les suivantes : de $0,000$ à $999,999 \times 10^9$ par litre (soit de $0,000$ à $999,999 \times 10^3$ par μL) pour les paramètres TC-BF et GB-BF, et de $0,000$ à $99,999 \times 10^{12}$ par litre (soit de $0,000$ à $99,999 \times 10^6$ par μL) pour le paramètre GR-BF.

IV.2.2.2. Interférences et spécificités analytiques

Les interférences correspondent à une altération du signal de mesure pouvant conduire à des résultats erronés. Des interférences ont été décrites par le fournisseur pour le sang, mais pas pour les liquides de ponction. Cependant, le mode de prélèvement, le mode d'analyse et les canaux utilisés étant identiques, nous avons considéré que les liquides biologiques étaient soumis au même type d'interférences.

Une fausse diminution du nombre de leucocytes est essentiellement liée à l'agglutination des leucocytes entre eux ou avec des plaquettes en présence d'EDTA. A l'inverse, une numération faussement élevée peut avoir pour cause la présence d'agrégats plaquettaires, de plaquettes géantes, d'érythroblastos ou de cryoglobulines.

La numération des hématies peut être faussement augmentée par les fortes hyperleucocytoses (surtout hyperlymphocytoses) ou par la présence de plaquettes géantes. Elle peut être faussement diminuée en présence d'agglutinines froides ou par défaut de prise en compte des hématies de taille réduite (microcytes, schizocytes).

La présence de micro-organismes dans le sang et les liquides biologiques (bactéries et levures) peuvent souvent causer des problèmes d'interférences et provoquer notamment une surestimation du nombre de leucocytes et une anomalie du diagramme de dispersion DIFF (49).

IV.2.2.3. Robustesse et stabilité des réactifs

La robustesse d'une procédure d'analyse est définie comme étant la mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation (33).

Dans notre cas, les instruments et les réactifs sont utilisés selon les spécifications du fournisseur. Les automates et les différents réactifs doivent être à température ambiante entre 2 et 30°C avec un taux d'humidité inférieur à 90% . Les réactifs sont stables 60 jours après ouverture, à bord de l'automate. Les dates de péremption des réactifs (date de fabrication et date d'ouverture) sont gérées automatiquement par les instruments.

IV.2.2.4. Intervalles de référence et/ou valeurs seuils

Il n'existe pas de valeurs de références en tant que telles. Comme précisé dans la partie Généralités, les seuils décisionnels et stratégiques d'infection des différents liquides étudiés sont les suivants :

- Liquides d'ascite : $\text{PNN} > 250 / \text{mm}^3$ (ou $250 / \mu\text{L}$) (8)

- Liquides pleuraux : leucocytes > 1000 /mm³ (ou 1000 /μL) et PNN > 50 % (soit 500 /mm³ ou 500 /μL) (8)
- Liquides céphalo-rachidiens : leucocytes > 10 /mm³ (ou 10 /μL) et PNN > 50% (soit 5 /mm³ ou 5 /μL) (19)
- Liquides de DPCA : leucocytes > 100 /mm³ (ou 100 /μL) et PNN > 50 % (soit 50 /mm³ ou 50 /μL) (25)

IV.3. Maîtrise des risques

Les points critiques concernent les locaux et les conditions environnementales (agencement, température...), les réactifs (préparation, stabilité...), les équipements (respect des modes opératoires et instructions du fournisseur, maintenance, étalonnage, raccordement métrologique), le personnel (formation, évaluation des compétences...), la méthode (critères de performance), sans négliger les critères de qualité des échantillons analysés (33).

Les données de la maîtrise des risques ont été recueillies dans le SH FORM 43 présenté en annexe 2. Deux éléments particulièrement critiques ont été identifiés : la stabilité des échantillons dans le temps et les transports, compte-tenu de la configuration de notre laboratoire multisite, ainsi que l'analyse des scattergrammes des automates. Voici les résultats de notre analyse de ces facteurs.

▪ Stabilité des échantillons

Les tests de stabilité renseignent sur la capacité de l'analyseur à réaliser des analyses reproductibles sur des échantillons passés à différents moments de la journée.

Nous avons étudié l'évolution des résultats des dosages en fonction du temps pour deux liquides (un liquide pleural et un liquide céphalo-rachidien). Ces derniers ont été analysés à leur arrivée au laboratoire puis toutes les heures pendant 8 heures. Nous avons calculé le coefficient de variation correspondant.

Tableau 26 : Résultats de la stabilité (BC-6200 #1)

Paramètre	Liquide pleural		LCR	
	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	342	11,51	2877	8,22
GB-BF	325	9,53	2871	8,29
GR-BF	2800	15,97	0	/
PNN#	279	12,53	2428	8,01

m : moyenne des passages ; *CV* : coefficient de variation ; LCR : liquide céphalo-rachidien

Tableau 27 : Résultats de la stabilité (BC-6200 #2)

Paramètre	Liquide pleural		LCR	
	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	317	26,47	2808	12,15
GB-BF	303	24,39	2604	12,21
GR-BF	2500	23,09	0	/
PNN#	268	28,21	2200	11,72

m : moyenne des passages ; *CV* : coefficient de variation ; LCR : liquide céphalo-rachidien

Les *CV* (%) ne sont pas satisfaisants. Une diminution cellulaire entre le t0 et le t8h a été constatée pour le LCR pour le paramètre TC-BF (diminution de 19,58 % avec le BC-6200 #1 et de 54,20 % avec le BC-6200 #2) et pour le paramètre GB-BF (diminution de 19,91 % avec le BC-6200 #1 et de 54,75 % avec le BC-6200 #2). Les liquides doivent donc être traités le plus rapidement possible dès leur arrivée au laboratoire. Les échantillons de Villeneuve-sur-Lot ont tout intérêt à être analysés sur place.

▪ Evaluation des scattergrammes DIFF

La présence de l'alarme « Scatter GB anormal » signale l'impossibilité pour l'automate d'établir une formule correcte. Pour l'étude de la comparaison des polynucléaires neutrophiles, nous avons exclu les échantillons présentant cette alarme.

27 échantillons (14 liquides d'ascite et 13 liquides pleuraux) sur 101 ont généré un diagramme de dispersion DIFF anormal avec l'alarme « Scatter GB anormal », seule alarme du mode BF, avec les deux modules. 6 liquides (4 liquides d'ascite et 2 liquides pleuraux) parmi ces 27 ont montré la présence de cellules néoplasiques à l'examen anatomopathologique. Un liquide (liquide pleural) sans alarme a été rendu positif par le laboratoire d'Anatomopathologie, il s'agissait d'un lymphome folliculaire. Tous les échantillons présentant des cellules néoplasiques en Hématologie ont été confirmés par l'Anatomopathologie.

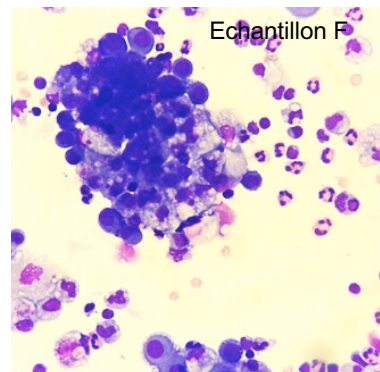
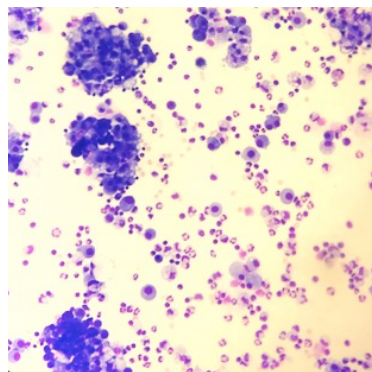
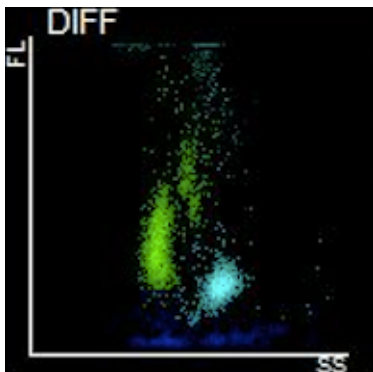
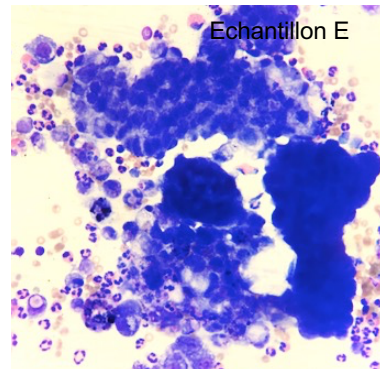
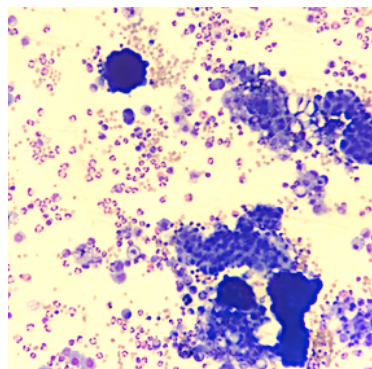
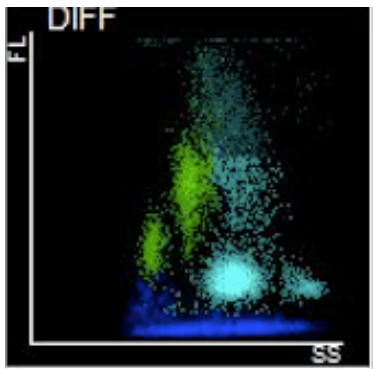
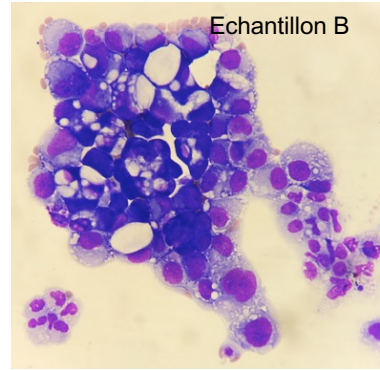
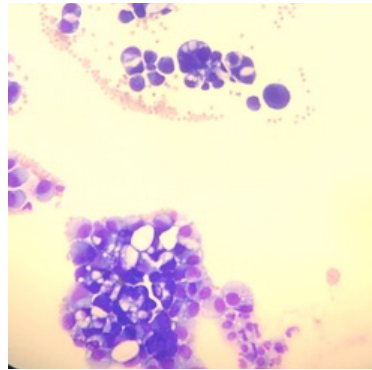
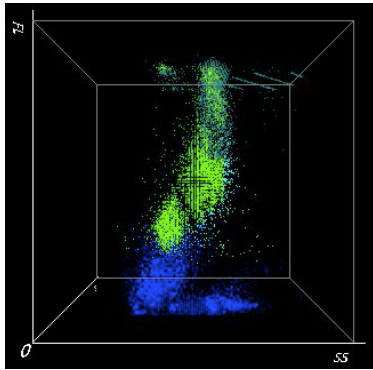
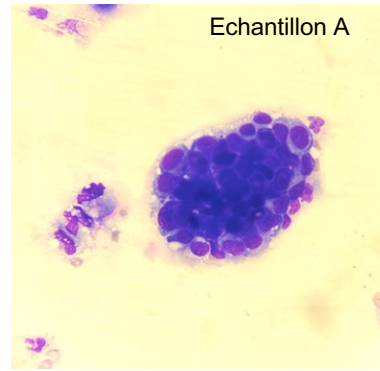
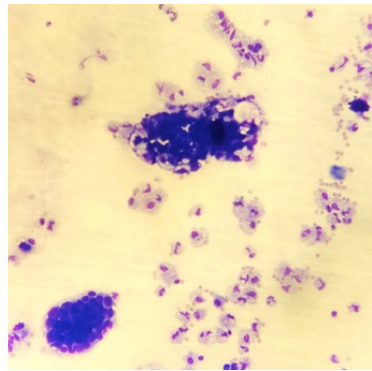
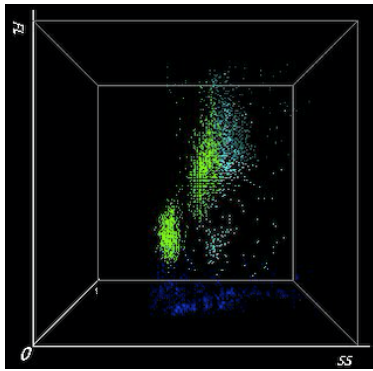
Tableau 28 : Caractéristiques des échantillons étudiés positifs en Anatomopathologie

Echantillon	Type de liquide	Diagnostic anatomopathologique	BC-6200 #1		BC-6200 #2	
			HF-BF# (/μL)	HF-BF% (%)	HF-BF# (/μL)	HF-BF% (%)
A	Liquides d'ascite	Carcinose péritonéale sur adénocarcinome ovarien	152	29,9	127	26,4
B		Carcinose péritonéale sur adénocarcinome ovarien	979	63,5	983	63,9
C		Carcinose péritonéale sur adénocarcinome ovarien	***	***	****	***
D		Carcinose péritonéale sur lésion hépatique droite	88	5,5	81	5,3
E	Liquides pleuraux	Localisation pleurale d'un adénocarcinome	419	23,4	/	/
F		Carcinome bronchopulmonaire	57	8,6	51	7,9
G		Lymphome folliculaire	4	0,1	1	0

**** : aucune valeur rendue par l'automate

Les liquides présentant l'alarme « Scatter GB anormal » avaient des valeurs de HF-BF# comprises entre 3 et 979 cellules par μL avec le BC-6200 #1 et des valeurs comprises entre 6 et 983 cellules par μL avec le module BC-6200 #2. Leur HF-BF% était compris entre 2,9 et 63,5 pour 100 GB-BF avec le BC-6200 #1 et entre 3,6 et 63,9 pour 100 GB-BF avec le BC-6200 #2.

Tous les échantillons avec plus de 5 % de HF-BF% pour 100 GB-BF généraient l'alarme « Scatter GB anormal ».



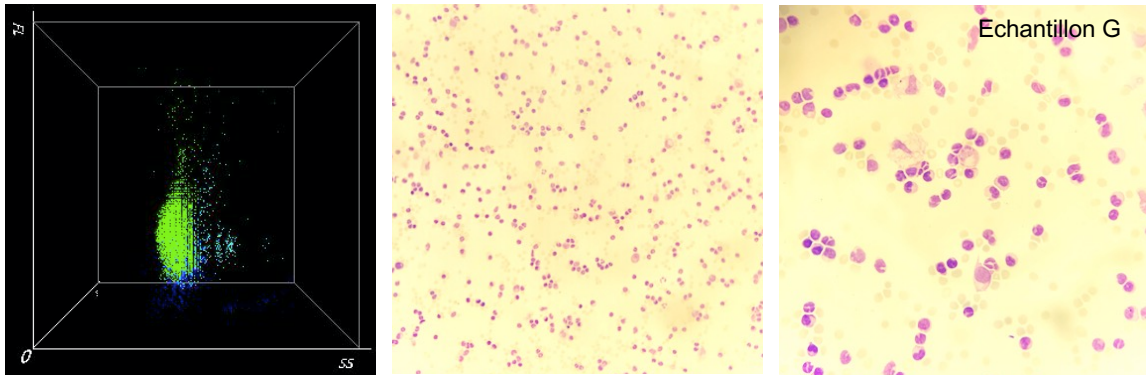


Figure 34 : Scattergrammes et images des étalements colorés au MGG (Objectifs 20 et 50) de quelques échantillons de liquides d'ascite et de liquides pleuraux présentant un scattergramme DIFF anormal

Source : Photographies personnelles

Les anomalies des graphes donnent des informations essentielles sur les cellules malignes potentielles (cellules de métastase, cellules lymphomateuses, cellules blastiques...).

IV.4. Vérification des performances appliquée aux liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire

- Répétabilité

Tableau 29 : Résultats de la répétabilité pour les liquides de DPCA (BC-6200 #1)

Paramètre	Niveau	Liquides de DPCA	
		<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	1	116	14,89
	2	3	41,04
GB-BF	1	114	14,84
	2	3	39,95
PNN#	1	27	19,51
	2	5	33,95

DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire ; *m* : moyenne des 10 passages ; *CV* : coefficient de variation

Les valeurs en gras se rapprochent des seuils décisionnels thérapeutiques.

Tableau 30 : Résultats de la répétabilité pour les liquides de DPCA (BC-6200 #2)

Paramètre	Niveau	Liquides de DPCA	
		<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	1	68	12,82
	2	5	34,82
GB-BF	1	67	12,44
	2	5	29,62
PNN#	1	26	27,58
	2	5	29,57

DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire ; *m* : moyenne des 10 passages ; *CV* : coefficient de variation

Les valeurs en gras se rapprochent des seuils décisionnels thérapeutiques.

Les coefficients de variation sont supérieurs à ceux obtenus pour les autres types de liquides.

- **Incertitude de mesure**

L'incertitude de mesure autour des valeurs seuils thérapeutiques a été étudiée en vérifiant la concordance entre la méthode automatique et la méthode de référence, pour le diagnostic d'infection du liquide de DPCA. Les seuils retenus sont les suivants : un nombre de cellules nucléées supérieur à 100 par μL et de polynucléaires neutrophiles supérieur à 50 par μL. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant. Pour chaque paramètre, la courbe ROC a été faite au seuil cité, et la sensibilité et la spécificité ont été calculées à ce seuil.

Tableau 31 : Validation de l'automate BC-6200 #1 pour le diagnostic de péritonite avec comme référence la méthode manuelle pour les liquides de DPCA

Liquide biologique	Valeur seuil (/μL)	Sensibilité (IC95%)	Spécificité (IC95%)	AUC (IC95%)	Kappa (IC95%)
Liquide de DPCA (n = 16)	Cellules nucléées > 100	0.80 (0.60 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	0.85 (0.52 à 1.00)
	PNN > 50	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)	1.00 (1.00 à 1.00)

IC95% : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre d'échantillons ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire

Les résultats suggèrent que le BC-6200 #1 est capable de classer correctement les liquides de DPCA.

- **Comparaison de méthodes**

Tableau 32 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #1 et la méthode manuelle pour les liquides de DPCA

Liquide biologique	Cellules (médiane ± DIQ) (/μL)			Régression de Passing-Bablok		Analyse de Bland-Altman	Coefficient de concordance de Lin
	BC-6200 #1	Méthode manuelle	p	Pente (IC95%)	Intercept (IC95%)	Moyenne des différences (/μL) (IC95%)	
Liquide de DPCA (n = 16)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 16)	6 ± 135	6 ± 199	0.816	0.89 (0.62 à 1.05)	0 (-1 à 3)	-3 (-34 à 27)*	0.996
PNN (n = 6)	33 ± 294	30 ± 199	0.173	1.15 (1.05 à 1.48)	-1 (-20 à 1)	57 (-58 à 173)*	0.987

DIQ : distance interquartile ; IC95% : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre d'échantillons ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire

* : Condition d'application du test non respectée (distribution non normale selon le test de Shapiro-Wilk)

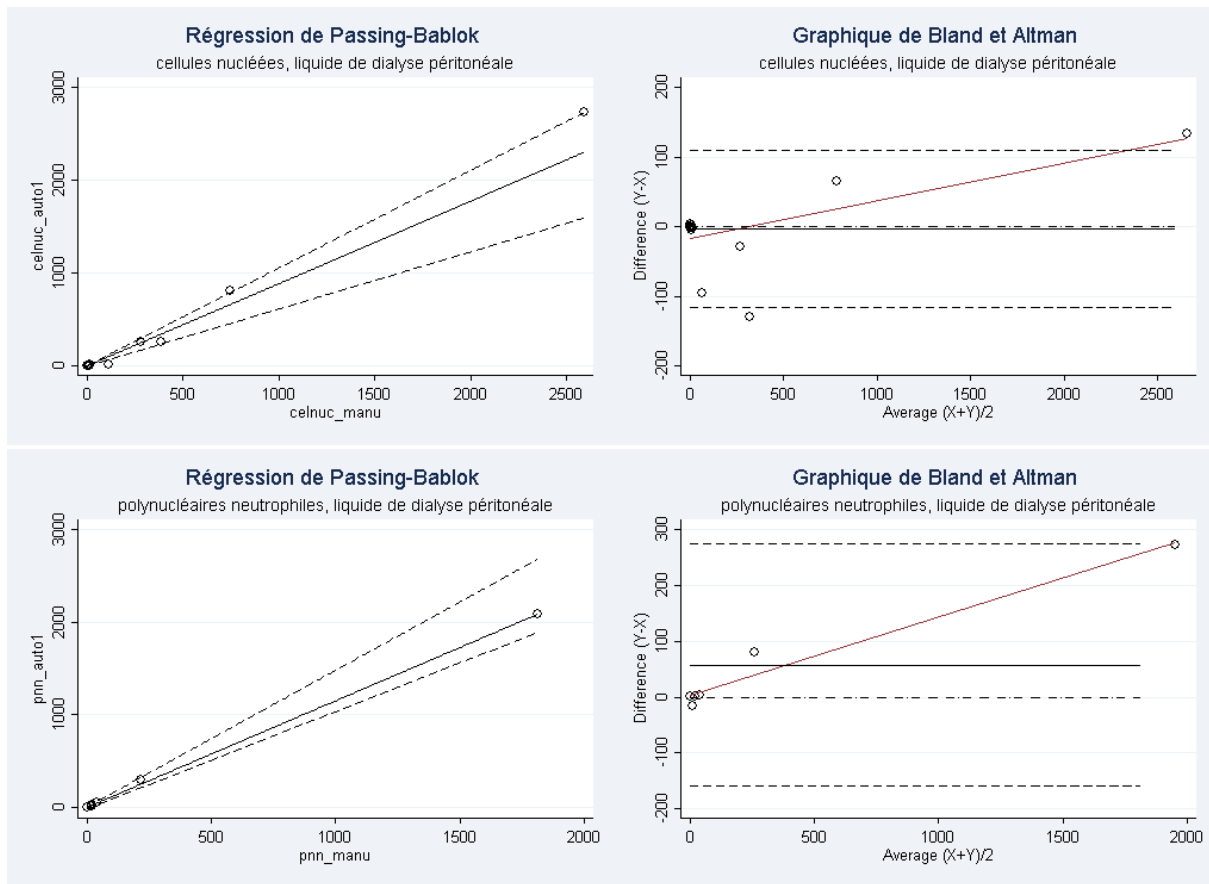


Figure 35 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et la méthode manuelle pour les liquides de DPCA
 Source : Logiciel Stata/SE 14.2

Aucune différence significative n'est retrouvée entre les deux méthodes de mesure pour la détermination des éléments nucléés et des polynucléaires neutrophiles.

Tableau 33 : Etude de la concordance entre le BC-6200 #2 et le BC-6200 #1 pour les liquides de DPCA

Liquide biologique	Cellules (médiane \pm DIQ) (/μL)			Régression de Passing-Bablok		Analyse de Bland-Altman	Coefficient de concordance de Lin
	BC-6200 #2	BC-6200 #1	p	Pente (IC95%)	Intercept (IC95%)	Moyenne des différences (/μL) (IC95%)	
Liquide de DPCA (n = 10)	-	-	-	-	-	-	-
Cellules nucléées (n = 10)	11 \pm 251	10 \pm 253	0.329	0.98 (0.96 à 1.00)	1 (-1 à 2)	-15 (-40 à 9)*	0.999
Leucocytes (n = 10)	11 \pm 249	10 \pm 249	0.719	0.97 (0.94 à 1.13)	1 (-1 à 2)	-12 (-38 à 14)*	0.999
PNN (n = 5)	50 \pm 258	44 \pm 277	0.586	0.95 (0.92 à 1.20)	3 (-3 à 10)	-20 (-74 à 33)*	0.999

DIQ : distance interquartile ; IC95% : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre d'échantillons ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire

* : Condition d'application du test non respectée (distribution non normale selon le test de Shapiro-Wilk)

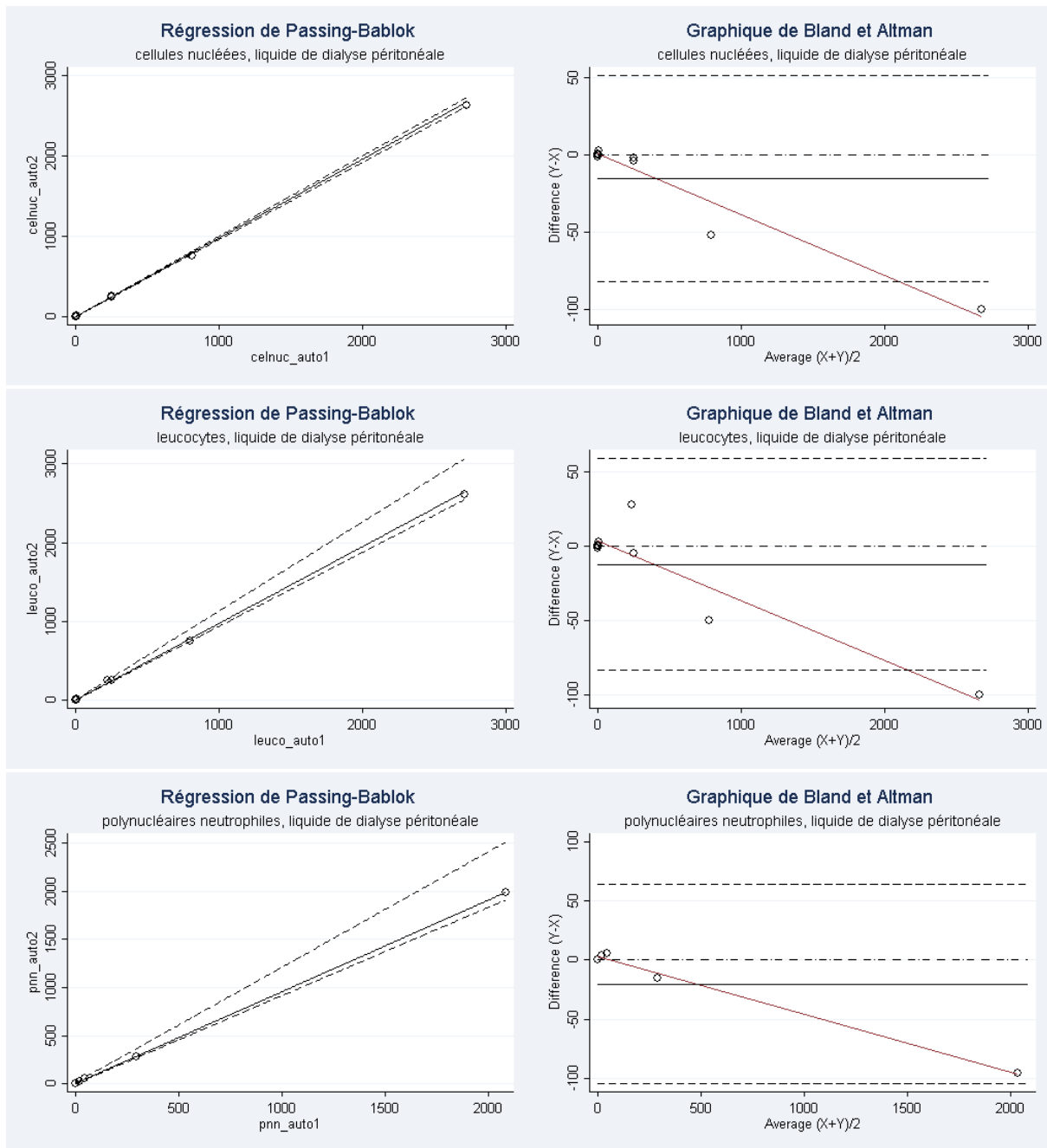


Figure 36 : Représentations graphiques de la concordance entre le BC-6200 #1 et le BC-6200 #2 pour les liquides de DPCA

Source : Logiciel Stata/SE 14.2

L'étude de comparaison entre le BC-6200 #1 et le BC-6200 #2 est très bonne, il n'est pas mis en évidence de différence significative entre les deux automates pour les paramètres étudiés.

- **Stabilité des échantillons**

Tableau 34 : Résultats de la stabilité pour les liquides de DPCA (BC-6200 #1 et BC-6200 #2)

Paramètre	BC-6200 #1		BC-6200 #2	
	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)	<i>m</i> (/μL)	<i>CV</i> (%)
TC-BF	205	12,37	212	10,24
GB-BF	200	13,39	206	11,17
GR-BF	0	/	0	/
PNN#	59	21,22	67	22,45

m : moyenne des passages ; *CV* : coefficient de variation

Les *CV* (%) ne sont pas optimaux. Une diminution cellulaire entre le t0 et le t8h a été constatée pour le paramètre TC-BF (diminution de 29,29 % avec le BC-6200 #1 et de 27,77 % avec le BC-6200 #2) et pour le paramètre GB-BF (diminution de 34,57 % avec le BC-6200 #1 et de 30,53 % avec le BC-6200 #2). Les liquides doivent donc être traités le plus rapidement possible dès leur arrivée au laboratoire. Les échantillons de Villeneuve-sur-Lot ont tout intérêt à être analysés sur place.

IV.5. Application au laboratoire et impact sur les délais de rendu des résultats

IV.5.1. Situation actuelle : prise en charge des liquides biologiques en journée et en période de permanence des soins

Actuellement, le laboratoire polyvalent du Centre Hospitalier Agen-Nérac analyse par méthode manuelle les liquides biologiques suivants : liquides céphalo-rachidiens (LCR), liquides d'ascite (ou liquides péritonéaux), liquides pleuraux, liquides articulaires et liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA).

Tableau 35 : Estimation du nombre de liquides analysés au CHAN sur un an

Site	Liquides d'ascite	Liquides pleuraux	Liquides céphalo-rachidiens	Liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire	Total
Agen	114	126	260	36	536
Villeneuve-sur-Lot	58	62	14	0	134
Total	172	188	274	36	670

Ces liquides sont analysés la journée de 8h à 20h. Seuls les LCR sont traités 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Le week-end, les autres liquides sontensemencés dans des flacons d'hémoculture lors du prélèvement, la cytologie n'est réalisée que sur demande expresse du prescripteur.

Comme détaillé précédemment, la numération cellulaire se fait dans la pièce d'ensemencement (J0). Lorsque le nombre d'éléments nucléés est supérieur ou égal à 10 par μL , une formule est réalisée. La cytocentrifugation du liquide a lieu aussi au J0, alors que la coloration et la lecture de l'étalement coloré au MGG sont prises en charge au poste d'Hématologie situé dans une autre pièce du laboratoire.

IV.5.2. Comparaison des délais

L'ensemble du processus, depuis la réception au laboratoire jusqu'à la mise à disposition du résultat pour le prescripteur, a été analysé. Le scan de la maquette de résultats vaut validation technique et mise à disposition du résultat. 101 liquides ont été analysés par méthode manuelle et par méthode automatisée.

Pour la méthode manuelle, le délai de rendu des résultats a été déterminé comme l'intervalle de temps entre l'enregistrement sur le SIL et la validation technique. En cas de numération seule, les résultats ont été rendus en moyenne en 1h20, la médiane se situait à 1h12 (les temps allant de 27 minutes à 3h14) ; en cas de formule associée, les résultats ont été rendus en moyenne en 3h53, la médiane se situait à 3h09 (les temps allant de 57 minutes à 20h38).

Pour la méthode automatisée, le temps nécessaire pour obtenir un résultat de numération seule a été estimé comme la somme des temps suivants : le temps entre l'enregistrement et le début de la prise en charge technique (début du montage de la chambre de comptage) (1 heure) et le temps nécessaire pour que l'automate rende la numération (3 minutes). En cas de formule associée, il faut ajouter le temps entre le début de réalisation de la cytocentrifugation et la validation technique (2h27), dans la mesure où la formule par l'automate ne sera pas rendue au clinicien. On pourrait donc estimer ce temps à 3h30.

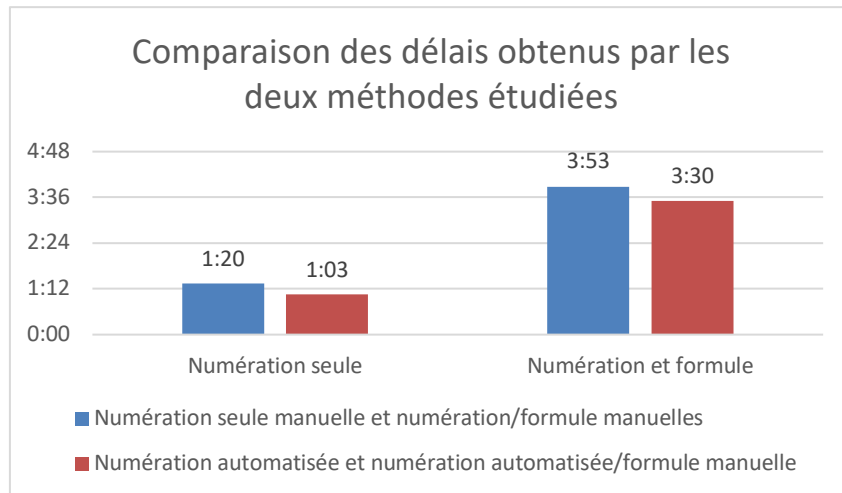


Figure 37 : Histogramme représentant les délais de rendu des résultats obtenus par les deux méthodes étudiées

Le temps technique de la numération (délai entre le début de montage de la chambre de comptage et la fin de la lecture de la chambre de comptage) par la méthode manuelle a été estimé en moyenne à 14 minutes, la médiane étant située à 15 minutes (les temps allant de 5 minutes à 35 minutes). La sédimentation des éléments cellulaires de la chambre de comptage a été estimée en moyenne à 8 minutes, avec une médiane à 5 minutes (les temps allant de 2 minutes à 30 minutes). 6 minutes ont été en moyenne nécessaires pour le comptage *stricto sensu* de la chambre de comptage, avec une médiane à 5 minutes (les temps allant de 1 minute à 20 minutes). Le temps technique a été réduit à 3 minutes lors de l'analyse par l'automate (2 minutes pour changer de mode d'analyse et 1 minute pour l'analyse proprement dite). L'automate réalise la numération et la formule au cours d'un seul et même passage.

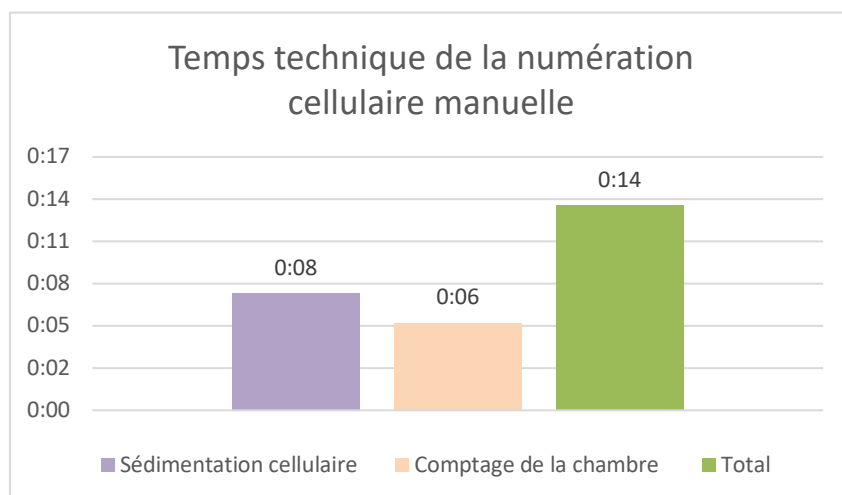


Figure 38 : Histogramme représentant le temps technique de la numération cellulaire manuelle

Le temps technique de la formule (délai entre le début de la réalisation de la cytopspin et la fin de la lecture du frottis coloré au MGG) par la méthode manuelle a été estimé en

moyenne à 2h29, la médiane se situait à 1h50 (les temps allant de 50 min à 25h14). L'étape de cytocentrifugation a pris 10 minutes, la coloration MGG par l'automate 30 minutes. 8 minutes ont été en moyenne nécessaires pour la lecture du frottis coloré au MGG avec une médiane à 5 minutes (les temps allant de 2 minutes à 45 minutes). Il a été noté de nombreux temps morts entre les différentes étapes, comme peut l'illustrer l'histogramme suivant.

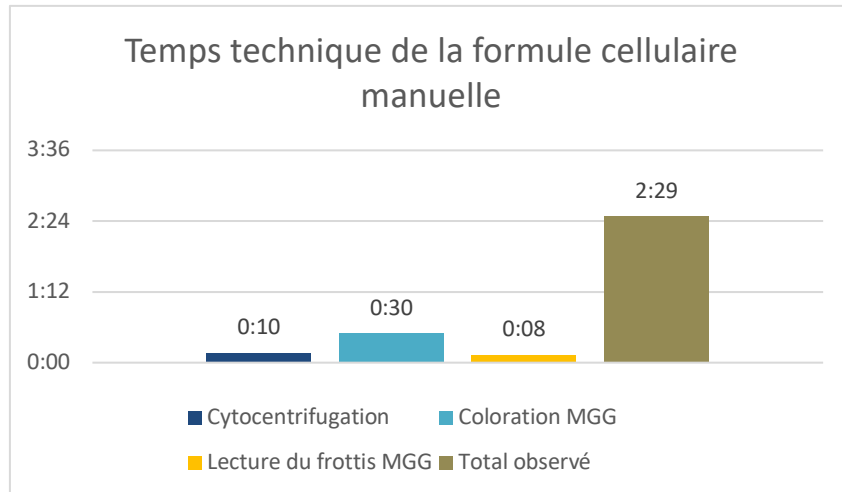


Figure 39 : Histogramme représentant le temps technique de la formule cellulaire manuelle

Lorsqu'une formule est associée à la numération, le temps technique total (délai entre montage de la chambre de comptage et la fin de la lecture du frottis coloré au MGG) par méthode manuelle a été estimé en moyenne à 2h37, avec une médiane à 2h05 (les temps allant de 50 minutes à 25h14). Ce temps n'est pas la somme des temps techniques de la numération et de la formule, dans la mesure où les différentes étapes ne se succèdent pas, mais sont réalisées en parallèle.

En associant méthode automatisée pour la numération et méthode manuelle pour la formule, on pourrait imaginer un temps technique de 2h29 (formule manuelle) plus le temps technique automate de 3 minutes (numération automatisée) en moyenne, soit un total de 2h32.

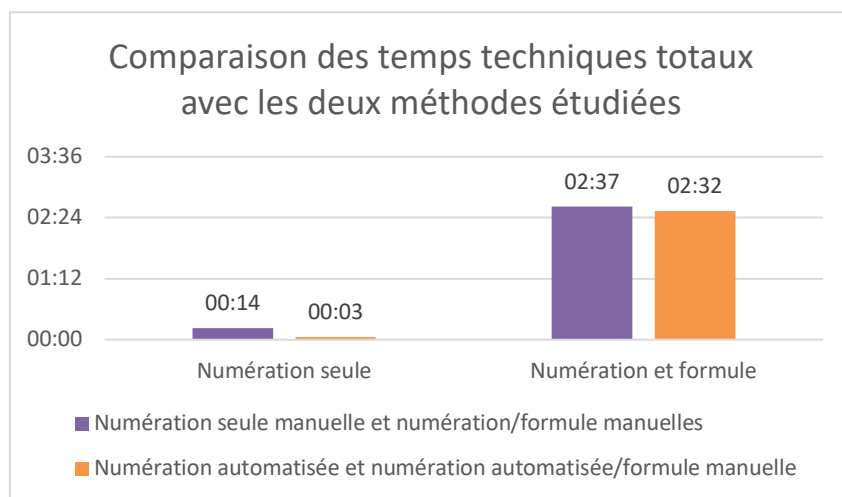


Figure 40 : Histogramme représentant le temps technique total des deux méthodes étudiées

Discussion

La réalisation de la numération des liquides biologiques corporels et l'établissement d'une formule de façon automatisée présentent théoriquement plusieurs avantages par rapport à la méthode manuelle : reproductibilité des résultats (pas de variabilité inter-opérateur), décompte d'un plus grand nombre de cellules, diminution du temps d'analyse, débit plus important, court délai d'exécution, formation plus facile pour les techniciens (haut niveau d'expertise nécessaire pour la méthode manuelle), absence de préparation ou de dilution des échantillons. De plus, la transmission automatique des résultats vers le SIL diminue les erreurs post-analytiques (27). Les analyseurs automatisés sont soumis régulièrement à des contrôles de qualité pour assurer leur bon fonctionnement, alors que les chambres de comptage ne sont pas soumises à ces contrôles. L'automatisation réduit l'exposition au risque biologique des utilisateurs (50). Les automates utilisent un volume d'échantillon plus grand que celui des chambres de comptage, ce qui permet le décompte d'un plus grand nombre de cellules et améliore la précision et l'exactitude.

Pendant, cette méthode automatisée présente un certain nombre d'inconvénients : volume d'échantillon nécessaire plus important, absence d'alarmes spécifiques détectant la présence de cellules anormales et formule de recherche non validée par le fabricant. De plus, certains auteurs ont décrit des interférences avec des particules non cellulaires (bactéries, levures...) sur les automates Sysmex® (49). Une imprécision pour les valeurs basses est souvent décrite (26).

Un bon automate d'Hématologie cellulaire permettant l'analyse des liquides biologiques par son mode BF présentera les fonctionnalités suivantes : un temps court de transition entre le mode sanguin et le mode BF (amélioration des délais d'exécution), aucune exigence de dilution des liquides (amélioration de la précision et de l'efficacité), un rapport TC-BF sur GB-BF différent de 1 (amélioration de la précision du compte des leucocytes), un compte différentiel excluant les cellules tissulaires (amélioration de la précision des comptes différentiels), le déclenchement d'une alarme pour les échantillons avec des distributions cellulaires anormales (amélioration de la détection des cellules malignes), une détermination du nombre d'hématies avec des chiffres plus significatifs que le mode sanguin (amélioration de la précision pour les faibles numérations d'hématies et l'évaluation des ponctions traumatiques) et un temps de comptage étendu pour les liquides pauvres en cellules (amélioration de la précision pour un faible nombre de cellules) (51). La contrainte principale des analyseurs d'Hématologie pour l'analyse des liquides biologiques est la matrice de ces fluides qui est différente de celle du sang total (52).

Cette étude a permis d'évaluer les performances analytiques du mode BodyFluid™ (BF) de l'automate BC-6200 de Menarini® pour l'analyse des liquides d'ascites, des liquides pleuraux, des liquides céphalo-rachidiens (LCR) et des liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA). Seuls les trois premiers types de liquides sont validés par le fabricant. Les liquides articulaires (ou synoviaux) n'ont pas été étudiés, en raison de leur viscosité potentielle, bien que des résultats prometteurs pour ces liquides ont été décrits par Buoro et al. (53). L'analyse automatisée des liquides biologiques avec mode spécifique est encore aujourd'hui peu répandue en France et dans le monde. Très peu de laboratoires utilisent le mode BF du BC-6200, cet automate ayant été mis récemment sur le marché, en 2017. Le BC-6800 a été distribué par Menarini® en 2012. Le mode BF est utilisé par environ 15 laboratoires en France, pour la plupart hospitaliers.

Les données de répétabilité des paramètres TC-BF, GB-BF, GR-BF et PNN# obtenues avec les deux BC-6200 pour les liquides d'ascite et les liquides pleuraux sont satisfaisantes et similaires à celles obtenues en 2016 avec le BC-6800 dans la publication de Buoro et al. (54).

La reproductibilité a été évaluée, d'une part, grâce aux contrôles internes de qualité (CIQ) du mode sanguin validant le mode BF ; les résultats obtenus sont très bons. Elle a été déterminée, d'autre part, grâce aux CIQ spécifiques du mode BF. Pour le niveau bas des GB-BF et pour les GR-BF, les CV obtenus sont supérieurs à ceux préconisés par le fournisseur Eurocell® et à ceux observés pour les CIQ sanguins. Cependant, nous avons peu de valeurs. De plus, le mode de passage est particulier (mode manuel ouvert uniquement, nécessité d'une homogénéisation importante avant le passage sur l'automate). La reproductibilité pourrait être améliorée par une meilleure appréhension du passage des CIQ BF par les utilisateurs.

La justesse a été évaluée sur la base de l'externalisation des données des CIQ sanguins, le groupe de pairs pour les CIQ BF étant insuffisant. Les données obtenues sont très satisfaisantes.

L'exactitude a pu être étudiée grâce à quatre données d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour les paramètres GB-BF et GR-BF. Les résultats sont comparables à ceux du groupe de pairs.

Nos essais de contamination pour les paramètres TC-BF et GB-BF ont été satisfaisants et aussi performants que ceux annoncés dans la littérature. Buoro et al. (54) ont décrit un indice de contamination à 0 % pour les liquides d'ascite et les liquides pleuraux.

Les limites de détection et de quantification sont satisfaisantes pour les paramètres TC-BF, GB-BF et GR-BF.

L'incertitude de mesure a été calculée grâce aux données des CIQ BF et des EEQ. De plus, elle a été estimée autour des valeurs seuils thérapeutiques en vérifiant la concordance entre la méthode automatique et la méthode de référence. Pour les liquides d'ascite, les résultats sont très bons, en revanche, pour les liquides pleuraux, au seuil de PNN à 500 par μL , la sensibilité est égale à 50 %. Cependant, les cliniciens résonnent plus sur la prédominance de PNN par rapport aux autres cellules pour interpréter les liquides pleuraux, et non sur un seuil précis comme pour les liquides d'ascite. De plus, on aurait obtenu une meilleure sensibilité si les seuils avaient été fixés selon une méthode automatisée. Une analyse des risques a, d'autre part, pu être effectuée.

L'étude de concordance entre le mode BF du BC-6200 et la méthode microscopique a montré un bon accord pour l'analyse des éléments nucléés, des polynucléaires neutrophiles et des hématies pour les liquides d'ascite et les liquides pleuraux. Pour les cellules nucléées, notamment dans les liquides d'ascite, les différences entre les deux méthodes de mesure ont tendance à être plus importantes lorsque les valeurs sont hautes, probablement du fait des difficultés de comptage en manuel lorsqu'il y a beaucoup d'éléments (dilution, nombre de carrés comptés, cellules néoplasiques exclues ou pas...). La numération des hématies aux faibles concentrations n'est pas optimale. Un léger biais positif a été observé pour les cellules nucléées et les polynucléaires neutrophiles des liquides d'ascite, comme décrit par Buoro et al. (54). Cependant, ce biais n'a pas modifié le classement de ces liquides. Lorsque le nombre de cellules nucléées était extrêmement bas, ce biais était certainement dû à un bruit de fond ou à la présence de débris cellulaires (51), bien que les limites de détection et de quantification soient très basses. Pour les échantillons avec plus de cellules, ce biais peut être expliqué par la perte de cellules lors de la centrifugation ou la détérioration à température ambiante,

notamment des polynucléaires neutrophiles labiles, en technique manuelle (1). Un biais négatif a été observé pour les hématies des liquides d'ascite et pleuraux. Il n'a été montré aucune différence entre les résultats rendus par les deux automates BC-6200 #1 et BC-6200 #2 pour les deux types de liquides et pour tous les paramètres.

La détection des cellules malignes reste un obstacle au remplacement total de l'analyse manuelle par la méthode automatisée. Lorsque la malignité du liquide biologique n'est pas cliniquement suspectée et que les échantillons ne sont pas soumis à l'analyse anatomopathologique, le laboratoire d'Hématologie se trouve en première ligne pour détecter les cellules malignes. Par conséquent, ce dernier doit être capable de détecter les cellules néoplasiques, même si ce n'est pas suspecté ou demandé par les cliniciens (55). Le nombre de cellules classées dans le groupe de cellules hautement fluorescentes (HF-BF) est significativement corrélé à la présence de cellules mésothéliales et/ou de cellules néoplasiques. Selon le type de liquide biologique, il serait intéressant de déterminer un seuil pour lequel la présence de cellules néoplasiques est hautement probable (56).

Concernant les LCR, l'essai de répétabilité n'a pas pu être fait par manque de volume. Buoro et al. (57) ont décrit un indice de contamination à 0,3 % pour les échantillons de LCR. Les données de concordance entre le mode BF du BC-6200 et la méthode manuelle montrent des résultats moins bons que ceux des liquides d'ascite et des liquides pleuraux. Ils peuvent être expliqués par le faible effectif de notre étude ainsi que par la moindre cellularité de ces liquides. Les études de corrélation des méthodes ont effectivement tendance à être biaisées par un nombre de cellules extrêmement bas (51). Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les résultats rendus par les deux automates.

Les limites actuelles de précision pour les faibles numérations de globules rouges posent des obstacles à une acceptation plus large des méthodes automatisées, notamment pour les LCR. En effet, l'automate BC-6200 peut détecter les globules rouges (GR-BF) à partir de 1000 par μL . En dessous, l'automate rend 0 par μL . Le paramètre de recherche GR-BF(R) permet de les détecter à partir de 100 par μL . Le nombre de cellules est extrêmement plus faible dans le LCR que dans le sang. Les bons résultats obtenus pour les liquides d'ascite et pleuraux sont expliqués par le nombre de cellules plus élevé dans ces liquides que dans le LCR (58). La numération des globules rouges est cependant utile aux cliniciens pour le diagnostic de l'hémorragie intracrânienne. Dans ce cas, le nombre d'hématies est généralement suffisamment élevé pour être dénombré par l'analyseur avec une précision adéquate pour l'interprétation clinique. Par contre, le BC-6200 n'arrive pas à compter les hématies aux faibles concentrations et pourrait ainsi passer à côté d'une ponction légèrement traumatique (contamination de l'échantillon par du sang périphérique). Le sang périphérique introduit dans l'échantillon par une ponction traumatique peut conduire à une mauvaise interprétation de la source des différentes cellules : leucocytes, cellules métastatiques... Il n'y a cependant pas d'accord largement accepté sur le nombre de globules rouges définissant une ponction traumatique (51). Une étude de validation du paramètre de recherche GR-BF(R), permettant de disposer d'une numération à partir de 100 globules rouges par μL , est nécessaire pour envisager l'utilisation de la technique automatisée.

Les limites de référence actuelles utilisées en pratique courante ont été déterminées il y a des décennies en utilisant la méthode manuelle. La documentation est insuffisante pour connaître la manière dont les valeurs seuils ont été choisies. La détermination de nouvelles valeurs de référence semble indispensable pour optimiser l'utilisation de techniques automatisées et ainsi les démocratiser (26).

Concernant les liquides de DPCA, les performances sont globalement satisfaisantes par rapport à nos critères (peu de littérature à ce sujet). La présence d'hématies dans ces liquides est rare et la numération du paramètre GR-BF ne présente pas d'intérêt diagnostique, ce paramètre n'a donc pas été évalué. Les résultats de répétabilité des paramètres TC-BF et GB-BF sont moins bons que ceux des liquides d'ascite et pleuraux, probablement en raison du faible nombre de cellules contenues dans ces liquides. Il n'existe pas de recommandations du fournisseur pour ces liquides. Nous sommes concordants avec la publication de Fuster et al. (1). Ces derniers ont, d'autre part, obtenu un indice de contamination à 0,05 % pour les liquides de DPCA (1). Aucune différence significative n'a été retrouvée entre la méthode manuelle et la méthode automatisée pour l'analyse des éléments nucléés et des polynucléaires neutrophiles. Les deux automates rendent des résultats similaires. De plus, le BC-6200 a classé correctement les liquides de DPCA dans les deux catégories (infection / absence d'infection du dialysat).

Par conséquent, les performances attendues du mode BF de nos automates sont satisfaisantes pour leur utilisation en routine dans un laboratoire polyvalent avec un recrutement majoritairement en vue d'un diagnostic infectieux et peu de suivis hématologiques. Les cliniciens de l'hôpital s'intéressent en effet avant tout à la numération des leucocytes ou des éléments nucléés et des polynucléaires neutrophiles dans les liquides, pour le diagnostic d'infection. Afin de confirmer nos résultats, d'autres études devraient inclure un plus grand nombre d'échantillons pour chaque type de fluide corporel.

Les économies de coût potentielles grâce à l'analyse automatisée sont largement attribuables à la réduction du temps technique. Une étude a calculé un coût moyen d'analyse de la numération à 1,22 euros avec la méthode automatisée (Sysmex®) et à 6,74 euros avec la méthode manuelle (59). Si le BC-6200 est utilisé seulement pour l'analyse des liquides biologiques, l'automate n'est pas avantageux par rapport à la méthode manuelle (59). Ce point n'est pas critique pour notre laboratoire, compte-tenu du volume d'échantillons à traiter.

Un des grands défis de l'analyse automatisée des liquides biologiques réside dans le fait que l'analyse cytologique manuelle de ces liquides s'effectue au laboratoire de Microbiologie, alors que la numération cellulaire automatisée est une fonction disponible sur les automates d'Hématologie. La technique manuelle, réalisée par du personnel de Bactériologie aguerri au comptage cellulaire, n'est pas si chronophage, mais nécessite une rigueur et des automatismes pas toujours faciles à atteindre lorsque le personnel est plus polyvalent. Dans la configuration de notre laboratoire du CHAN, le fait d'utiliser la technique automatisée permettrait de regrouper les étapes de numération cellulaire et de formule sur le secteur d'Hématologie. L'irruption de la pandémie de COVID-19 en mars 2020 n'a malheureusement pas permis la mise en place de la technique afin d'évaluer précisément le gain de temps dans un flux de routine. D'autre part, les BC-6200 étant utilisés 24 h sur 24 par du personnel formé sur les NFS et l'interprétation des scattergrammes, un gain qualitatif est attendu en termes d'interprétation cytologique. De plus, l'utilisation éventuelle du paramètre de recherche PNN# pourrait avoir un intérêt pour pallier le temps technique de la formule manuelle afin d'améliorer significativement le rendu des résultats, notamment en garde.

Enfin, dans l'organisation du GCS multisite HOSPILAB47, une réflexion sur une nouvelle organisation dans le flux de la prise en charge des liquides au laboratoire pourrait être envisagée en exploitant le mode BF sur les BC-6200 des deux sites. Actuellement, les prélèvements sont acheminés trois fois par jour vers Agen (30 minutes), mais il est parfois nécessaire en cas d'urgence de faire appel à une navette dédiée. L'utilisation de la technique

automatisée permettrait de s'affranchir du temps de transport pour les échantillons prélevés à Villeneuve-sur-Lot et d'améliorer le service médical rendu, en particulier en période de permanence des soins.

Les liquides d'ascite et les liquides pleuraux prélevés dans les services cliniques sur tube EDTA et reçus au laboratoire de chaque site pourraient, tout d'abord, être analysés sur le BC-6200. Les paramètres rendus aux cliniciens seraient la numération des leucocytes (GB-BF), des éléments nucléés (TC-BF) et des hématies (GR-BF). En fonction des résultats des cellules nucléées obtenus, la formule serait réalisée ensuite manuellement. Le paramètre PNN# pourrait être une aide pour l'orientation diagnostique en donnant les informations semi-quantitatives suivantes au technicien en poste en Hématologie : formule à prédominance de PNN ou formule à prédominance de lymphocytes. En cas de formule à PNN, l'étalement de cytocentrifugation coloré au MGG devrait alors être lu au microscope optique en urgence. Sinon, la lecture par le biologiste pourrait être différée. L'interprétation des graphes par un opérateur qualifié est alors primordiale. La lecture de l'étalement coloré au MGG permet d'établir la formule cytologique et de rechercher la présence de cellules anormales. A la lecture au microscope optique, seraient identifiés : les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les lymphocytes et l'ensemble monocytes / autres cellules. Ces différentes populations seraient rendues en pourcentage et en valeur absolue calculée à partir de la valeur TC-BF. Les cellules atypiques seraient signalées par un commentaire biologique et donc exclues de la formule.

Conclusion

L'analyse cytologique des fluides corporels fournit des informations essentielles pour le diagnostic de certaines pathologies et le traitement des patients. Dans la plupart des laboratoires, cette analyse se fait par méthode manuelle grâce à la microscopie optique qui est la méthode de référence. Toutefois, cette technique présente des inconvénients motivant de nombreux fabricants à développer des méthodes automatisées.

La constructeur Mindray® a ainsi développé un mode analytique pour l'hématimètre BC-6200 dédié à l'analyse de certains liquides biologiques. La numération cellulaire des leucocytes, des cellules nucléées et des hématies des liquides d'ascite, des liquides pleuraux et des liquides céphalo-rachidiens peut être réalisée de manière automatisée par cet analyseur, ainsi qu'une approche de la formule leucocytaire.

Notre travail a permis de montrer que la numération cellulaire des leucocytes (GB-BF), des cellules nucléées (TC-BF) et des hématies (GR-BF) des liquides d'ascite et des liquides pleuraux pouvait être rendue aux cliniciens, le paramètre de recherche PNN# apportant une aide diagnostique. Pour les liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire, la technique automatisée peut être utilisée pour la numération des GB-BF. Concernant les liquides céphalo-rachidiens, les performances de la numération cellulaire notamment des globules rouges sont insuffisantes. Ces liquides devront continuer à être analysés par méthode manuelle. Malgré les bonnes performances analytiques du paramètre PNN# observées dans notre étude, l'automate ne peut pas remplacer complètement la microscopie manuelle. L'intégration des deux méthodes reste la meilleure solution.

Par conséquent, il paraît intéressant de tester les systèmes analytiques dans leur intégrité afin de ne pas sous-exploiter en routine les ressources déjà disponibles au laboratoire. Notre étude s'est donc inscrite dans une démarche d'amélioration continue des performances des systèmes analytiques existants.

Références bibliographiques

1. Fuster O, Andino B, Pardo A, Laiz B. Continuous ambulatory peritoneal dialysis, ascitic and pleural body fluids evaluation with the Mindray BC-6800 hematology analyzer. *J Clin Lab Anal.* 2017;32(2):e22240.
2. Gérard D. Liquides d'épanchements : analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux [Thèse d'exercice]. [Nancy]: Université de Nancy, Faculté de Pharmacie; 2017.
3. Bourner G, De la Salle B, George T, Tabe Y, Baum H, Culp N, et al. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *Int Jnl Lab Hem.* 2014;36(6):598-612.
4. Carrier P, Jacques J, Debette-Gratien M, Legros R, Sarabi M, Vidal E, et al. L'ascite non liée à la cirrhose : physiopathologie, diagnostic et étiologies. *La Revue de Médecine Interne.* 2014;35(6):365-71.
5. Grangé J-D. Conduite à tenir devant une ascite. *EMC-Hépatogastro-entérologie.* 2005;2(4):297-306.
6. Ginés P, Quintero E, Arroyo V, Terés J, Bruguera M, Rimola A, et al. Compensated cirrhosis : Natural history and prognostic factors. *Hepatology.* 1987;7(1):122-8.
7. Ascite. Support de cours. Université Médicale Virtuelle Francophone [Internet]. Campus Cerimes. 2009 [cité 12 avr 2020]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/hepatogastro-entérologie/enseignement/item298/site/html/cours.pdf>
8. Granger T, Jeanne G. Biologie des liquides d'épanchement. *Biomérieux;* 2006.
9. Grangé J-D, Amiot X. Antibio prophylaxie de l'infection du liquide d'ascite. *Gastroenterol Clin Biol.* 1998;22(1):301-4.
10. Zarski J-P. Ascite (orientation diagnostique) [Internet]. Faculté de Médecine de Grenoble, Corpus Médical. 2003. Disponible sur: <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/hepgastro/hepato/hp2/leconimprim.pdf>
11. Alric L. Ascite non cirrhotique. *Post'u.* 2016;91-97.
12. Grabau CM, Crago SF, Hoff LK, Simon JA, Melton CA, Ott BJ, et al. Performance Standards for Therapeutic Abdominal Paracentesis. *Hepatology.* 2004;40(2):484-8.
13. Epanchement pleural. Collège des enseignants de Pneumologie [Internet]. Collège des enseignements de Pneumologie. 2015 [cité 19 juill 2020]. Disponible sur: http://cep.splf.fr/wp-content/uploads/2015/01/item_202_EPANCHT_PLEURAL.pdf
14. Light RW. Pleural Effusions : The Diagnostic Separation of Transudates and Exudates. *Ann Intern Med.* 1972;77(4):507-13.
15. Joseph J, Badrinath P, Basran GS, Sahn SA. Is the pleural fluid transudate or exudate ? A revisit of the diagnostic criteria. *Thorax.* 2001;56(11):867-70.
16. Vibert J-F. Le liquide céphalo-rachidien [Internet]. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie. Disponible sur:

http://umvf.cerimes.fr/media/ressWikinu/Neurophysiologie/Neurophysiologie_UPMC/2007-neurophysio-LCR-jfv.pdf

17. Girard S, Fenneteau O, Mestrallet F, Troussard X, Lesesve J-F. Recommandations pour l'analyse du liquide céphalorachidien au cours des leucémies aiguës. *Ann Biol Clin.* 2017;75(5):503-12.
18. Haute Autorité de Santé. Recommandation de bonne pratique. Prévention et prise en charge des effets indésirables pouvant survenir après une ponction lombaire [Internet]. HAS. 2019 [cité 21 sept 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-07/fm_ponction_lombaire.pdf
19. Denis F, Ploy M-C, Martin C, Cattoir V. *Bactériologie Médicale*. 3^e éd. Elsevier Masson; 2016.
20. Haute Autorité de Santé. Ponction lombaire. Modalités de réalisation et recommandations pour en limiter les effets secondaires [Internet]. HAS. 2019 [cité 21 sept 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-07/infographie_ponction_lombaire.pdf
21. Haute autorité de santé. Dialyse péritonéale et hémodialyse : informations comparatives [Internet]. HAS. 2017 [cité 2 août 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-09/tableau_comparatif_modes_suppleance_renale.pdf
22. Haute Autorité de Santé. Recommandations professionnelles. Indications et non-indications de la dialyse péritonéale chronique chez l'adulte [Internet]. HAS. 2007 [cité 2 août 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2008-10/dialyse_peritoneale_chronique_chez_ladulte_-_argumentaire.pdf
23. France Rein. Fiche Pratique. La dialyse péritonéale [Internet]. France Rein. 2017 [cité 2 août 2020]. Disponible sur: <https://www.francerein.org/files/MEDIAS/Fiches%20pratiques/MEDICAL/36-fiche-pratique-france-rein-la-dialyse-peritoneale.pdf>
24. Beaudreuil S, Hebibi H, Charpentier B, Durrbachr A. Les infections graves chez les patients en dialyse péritonéale et en hémodialyse chronique conventionnelle : péritonites et infections de la voie d'abord vasculaire. *Réanimation.* 2008;17(3):233-41.
25. Szeto CC. The new ISPD peritonitis guideline. *Ren Replace Ther.* 2018;4(1):4-7.
26. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, de Jonge R. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(11):1689-706.
27. Lippi G, Cattabiani C, Benegiamo A, Gennari D, Pavesi F, Caleffi A, et al. Evaluation of white blood cell count in peritoneal fluid with five different hemocytometers. *Clinical Biochemistry.* 2013;46(1):173-6.
28. Sandhaus LM. Is the Hemocytometer Obsolete for Body Fluid Cell Counting ? *Am J Clin Pathol.* 2016;145(3):294-5.
29. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [Internet]. JORF n°0012 du 15 janvier 2010. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=id>

30. AFNOR. Laboratoires de biologie médicale. Exigences concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189, 2012.
31. ISO 9000:2015(fr), Systèmes de management de la qualité — Principes essentiels et vocabulaire [Internet]. ISO. 2015 [cité 9 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9000:ed-4:v2:fr>
32. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin*. 2010;68(Hors série n°1):247-94.
33. SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 01. Avril 2015 [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
34. Accueil COFRAC - Comité français d'accréditation [Internet]. COFRAC. 2020 [cité 2 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/>
35. SH REF 02 : Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870. Révision 06. Juin 2019 [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>
36. SH REF 08 : Expression et évaluation des portée d'accréditation. Révision 06. Décembre 2019 [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
37. SH GTA 01 : Guide technique d'accréditation en biologie médicale. Révision 02. Novembre 2018 [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-01>
38. SH GTA 06 : Guide technique d'accréditation : contrôle technique de qualité en biologie médicale. Révision 00. Juin 2012 [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
39. SH GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. Révision 00. Octobre 2011 [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>
40. SH FORM 43 : Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. Révision 01. Avril 2015.
41. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques [Internet]. [cité 8 févr 2020]. Disponible sur: http://www.asqualab.com/documents/publications/articles_et_posters/articles/Specifications_normes_acceptabilite_validation_techniques.pdf
42. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario J-V et al. Desirable Specifications for Total error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:491-500.
43. KOVA Glasstic Slide 10 with Grids - Diagnostic Tests and Clinical Products, Diagnostic Tests and Controls [Internet]. Fischer Scientific. [cité 12 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.fishersci.com/shop/products/kova-international-kova-glasstic-slide-10-slide-ii-slide-10-with-1mm-grids-etched-the-center-each-well/22270141>


44. Vallet C. Formation Opérateur niveau 2 CAL 6000. 2018.
45. Mode opérateur simplifié Menarini.
46. Perneger T, Perrier A. Analyse d'un test diagnostique : courbe ROC, ou « receiver operating characteristic ». *Rev Mal Respir.* 2004;21(2):398-401.
47. Fuhrman C, Chouaïd C. Concordance de deux variables : les approches numériques. *Rev Mal Respir.* 2004;21(1):123-5.
48. Journois D. Concordance de deux variables : l'approche graphique. *Rev Mal Resp.* 2004;21(1):127-30.
49. Omuse G, Makau P. Interference of cerebrospinal fluid white blood cell counts performed on the Sysmex XT-4000i by yeast and bacteria. *Int Jnl Lab Hem.* 2013;35(6):e5-7.
50. Favresse J, Boland L, Schellen M, Fervaille C, Wuestenberghs F, Camboni A, et al. Two-site evaluation of a new workflow for the detection of malignant cells on the Sysmex XN-1000 body fluid analyzer. *Int J Lab Hematol* [Internet]. [cité 1 sept 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijlh.13187>
51. Sandhaus LM. Body Fluid Cell Counts by Automated Methods. *Clin Lab Med.* 2015;35(1):93-103.
52. Fleming C. From Manual Microscopy to Automated Cell Counters for First Line Screening of Body Fluids « But not without a special body fluid mode » [Thèse de doctorat]. [Rotterdam]: Erasmus Universiteit Rotterdam; 2016.
53. Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, Mecca T, Candiago E, Vidali M, et al. Reliability of automated synovial fluid cell counting with Mindray BC-6800 body fluid mode. *Int Jnl Lab Hem.* 2017;39(3):337-46.
54. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, Seghezzi M, Candiago E, Gianatti A, et al. Mindray BC-6800 body fluid mode, performance of nucleated cells, and differential count in ascitic and pleural fluids. *Int Jnl Lab Hem.* 2016;38(1):90-101.
55. Labaere D, Boeckx N, Geerts I, Moens M, Driessche MV den. Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(5):715-22.
56. Buoro S, Seghezzi M, Dominoni P, Moioli V, Manenti B, Previtali G, et al. Lack of harmonization in high fluorescent cell automated counts with body fluids mode in ascitic, pleural, synovial, and cerebrospinal fluids. *Int J Lab Hematol.* 2019;41(2):1-10.
57. Buoro S, Seghezzi M, Mecca T, Vavassori M, Crippa A, La Gioia A. Evaluation of Mindray BC-6800 body fluid LCR. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(11):1799-810.
58. Danise P, Maconi M, Rovetti A, Avino D, Di Palma A, Gerardo Pirofalo M, et al. Cell counting of body fluids : comparison between three automated haematology analysers and the manual microscope method. *Int Jnl Lab Hem.* 2013;35(6):608-13.
59. Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, Heppner FL, Weimann A. Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts : a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs–Rosenthal manual counting chamber. *Clin Chem Lab Med.* 2011;33(6):629-37.


Annexes

Annexe 1. Mode opératoire du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200	112
Annexe 2. Maîtrise des risques du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200 selon le SH FORM 43	113
Annexe 3. Renseignements recueillis pour chaque liquide étudié	123

Annexe 1. Mode opératoire du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200

Les différentes étapes pour analyser un liquide biologique corporel sur l'automate sont les suivantes :

- Presser le bouton « Switch » du BC-6200 #1 ou du BC-6200 #2. La trappe du mode manuel s'ouvre
- Sélectionner le mode CT-BF
- Renseigner l'identifiant échantillon à l'aide du clavier
- Décocher « Obtenir auto. Mode test »
- Mélanger 10 fois le tube par retournement successifs. Ne pas vortexer
- Déboucher le tube ou garder le bouchon
- Mettre le tube dans son emplacement
- Cliquer sur « OK »
- La porte se referme automatiquement et le blanc se fait
- La porte s'ouvre. Presser le bouton Start «  » pour lancer l'analyse
- Dès que la porte s'ouvre, retirer le tube et appuyer à nouveau sur le bouton « Switch » pour revenir en mode automatique (AL-WB)
- Vérifier que l'instrument soit de nouveau en mode AL-WB dans l'écran de sélection des modes

Pour passer à la suite plusieurs liquides biologiques, il suffit de mettre le nouvel échantillon dans son emplacement, de rentrer les nouvelles données et de presser le bouton Start «  » pour lancer l'analyse. Le blanc ne se fait pas.

Annexe 2. Maîtrise des risques du mode BodyFluid™ de l'automate BC-6200 selon le SH FORM 43

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
Matière (échantillons)	Identité	G=4 F=2 D=3	24	Formation et information du personnel (service clinique et laboratoire) Contacter le service pour demander un nouveau prélèvement si incohérence (non-conformité : NC)	Procédure d'identitovigilance du laboratoire Sensibilisation des professionnels de santé Critères d'acceptation/de refus Sensibilisation des techniciens et des biologistes au signalement de la non-conformité (dans le dossier des patients) : IO 21.05.06 : Gestion des non-conformités pré-analytiques AN 21.02.01 : Conduite à tenir devant une non-conformité pré-analytique IO 21.02.01 : Critères d'acceptation et de refus pré-analytiques Les NC sont enregistrées à la réception. Les critères sont appliqués par le personnel à l'accueil.
	Préparation du patient	G=4 F=2 D=3	24	Information des patients et des préleveurs	Instructions de prélèvement (manuel de prélèvement, en ligne à la disposition des préleveurs) AN 21.06.05 : Manuel de prélèvement des échantillons primaires Lexique des analyses

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
	Type de contenants	G=4 F=2 D=1	8	<p>Formation des préleveurs</p> <p>LCR et DPCA : flacon stérile Liquides d'ascite et liquides pleuraux : tube EDTA et flacon stérile</p> <p>Contacteur le service pour demander un nouveau prélèvement si incohérence (non-conformité : NC)</p>	<p>Instructions de prélèvement : Manuel de prélèvement, en ligne à la disposition des préleveurs AN 21.06.05 : Manuel de prélèvement des échantillons primaires Lexique des analyses Bons de demande</p> <p>Sensibilisation des professionnels de santé</p> <p>Critères d'acceptation/de refus Sensibilisation des techniciens et des biologistes au signalement de la non-conformité (dans le dossier des patients) Traitement des non-conformités des prélèvements : IO 21.05.06 : Gestion des non-conformités pré-analytiques AN 21.02.01 : Conduite à tenir devant une non-conformité pré-analytique IO 21.02.01 : Critères d'acceptation et de refus pré-analytiques Les NC sont enregistrées à la réception. Les critères sont appliqués par le personnel à l'accueil.</p> <p>Conditions vérifiées à l'accueil et modalités concernant la réception des échantillons PR 21.02 : Réception des échantillons biologiques AN 21.08.07 : Délais pré-analytiques des prélèvements en Bactériologie</p> <p>Des conventions ont été signées avec les directions des soins, il y est précisé l'importance du respect du manuel de prélèvement et du lexique. PR 37.01 : Les contrats et les conventions au laboratoire</p>

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
	Nature et volume de l'échantillon	G=4 F=2 D=1	8	<p>Contrôle à la réception : prélèvement en quantité insuffisante ou non conforme</p> <p>Contacter le service pour demander un nouveau prélèvement (non-conformité : NC)</p>	<p>Instructions de prélèvement Manuel de prélèvement, en ligne à la disposition des préleveurs AN 21.06.05 : Manuel de prélèvement des échantillons primaires Lexique des analyses Bons de demande</p> <p>Sensibilisation des professionnels de santé</p> <p>Critères d'acceptation/de refus Sensibilisation des techniciens et des biologistes au signalement de la non-conformité (dans le dossier des patients) Traitements des non-conformités des prélèvements IO 21.05.06 : Gestion des non-conformités pré-analytiques AN 21.02.01 : Conduite à tenir devant une non-conformité pré-analytique IO 21.02.01 : Critères d'acceptation et de refus pré-analytiques Les NC sont enregistrées à la réception. Les critères sont appliqués par le personnel à l'accueil.</p> <p>Conditions vérifiées à l'accueil et modalités concernant la réception des échantillons PR 21.02 : Réception des échantillons biologiques AN 21.08.07 : Délais pré-analytiques des prélèvements en Bactériologie</p>
	Délai et température avant traitement analytique	G=4 F=2 D=3	24	<p>Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)</p> <p>Acheminement au laboratoire le plus rapidement possible pour analyse</p>	<p>Respect des critères de conservation des échantillons avant analyse PR 21.07 : Prétraitement des échantillons biologiques PR 21.08 : Conservation des échantillons biologiques avant analyse 21.08.06 : Prises en charge des prélèvements de Bactériologie AN 21.07.01 : Délais pré-analytiques des prélèvements en Bactériologie</p>

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
	Prétraitement : centrifugation...	G=4 F=2 D=3	24	Etiquetage des tubes Dispatching des échantillons Homogénéisation Pas de centrifugation	Formation du personnel Respect des critères de conservation des échantillons avant analyse PR 21.07 : Prétraitement des échantillons biologiques PR 21.08 : Conservation des échantillons biologiques avant analyse 21.08.06 : Prise en charge des prélèvements de Bactériologie AN 21.07.01 : Délais pré-analytiques des prélèvements en Bactériologie L'homogénéisation du prélèvement figure dans le mode opératoire de l'automate
	Interférences	G=3 F=2 D=3	18	Formation des préleveurs Contrôle à réception Connaissance de l'automate	Instruction de formation du personnel Mode opératoire de l'automate

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (température...)	G=4 F=1 D=3	12	Métrologie. Suivi des enceintes Conditions de température dans les zones de stockage	Instructions de conservation Utilisation d'échantillons respectant les préconisations du fournisseur : respect de la stabilité de l'échantillon donnée dans la fiche technique et les modes opératoires PR 21.08 : Conservation des échantillons avant analyse PR 22.06 : Conservation des échantillons après analyse (critères de ré-analyse définis) Formation et habilitation du personnel Enregistrements métrologiques : suivi des températures des pièces et des enceintes réfrigérées (sondes)

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (température...)	G=4 F=2 D=2	16	<p>Métrologie. Suivi des enceintes</p> <p>Réactifs</p> <p>Contrôles de qualité internes (CIQ)</p> <p>Contrôles de qualité externes (EEQ)</p> <p>Vérification :</p> <ul style="list-style-type: none"> - De la date de péremption et de la date limite d'utilisation après ouverture - Des conditions de reconstitution - Des conditions de conservation avant et après ouverture 	<p>Instructions de conservation</p> <p>Zone de stockage (réserve) et enceinte thermique (congélateur, frigo) surveillée quotidiennement en température par une sonde étalonnée</p> <p>PR 34.02 : Gestion de la métrologie</p> <p>IO 34.02.01 : Gestion des alarmes de température</p> <p>AN 34.02.01 : Spécification métrologique au laboratoire</p> <p>Préparation des réactifs et utilisation des réactifs dans les délais de stabilité annoncés par le fournisseur, par les sociétés savantes.</p> <p>La date d'ouverture des flacons est notée sur le conditionnement. Les flacons en cours sont identifiés par une croix sur le bouchon.</p> <p>Réactif stable et éliminé dès la fin de la date de stabilité.</p> <p>Les durées d'utilisation sont inférieures aux délais préconisés compte tenu de la charge de travail.</p> <p>Impossibilité de déstocker un produit périmé</p> <p>CIQ : stable après ouverture</p>

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	G=4 F=2 D=2	16	Conditions environnementales (statiques et/ou dynamiques dans le temps) <ul style="list-style-type: none"> - Emplacement de l'automate à l'abri de la lumière directe du soleil - Température ambiante : 2 à 30°C - Automate sur une table ou paillasse horizontale stable et sans vibrations pouvant supporter environ 500 kg - Analyse des échantillons à température ambiante - Poste informatique aussi proche que possible de l'automate 	Exigences par rapport au manuel d'utilisation du fournisseur Enregistrements des conditions environnementales : - Suivi en continu des températures (sonde étalonnée) par le logiciel Sirius - Pièce climatisée - Vérification de la température ambiante avant mise en routine de l'automate PR 34.02 : Gestion de la métrologie Nettoyage régulier et entretien quotidien du laboratoire PR 36.09 : Entretien des locaux et du matériel FE 36.09.06 : Traçabilité, entretien et désinfection des paillasses et des téléphones Locaux conformes pour les conditions de travail au regard de la charge de travail
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau	G=3 F=1 D=3	9	Mesure de la résistivité et de la stérilité	Traçabilité des vérifications Formation du personnel
	Surveillance des dérives	G=4 F=2 D=3	24	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement...) Suivi des CIQ et des EEQ	Enregistrements des maintenances Maintenances de routine réalisées selon les recommandations du fournisseur Traçabilité métrologique Réalisation périodique des CQI fournisseur Programme EEQ cytologie des liquides biologiques Eurocell Formation initiale du personnel et réévaluation périodique Mode opératoire à disposition
	Contamination	G=4 F=2 D=3	24	Respect des conditions opératoires du fournisseur Contamination inter-échantillons	Formation et habilitation du personnel Essai de contamination réalisé sur site

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
5M	Points critiques	Echelle de criticité		Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Informatique embarquée	G=4 F=1 D=3	12	Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données	<p>Enregistrements des jeux d'essai Sauvegarde régulière</p> <p>Formation du personnel en cas de procédure dégradée : panne du SIL IO 35.01.09 : Procédure dégradée du SIL</p> <p>Suivi d'une procédure en cas de panne automate IO 34 .01.01 : Procédure dégradée en cas de panne d'un automate AN 34.01.01 : Répartition des paramètres en cas de panne</p> <p>Maîtrise du SIL PR 35.01 : Gestion du SIL Vérification de la saisie</p> <p>Vérification des paramétrages et des connexions informatiques IO 35.01.11 : Vérification des connexions Inlog FE 35.01.04 : Fiche de suivi des connexions sur Inlog</p> <p>Sauvegardes des données informatisées La base de données des patients est hébergée chez Sigems, hébergeur de santé agréé IO 23.04.01 : Vérification de l'intégrité des données conservées par le SIL Inlog</p>
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	G=4 F=2 D=2	16	Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	<p>Fiches fournisseur Traçabilité métrologique PR 34.02 : Gestion de la métrologie AN 34.02.01 : Spécification métrologique au laboratoire</p>

MAITRISE DES RISQUES					
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)					
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
	Gestion des stocks	G=2 F=2 D=2	8	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks Enregistrement d'une non-conformité Renvoi au fournisseur et nouvelle commande	Formation du personnel Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison) par Sapanet PR 33.01 : Gestion des achats PR 33.02 : Achats de réactifs et consommables MO 33.02.01 : Etat des stocks MO 33.02.03 : Gestion d'une commande sur Sapanet MO 33.02.04 : Réception d'une commande via Sapanet
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	G=4 F=2 D=2	16	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution Formation du personnel
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences...)			Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences Sensibilité, spécificité	Voir SH GTA 04 §(41) Références bibliographiques du fournisseur
	Causes d'incertitude de mesure			Calcul des incertitudes de mesure	Voir SH GTA 04 §9.6.1.5
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	G=4 F=3 D=2	24	Formation et évaluation des compétences du personnel Plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure	Enregistrements des compétences du personnel Traçabilité de l'occupation des postes de travail Fiche de poste Fiche de fonction Fiche de tutorat, d'évaluation, d'habilitation des techniciens et des biologistes PR 32.01 : Gestion du personnel PR 32.02 : Gestion des formations du personnel PR 32.03 : Gestion des compétences du personnel Fiche de poste liquide de ponction, habilitation, grille d'évaluation, maintien des compétences La gestion des plannings et du temps de travail est en place et permet une organisation adéquate des postes.

La criticité de chaque risque a été évaluée selon le mode de calcul ci-dessous.

Niveau	Gravité (G) en cas d'apparition du risque	Fréquence (F) du risque	DéTECTABILITÉ (D) en cas d'apparition du risque
1	Pas grave : pas d'impact sur les performances de la méthode	Rarement : moins d'une fois par trimestre	Connu
2	Peu grave : impact en termes de coût (perte de temps, gaspillage)	Parfois : une fois par mois	Facile à détecter
3	Grave : impact sur la qualité des résultats	Souvent : une fois par semaine	Difficile à détecter
4	Très grave : impact sur la qualité du résultat et sur les performances de l'automate	Toujours : à chaque utilisation de la méthode	Non détectable

Le risque brut et l'indice de criticité sont définis de la façon suivante :

$$\text{Risque brut} = \text{Fréquence } F \times \text{Gravité } G$$

$$\text{Indice de criticité} = \text{Risque brut} \times \text{DéTECTABILITÉ } D$$

G \ F	1	2	3	4
1	1	2	3	4
2	2	4	6	8
3	3	6	9	12
4	4	8	12	16

RB \ D	1	2	3	4	6	8	9	12	16
1	1	2	3	4	6	8	9	12	16
2	2	4	6	8	12	16	18	24	32
3	3	6	9	12	18	24	27	36	48
4	4	8	12	16	24	32	36	48	64

Des moyens de maîtrise devront obligatoirement être mis en œuvre pour les indices de criticité supérieurs à 12 afin de rendre le risque acceptable.

Maîtrise M	Niveaux
Non maîtrisé	1
Maîtrisé avec risque de défaillance fort	2
Maîtrisé avec risque de défaillance faible	4
Totalement maîtrisé	6

La criticité pondérée se définit comme suit :

$$\text{Criticité pondérée} = \frac{\text{Criticité brute}}{\text{Maîtrise}}$$

Si, après mise en œuvre d'un moyen de maîtrise, l'indice de criticité pondérée est toujours supérieur à 12, un indicateur devra surveiller l'élément en question.

Annexe 3. Renseignements recueillis pour chaque liquide étudié

Liquide biologique N°

Etiquette

Type de liquide

- Liquide d'ascite
- Liquide pleural
- LCR
- Liquide de DPCA

Aspect du liquide

- Eau de roche
- Clair
- Citrin
- Hémorragique
- Xanthochromique
- Trouble
- Légèrement trouble

Site prescripteur

- Agen
- Villeneuve sur Lot
- Nérac

Service prescripteur :

Contexte du prélèvement :

	Date	Heure
Prélèvement		
Réception au laboratoire (horodatage si disponible)		
Enregistrement sur Inlog		

Technique manuelle

Numération cellulaire : J0

	Date	Heure
Montage de la chambre de comptage		

Début de lecture de la chambre de comptage		
Obtention du résultat (lecture de la chambre de comptage terminée)		
Validation technique : rendu du résultat (scan de la maquette)		

Eléments nucléés (/ μ L) :

Hématies (/ μ L) :

Cytocentrifugation : J0

	Date	Heure
Début de réalisation de la cytopspin		
Fin de réalisation de la cytopspin		
Transfert de la lame pour coloration MGG en Hématologie		

Coloration MGG de la lame et lecture de l'étalement coloré au MGG : Hématologie

	Date	Heure
Début de la coloration MGG		
Fin de la coloration MGG		
Lame mise à disposition pour lecture		
Début de lecture du frottis MGG		
Obtention du résultat (lecture du frottis MGG terminée)		
Validation technique : rendu du résultat (scan de la maquette)		

Liquides d'ascites / liquides pleuraux

LCR / liquides de DPCA

PNN (%) :

PNN (%) :

PNE (%) :

PNE (%) :

PNB (%) :

PNB (%) :

Lymphocytes (%) :

Lymphocytes (%) :

Autres cellules (%) :

Monocytes (%) :

Conclusion biologique éventuelle :

Technique automatisée

		Date	Heure
Automate BC-6200 #1	Passage sur l'automate		
	Obtention du résultat		
Automate BC-6200 #2	Passage sur l'automate		
	Obtention du résultat		

Paramètres de routine

TC-BF :

PMN% :

GB-BF :

MN# :

GR-BF :

MN% :

PMN# :

Paramètres de recherche

NEU-BF# :

EO-BF# :

NEU-BF% :

EO-BF% :

LY-BF# :

HF-BF# :

LY-BF% :

HF-BF% :

MO-BF# :

GR-BF (R) :

MO-BF% :

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Evaluation des performances du mode BodyFluid de l'automate d'Hématologie Mindray BC-6200 : comparaison avec la méthode manuelle et application dans un laboratoire polyvalent

L'analyse cytologique des liquides biologiques corporels est primordiale dans le diagnostic de nombreuses pathologies. Deux examens sont réalisés au laboratoire de Biologie Médicale : la numération cellulaire et la formule cytologique. La microscopie optique est considérée comme la méthode de référence. Elle comprend la numération cellulaire des éléments nucléés et des hématies en chambre de comptage et l'analyse morphologique des cellules par lecture de l'étalement coloré au MGG. Cependant, de nombreux automates d'Hématologie cellulaire sont capables, grâce à leur mode spécifique BodyFluid™ (BF), d'analyser ces liquides. Les performances des paramètres TC-BF, GB-BF et GR-BF du mode BF de l'automate Mindray BC-6200 sont satisfaisantes pour l'analyse des liquides d'ascite et des liquides pleuraux au sein du laboratoire HOSPILAB47. Les liquides céphalo-rachidiens devront continuer à être analysés par méthode manuelle, les performances de la numération notamment des globules rouges étant insuffisantes. Concernant les liquides de dialyse péritonéale continue ambulatoire, matrice non validée par le fournisseur, l'analyse par technique automatisée peut être utilisée pour la numération des TC-BF et des GB-BF. Du fait de la présence possible de cellules néoplasiques dans ces liquides de ponction, la formule automatisée ne peut pas remplacer complètement la formule manuelle.

Mots-clés : liquides biologiques, cytologie, microscopie optique, automatisation, Mindray BC-6200, vérification de méthode, cellules néoplasiques

Performance evaluation of the BodyFluid mode on the Mindray BC-6200 automated hematology analyzer: comparison with the manual method and application in a multipurpose laboratory

Cytological analysis of body fluids is essential in the diagnosis of many pathologies. Two tests are performed at the Medical Biology laboratory: the cell count and the cytological formula. Optical microscopy is considered as the gold standard. It includes the cell count of nucleated elements and red blood cells in a counting chamber and the morphological analysis of cells by reading the smear stained with MGG. However, many automated hematology analyzers are able, with their specific BodyFluid™ (BF) mode, to analyze these fluids. The performances of the TC-BF, GB-BF and GR-BF parameters in the BF mode of the Mindray BC-6200 are satisfactory for the analysis of ascitic fluids and pleural fluids in the HOSPILAB47 laboratory. Cerebrospinal fluids will have to continue to be analyzed manually, because performances of the cell count, especially of the red blood cells, are insufficient. For continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids, a matrix not validated by the supplier, automated analysis can be used for TC-BF and GB-BF counts. Due to the possible presence of neoplastic cells in these fluids, the automated formula cannot completely replace the manual formula.

Keywords: body fluids, cytology, optical microscopy, automation, Mindray BC-6200, method verification, neoplastic cells

