

ANNÉE 2014

N° 064

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**DE**  
**BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 17/12/2014

Par *Marine BRANGER*

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Démarche qualité en hématologie : application à la maîtrise du processus analytique de la numération formule sanguine.

-----  
Président : Mr Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie

Membres du jury : Mme Marie-Christine BENE, Professeur d'Hématologie.  
Mr Marc MAYNADIE, Professeur d'Hématologie.  
Mme Soraya WUILLEME, Praticien Hospitalier.  
Mr Pascal VERDIER, Praticien Hospitalier.  
Mlle Marion EVEILLARD, Praticien Hospitalier

## Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, de me faire l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Marie-Christine BENE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, ma directrice de thèse, d'avoir accepté de diriger ce travail. Je tiens à vous remercier de m'avoir fait confiance avec ce sujet, ainsi que pour vos conseils et du temps passé à la correction de ce mémoire. Veuillez recevoir l'expression de ma respectueuse gratitude et de tout mon respect.

A Monsieur Marc MAYNADIE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier au CHU de Dijon, d'avoir accepté de juger mon travail, et de me faire l'honneur de faire le déplacement sur Nantes pour participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'assurance de mes sincères remerciements.

A Madame Soraya WUILLEME, Praticien Hospitalier, d'avoir si gentiment accepté de faire partie de mon jury de thèse. Un grand merci pour la confiance qui m'a été accordé et pour toute l'aide qui a contribué à l'élaboration de ce travail.

A Monsieur Pascal VERDIER, biologiste et responsable des validations de méthode au CHU de Nantes, d'avoir accepté de juger mon travail et pour ses conseils avisés. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.

A Marion EVEILLARD, praticien Hospitalier, pour l'honneur que tu me fais en acceptant de faire partie de ce jury et de juger ainsi mon travail. Je te prie de recevoir le témoignage de mon profond respect et de toute ma gratitude.

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie, biologistes et techniciens, de l'Hôtel Dieu mais aussi de l'hôpital Nord, pour votre accueil et votre sympathie au cours des quelques mois passés dans le service. Un merci particulier à Elodie et Stéphanie techniciennes référentes qualité pour le travail accompli à mes côtés lors des vérifications de méthodes des nouveaux automates.

A Valérie LE PAGE, responsable management qualité, et Florent KRASKE, assistant qualité, pour les échanges, les conseils et toute l'aide apportée qui ont permis d'avancer dans la mise en place de la démarche qualité.

A l'ensemble des biologistes et techniciens, et ils sont nombreux croisés aux cours de ces quatre années d'internat, à Nantes, Cholet et Challans pour votre accueil, votre gentillesse et pour le partage de votre expérience et le savoir que vous m'avez transmis.

Aux internes qui m'ont accompagnée au cours de ces années : merci pour tous les bons moments partagés ensemble.

A tous mes amis présents et passés qui m'ont accompagné au cours de ma vie et plus particulièrement à Aurore & Ruben, Anaïs & Raoul, Mathilde, Xénia & Ludo : merci pour vos encouragements et votre soutien.

A ma famille :

A mes grands-parents : Jacquot & Catherine, Mamie Lili et à la mémoire de grand-père Michèle.

A mes frères Frédéric, Nicolas et Damien.

Et bien sûr à mes parents pour votre irremplaçable et inconditionnel soutien.

# Sommaire

<b>Liste des Abréviations</b> .....	7
<b>Introduction</b> .....	10
<b>1 Première partie : généralités</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 L'accréditation en biologie médicale</b> .....	<b>12</b>
1.1.1 Historique de la qualité .....	12
1.1.1.1 Avant l'avènement de l'ère industrielle : .....	12
1.1.1.2 Après la révolution industrielle : de l'émergence du contrôle de la qualité... au management de la qualité. ....	13
1.1.1.3 Concept et système qualité : les normes ISO .....	17
1.1.2 La qualité en biologie médicale.....	18
1.1.2.1 Avant le projet de réforme de la biologie médicale.....	18
1.1.2.2 La réforme de la biologie médicale : l'accréditation rendue obligatoire.....	20
1.1.3 Accréditation : reconnaissance de la compétence du laboratoire .....	24
1.1.3.1 Définition .....	24
1.1.3.2 Le COFRAC : l'organisme accréditeur .....	24
1.1.3.3 Le processus d'accréditation. ....	25
1.1.4 Les référentiels .....	26
1.1.4.1 La norme NF EN ISO 15189 : « Laboratoire de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence » .....	26
1.1.4.2 Guide et référentiels Cofrac .....	28
<b>1.2 Un travail qui s'inscrit dans un projet hospitalier</b> .....	<b>30</b>
1.2.1 Le pôle de biologie du CHU de Nantes.....	30
1.2.1.1 Présentation .....	30
1.2.1.2 L'organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes.....	31
1.2.1.3 Avancement de l'accréditation.....	37
1.2.2 Le laboratoire d'hématologie.....	38
1.2.2.1 Présentation .....	38
1.2.2.2 Le contexte .....	39

<b>2</b>	<b>Deuxième partie : Application des référentiels en vue de l'accréditation de l'hémogramme - processus analytique .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Réalisation de la numération formule sanguine .....</b>	<b>43</b>
2.1.1	L'hémogramme : un examen clé.....	43
2.1.2	Description du processus .....	45
2.1.3	Choix des intervalles de référence biologique.....	46
<b>2.2</b>	<b>Evaluation des performances initiales de la numération formule sanguine: vérification/validation de méthode : .....</b>	<b>47</b>
2.2.1	Introduction- Définition. ....	47
2.2.2	L'hémogramme automatisé .....	49
2.2.2.1	Méthodologie .....	49
2.2.2.2	Résultats : vérification expérimentale des critères de performance sur le XN-9000 de SYSMEX®.....	57
2.2.3	L'examen du frottis sanguin .....	74
2.2.3.1	Critères de revue microscopique du frottis sanguin .....	74
2.2.3.2	Méthodologie .....	76
2.2.3.3	Résultats .....	83
<b>2.3</b>	<b>Processus support .....</b>	<b>94</b>
2.3.1	Ressources humaines.....	94
2.3.2	Informatique.....	98
2.3.2.1	Validation et vérification des systèmes informatiques.....	99
2.3.2.2	Procédures en cas de panne informatique : mode dégradé.....	102
2.3.2.3	Maîtrise de la sécurité informatique .....	102
2.3.2.4	Traçabilité, Intégrité et Conservation des données .....	102
2.3.3	Maîtrise du matériel, des réactifs et des locaux .....	103
2.3.3.1	Matériel .....	103
2.3.3.2	Réactifs et consommables.....	104
2.3.3.3	Locaux, conditions environnementales, métrologie .....	105
2.3.4	Gestion documentaire : documentation des procédures analytiques. ....	105
<b>2.4</b>	<b>Assurer la qualité des procédures analytiques : .....</b>	<b>109</b>
2.4.1	Garantir la qualité de l'hémogramme automatisé. ....	109
2.4.1.1	CQI .....	110
2.4.1.2	Moyenne mobile.....	116
2.4.1.3	Comparaison inter-laboratoires .....	118

2.4.1.4	Calcul des incertitudes de mesures .....	123
2.4.1.5	Comparaisons inter-automates .....	125
2.4.1.6	Gestion des ré-analyses .....	127
2.4.2	Garantir la qualité de la formule manuelle .....	128
<b>Conclusion et perspectives .....</b>		<b>129</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>131</b>
<b>Bibliographie.....</b>		<b>141</b>
<b>Table des figures.....</b>		<b>145</b>
<b>Table des tableaux.....</b>		<b>146</b>

## Liste des abréviations :

ABP : Association de Biologie Praticienne

AFNOR : Association Française de Normalisation

ANSM : **Agence Nationale de Sécurité du Médicament** et des produits de santé

ARS : Agence Régional de Santé

CAFEI : Cellule d'Analyse des Fiches d'Evènement Indésirable

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CIL : Comparaison Inter-Laboratoire

CMF : Cytométrie en flux

CNQ : Contrôle National de Qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CQI : Contrôle de Qualité Interne

CRTE : Centre de Réception et de Traitement des Echantillons

CV : Coefficient de Variation

DSIT : Direction des Systèmes d'Information et de Télécommunication

DURQ : Direction des Usagers, des Risques et de la Qualité

EA : European cooperation for Accreditation

EB : Erythroblastes

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité parfois encore appelé CQE (Contrôle de Qualité Externe)

ET : Ecart-type

FEI : Fiche d'Evènement Indésirable

FI : Fidélité Intermédiaire

GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses

GB : Globules Blancs

GR : Globules Rouges

GTA : Guide Technique d'Accréditation

HAS : Haut Autorité de Santé

Hb : Hémoglobine

HPST : loi Hôpital Patient Santé et Territoire

Ht : Hématocrite

IDR : Indice de Distribution des Rouges

IGAS : Inspection Générale des Affaires Sociales

IG : Immatures granuleux

IM : Incertitude de mesure

IPU : Unité de traitement de l'information

IT : Impossibilité Technique

J.U.S.E : Union of Japanese Scientists and Engineers.

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LGL : Large Granular Lymphocyte

Ly : Lymphocytes

MO : Mode Opérateur

MOH : Morphologie des hématies

Mono : Monocytes

MOP : Morphologie des plaquettes

NA : Non Applicable

NFS : Numération Formule Sanguine

NRBC : Nuclear Red Blood Cell, Erythroblaste en français.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAV : Plaquettes à vérifier

PNB : Polynucléaire Basophile

PNE : Polynucléaire Eosinophile

PHU : Pôles Hospitalo-Universitaires

PLT-F : Plaquette en mode Fluorescence

PLT-I : Plaquette en mode Impédance

Pq : Plaquettes

PN : Polynucléaire Neutrophile

RAQ : Responsable Assurance Qualité

RET : Réticulocytes

RMQ : Responsable Management Qualité

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

TQM : Total Quality Management.

SFBC : Société Française de Biologie Clinique

SIL : Système Informatique des Laboratoire

SMQ : Système de Management de la Qualité

SROS : Schéma Régional d'Organisation des Soins

VGM : Volume Globulaire Moyen

VPM : Volume Plaquettaire Moyen

## Introduction

L'assurance qualité est depuis longtemps ancrée dans le monde industriel. Son développement dans le domaine de la santé était inévitable tant la moindre erreur peut avoir de graves conséquences. Cela a commencé aux Etats-Unis au début des années 50 avec la création de la JCAHO (Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations). En France il faut attendre le début des années 2000 et le développement de la certification des établissements de santé afin d'améliorer la qualité et la sécurité des soins. Sa mise en place est aujourd'hui placée sous la responsabilité de la Haute Autorité de Santé (HAS).

La biologie médicale est une profession réglementée qui se doit de garantir au clinicien et aux patients la qualité des résultats et la fiabilité des examens. Récemment, une réforme de cette discipline a eu lieu dans le but principal de renforcer la médicalisation de la profession. Avec cette réforme, la biologie médicale est passée du guide de bonne exécution des analyses (GBEA), mis en place au milieu des années 90, à l'accréditation rendue obligatoire par l'ordonnance du 13 janvier 2010. Cette accréditation est réalisée suivant une norme spécifique à cette discipline qui reprend les « exigences concernant la qualité et la compétence », il s'agit de la norme NF EN ISO 15189. La mise en place de ses dispositions est un processus long et exigeant qui doit être réalisé suivant un calendrier défini. Ainsi tous les laboratoires devront être accrédités sur l'ensemble de leurs analyses d'ici 2020. La mise en application de cette norme permet au laboratoire de disposer d'un système qualité basées sur des exigences à la fois de management et des exigences techniques.

Dans ce contexte, la qualité a pris une place importante dans l'activité d'un laboratoire et un biologiste doit être un acteur actif dans sa gestion. Cependant, du fait de son arrivée récente dans le milieu hospitalier, son apprentissage n'est pas encore suffisamment intégré dans le cursus de l'internat. La qualité est souvent pour nous internes une notion abstraite, dont on comprend bien qu'elle devient, qu'on le souhaite ou non, indispensable dans la pratique de notre métier. C'est pourquoi j'ai souhaité réaliser ma thèse d'exercice sur ce sujet, notamment afin de mieux connaître et maîtriser les différents référentiels de l'assurance qualité et leur mise en application.

Cette thèse s'est construite autour de l'arrivée d'une nouvelle chaîne analytique au laboratoire d'hématologie et de la décision de celui-ci de présenter la numération formule sanguine à la prochaine visite de l'organisme accréditeur le COFRAC en 2015.

Après des généralités concernant l'accréditation en biologie médicale, le travail a porté sur la mise en application des différents référentiels en vue de l'accréditation de l'hémogramme, en se concentrant sur le processus analytique. Une partie importante a été consacrée aux vérifications de méthodes de l'hémogramme automatisé et de la formule sanguine manuelle, dans le but de vérifier leur capacité à satisfaire des exigences qui ont été définies au préalable. Ce travail s'est aussi intéressé aux moyens d'assurer la qualité de cette phase analytique et à la maîtrise des processus supports (ressources humaines, informatique, matériels et réactifs, et la gestion documentaire) indispensable à son bon fonctionnement.

# 1 Première partie : généralités

## 1.1 L'accréditation en biologie médicale

### 1.1.1 Historique de la qualité

#### 1.1.1.1 Avant l'avènement de l'ère industrielle :(1)

La qualité est une notion très ancienne dont on retrouve la trace dès les premières préoccupations de l'homme.

1792-1750 avant J.-C.	Hammourabi (roi de Babylone) fit graver un code de 300 articles dans une stèle. Ce code recensait les règles édictées par le pouvoir ou promues par les professionnels eux-mêmes visant à contrôler la qualité des produits fournis.
XVe siècle avant J.-C	les Égyptiens pratiquaient le contrôle du travail des tailleurs de pierre par des inspecteurs indépendants
IVe siècle avant J.-C	les Grecs seraient à l'origine des premiers textes visant à normaliser les processus de la qualité : une stèle décrivant les spécifications techniques relatives à la production de chevilles, en bronze.
XIIe siècle	les anglais inventèrent la méthode d'échantillonnage pour contrôler le titre et le poids des monnaies
Moyen Âge	Le Livre des métiers d'Étienne Boileau dressait les « cahiers des charges » des principaux métiers de l'époque
Au début de la Renaissance	les commandes passées par les Mécènes aux artistes étaient accompagnées de sorte de «cahiers des charges», très détaillés, que ces artistes devaient suivre sous peine de ne pas être payés.
XVIIe siècle (période préindustrielle)	Jean-Baptiste Colbert, secrétaire d'État de Louis XIV, fit une déclaration qui reste d'actualité : « Si nos fabriques imposent, à force de soin, la qualité supérieure de nos produits, les étrangers trouveront avantage à se fournir en France... ». Il créa aussi les manufactures royales pour lesquels il édicta des règlements de fabrication et fit surveiller leur application par des inspecteurs des manufactures.

Tableau 1 : Petit historique de la qualité avant l'avant la révolution industrielle (2) (1)

### 1.1.1.2 Après la révolution industrielle : de l'émergence du contrôle de la qualité... au management de la qualité.(2)

Même si la qualité est une notion ancienne, le concept de qualité, tel qu'il est perçu et défini de nos jours, est apparu récemment avec le passage de la production artisanale vers la production industrielle de masse, c'est-à-dire à partir l'avènement de l'ère industrielle moderne à la fin du dix-neuvième siècle, début vingtième.

#### 1.1.1.2.1 1900-1950 : L'émergence du contrôle qualité.

Au début du vingtième siècle, c'est le début de la standardisation et de la production de masse avec Frederick W. Taylor puis Henry Ford. Le concept de qualité en est à ses débuts. On entre dans l'âge du tri, un inspecteur contrôle la qualité en fin de chaîne, en vérifiant la production. La notion de qualité est alors réduite au contrôle en fin de production. Les coûts du contrôle, mais aussi les coûts de production, sont d'autant plus élevés que les produits rejetés sont nombreux.

En 1916, Henri Fayol, pionnier du management, explique les principes de la gestion globale d'entreprise dans un ouvrage : « administrer, c'est prévoir, organiser, coordonner et contrôler ». Le but étant de diminuer les coûts de production, tout en diminuant les gaspillages et en optimisant les ressources.

En 1926, l'Association française de normalisation (Afnor) est créée, ainsi que la Fédération internationale des associations nationales de normalisation (ISA), ancêtre de l'ISO (Organisme international de normalisation) mais elles ne seront fonctionnelles qu'en 1947.

Aux Etats-Unis, en 1925 Walter A. Shewhart est nommé à la direction technique d'une entreprise de télécommunication. Suite à des problèmes survenus sur les produits de l'entreprise, il propose une approche organisée et scientifique de la gestion de la qualité. Il publie en 1931 le résultat de ses travaux dans le « contrôle économique des produits manufacturés ». Le contrôle s'installe tout au long de la production notamment avec l'utilisation des cartes de contrôles pour éviter le gâchis et réduire les coûts. Le but étant d'intégrer la qualité dès la phase initiale et de ne plus se contenter de constater le niveau de conformité à la fin de la production.

La Seconde Guerre mondiale et l'essor des industries américaines d'armement participent à l'évolution de la qualité : en 1959 l'armée américaine publie la première norme d'assurance de la qualité (MIL-Q-9858).

### 1.1.1.2.2 Les années 50,60 et 70 au Japon : Naissance des concepts de qualité totale et d'assurance qualité :

Au lendemain de la guerre, l'industrie japonaise est au plus mal. Le Japon dépourvu de ressources naturelles, doit relever un important défi. Pour ce faire les japonais par l'intermédiaire de la J.U.S.E (groupe de travail portant sur la qualité composé d'ingénieurs et de scientifiques) invitent des experts américains de la qualité comme W.Edwards Deming puis Joseph Juran, ou encore Armand V. Feigenbaum.

W.Edwards Deming qui est un partisan des idées de Shewhart, propose une réforme globale du système organisationnel de production qui recommande l'implication de l'ensemble du personnel de l'entreprise, incluant processus et management. Il est surtout connu du grand public pour la roue qui porte son nom encore appelé cycle PDCA : méthode de maîtrise des processus basés sur un cycle dynamique et itératif :

- Planifier, préparer, définir (Plan)
- Faire, mettre en œuvre (Do)
- Vérifier, analyser, contrôler, évaluer (Check)
- Agir, améliorer, décider (Act).

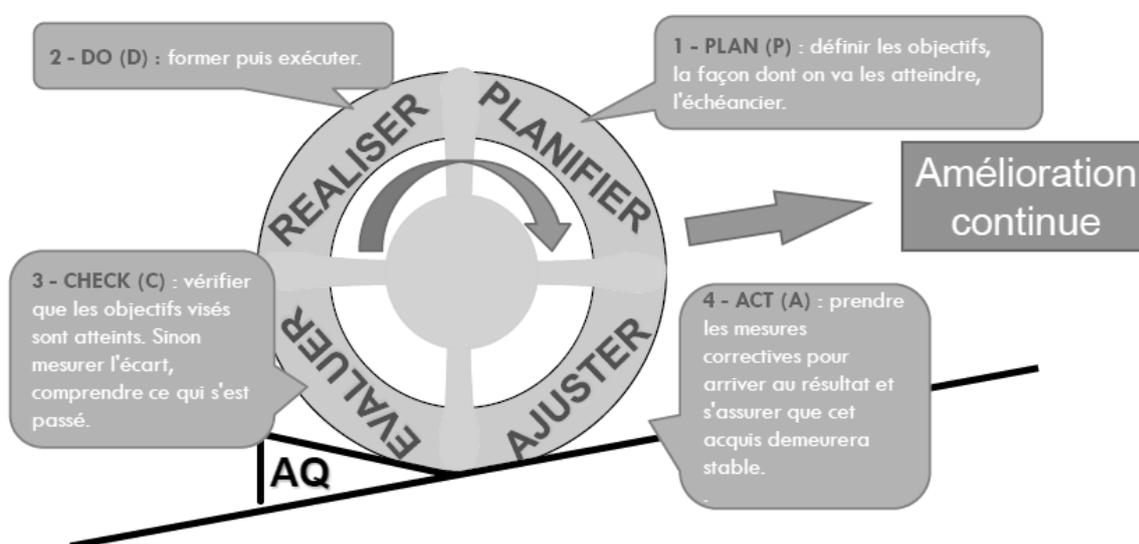


Figure 1 : Roue de Deming : cycle PDCA principe de l'amélioration continue (3)

Pour Joseph Juran qui enseigne la gestion de la qualité, les « trois éléments fondamentaux dans un programme qualité sont, d'une part, les personnes en charge de celui-ci, d'autre part, que c'est personnes soient formées sur la manière de gérer la qualité et, enfin que cette qualité s'entende dans un sens très évolutif. » (3)

Armand V. Feigenbaum introduit au Japon le Total Quality Control, qui jette les bases fondamentales de la *Gestion intégrale de la qualité*. Feigenbaum définit la maîtrise totale de

la qualité comme « ... un système destiné à intégrer efficacement les efforts des divers groupes d'une organisation afin de développer, de maintenir et d'améliorer la qualité ». Celle-ci deviendra dans les années 80 la philosophie de gestion connue sous le sigle de TQM pour *Total Quality Management*.

Après les années 60, certains experts japonais vont aller plus loin dans le domaine de la qualité. Le professeur Kaoru Ishikawa, formalise et diffuse auprès de toute l'industrie des biens et des services ce nouveau courant de pensée. Il refuse l'idée que le management concerne uniquement les ingénieurs et propose d'intégrer aussi les ouvriers. Il fonde les cercles de la qualité, petits groupes de travail appartenant à la même unité, qui se réunissent volontairement et régulièrement pour identifier et tenter de résoudre des problèmes, leur but étant l'amélioration continue de la qualité dans leur secteur de l'entreprise. En 1962, il édite un manuel sur la maîtrise de la qualité, travaillant sur les méthodes de résolution de problèmes, et notamment sur les sept outils de la qualité dont le plus connu est le diagramme cause-effet, appelé aussi diagramme d'Ishikawa, en forme d'arête de poisson, permettant de repérer les dysfonctionnements avant d'essayer de les résoudre.

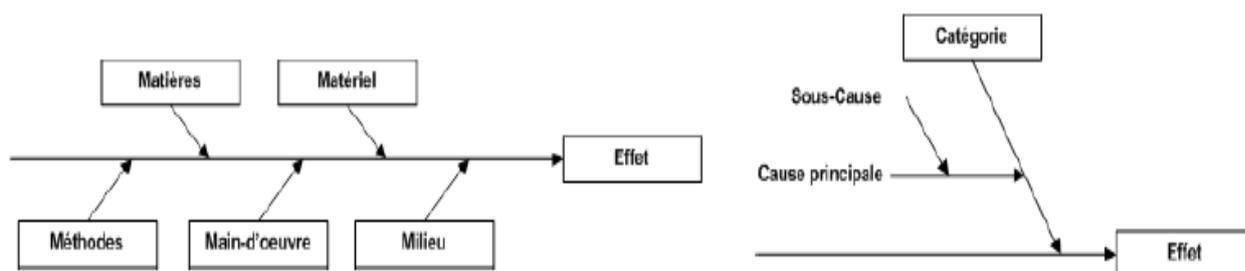


Figure 2: Schéma du diagramme d'Ishikawa (5)

Les japonais se lancent ensuite pendant plus de vingt ans dans la pratique et le développement des méthodes modernes de management de la qualité.

#### 1.1.1.2.3 Les années 60, 70, 80 en Occident : généralisation de la qualité totale.

A partir des années soixante-dix, avec la crise économique et l'essor des produits japonais, les industriels occidentaux vont s'initier aux démarches de type « assurance qualité » et « qualité totale ». D'une démarche curative, qui consistait à régler les problèmes après leur apparition, on passe à une approche préventive de la gestion de la qualité. L'industrie

occidentale s'initie alors à la démarche de qualité totale : Philip B. Crosby, dans le cadre des programmes spatiaux Apollo développe le concept du « zéro défaut » en mettant l'accent sur la place de l'homme dans l'obtention de la qualité. Alors que la qualité est assimilée à un contrôle final, Crosby la voit comme une « conformité à des exigences ». Il faudra ensuite s'assurer que les règles édictées seront bien appliquées dans l'entreprise. Assurer la qualité consiste « à définir et à mettre en œuvre de façon systématique les dispositions nécessaires pour fonder la confiance par la preuve, tant de façon interne à l'entreprise qu'à l'égard des clients »(2). C'est dans l'industrie de haute technologie comme le nucléaire que se développe alors l'assurance qualité.

Dans les années quatre-vingt, les principaux pays industrialisés participent à la rédaction de normes internationales pour l'assurance de la qualité au sein de l'Organisation internationale de normalisation (ISO). En 1987, sont créés les normes ISO 9000, consacrées à l'aspect organisationnel de l'assurance qualité, à son management et à ses méthodes. Une entreprise peut faire appel à un organisme indépendant pour faire reconnaître sa conformité à une norme c'est la certification.

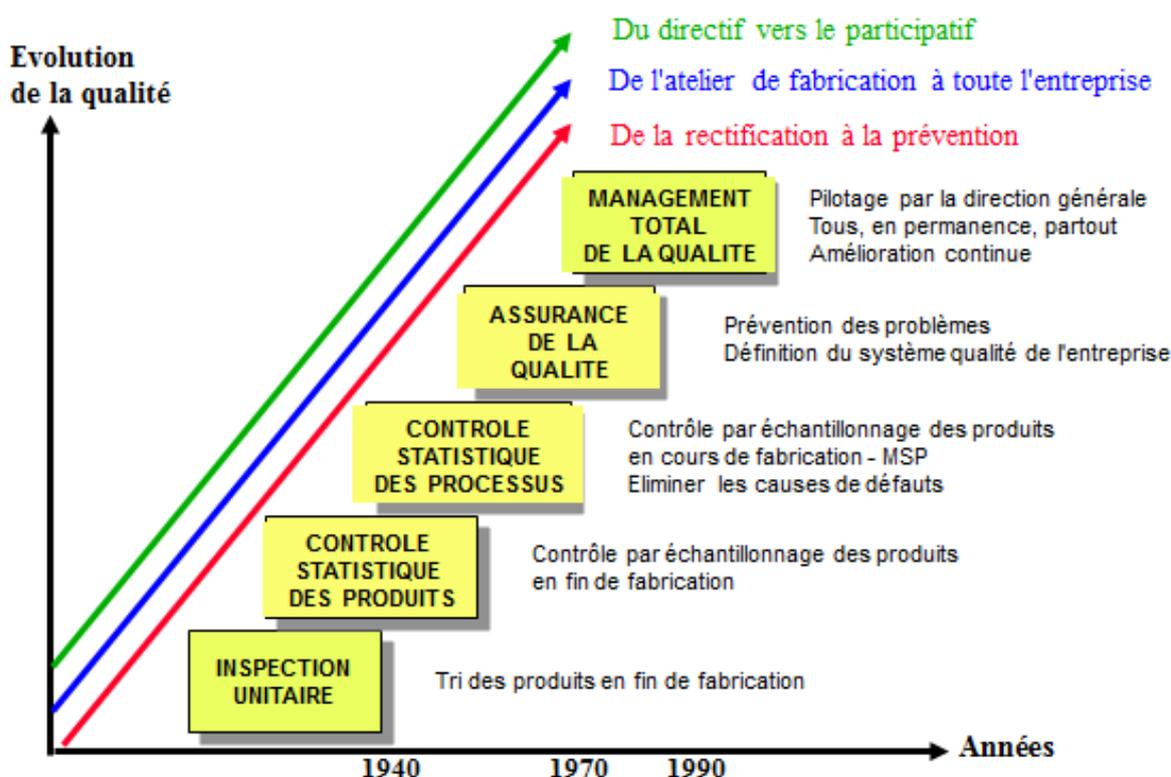


Figure 3: Evolution du concept de la qualité (6)

La qualité a donc évolué à travers les âges. Dans les premières années de la qualité, les entreprises faisaient de la qualité en mettant en place des **contrôles** a posteriori par des

inspecteurs. Pour vendre des produits conformes à un cahier des charges, il fallait éliminer tous ceux qui ne respectaient pas cette conformité.

Quelques années plus tard, le concept de qualité s'est transformé en « **assurance qualité** ». Cela suppose une maîtrise de tous les éléments qui composent les procédés de fabrication et de pouvoir en apporter la preuve.

Plus tard une autre évolution du concept de qualité fait son apparition, il s'agit du **management de la qualité** qui, à son tour, chasse l'assurance de la qualité. Satisfaction non seulement dans la qualité des produits mais aussi dans toutes les ressources de l'organisation : les clients, les fournisseurs, les actionnaires, les salariés et dans la société en général.

### 1.1.1.3 Concept et système qualité : les normes ISO

La série des normes ISO a été élaborée par la fédération internationale de normalisation pour harmoniser le grand nombre de normes développées à travers le monde et dont la multiplication avait entraîné une confusion dans les milieux industriels. ISO n'est pas un sigle mais un nom dérivé du grec isos, signifiant "égal". Les normes sont des accords documentés contenant des spécifications techniques ou autres critères précis destinés à être utilisés systématiquement en tant que règles, lignes directrices ou définition des caractéristiques.

La norme ISO 9000 constitue une référence internationale dans le management de la qualité, quel que soit le secteur d'activité. Dès son lancement, cette norme a connu un grand succès mondial et a été adoptée par de nombreux pays. Son objectif est d'améliorer la satisfaction du client en répondant à ses exigences et de réaliser une amélioration continue de ses performances tout en satisfaisant aux exigences réglementaires. Elles fournissent des objectifs sans imposer les moyens de les atteindre.

La série des normes ISO 9000 a subi plusieurs évolutions, faisant une plus grande place à la notion de management avec une vision plus transversale à travers le management par processus.

La série des normes ISO 9000 comprend quatre textes de base :

- ISO 9000, 2005, système de management de la qualité ; principes essentiels et vocabulaire
- ISO 9001, 2008, système de management de la qualité : exigences (et seul référentiel certifiable) : la norme est orientée vers la mesure de l'efficacité des processus.

- ISO 9004, 2005, système de management de la qualité : conseils pour l'amélioration des performances. Elle énonce huit principes qui peuvent être utilisés par la direction pour servir de cadre à l'amélioration des performances de l'organisme.
- ISO 9011, lignes directrices pour l'audit des systèmes de management de la qualité et/ou de management environnemental.

Un certain nombre de définitions sont données dans la norme ISO 9000 : ainsi la **qualité** (ISO9000/2005) est définie comme « l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences ».

Le **système de management de la qualité** (norme ISO 9000:2005) correspond à un « Système de management permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité ».

Et l'**assurance qualité** (ISO9000/2000) représente une « partie du management de la qualité visant à apporter la confiance que les exigences relatives à la qualité sont satisfaites ».

### 1.1.2 La qualité en biologie médicale.

#### 1.1.2.1 Avant le projet de réforme de la biologie médicale

Les éléments développés dans les paragraphes précédents indiquent, avant tout, que les démarches qualité et les principes de standardisation et d'harmonisation se sont appliqués en premier lieu et principalement aux procédés industriels, son application dans le domaine de la santé étant évidemment plus complexe.

La qualité des soins a toujours été un élément majeur dans le domaine de la santé. Elle est définie par l'OMS comme le moyen de « garantir, à chaque individu, un ensemble d'actes diagnostiques et thérapeutiques qui assureront le meilleur résultat en termes de santé, de meilleur coût, au moindre risque et pour la plus grande satisfaction en termes de procédures, de résultats et de contacts humains à l'intérieur du système de soins ».

Au sein des établissements de santé, les demandes pour l'assurance d'un bon service sont multiples et de plus en plus exigeantes, tant de la part des patients que des prescripteurs. Pour parvenir à cette exigence, le monde hospitalier introduit depuis plusieurs années de nouvelles démarches de gestion et d'amélioration de la qualité, dont les normes ISO 9000 représentent une des sources d'inspiration.

La biologie médicale qui est aujourd'hui devenue un élément clé dans le parcours de soins des patients n'échappe donc pas à ce phénomène. Elle est en effet très souvent déterminante pour le diagnostic (environ 60% des diagnostics), mais aussi pour le pronostic et le suivi des pathologies et de leur traitement. Cependant la qualité, dans ce domaine, n'est pas une notion nouvelle, car un certain nombre de mesures avaient été prises (4) avant que l'accréditation ne soit rendue obligatoire.

- **Le CNQ (Contrôle Nationale Qualité):**

La loi N° 75-626 du 11 juillet 1975 qui définissait et encadrait les conditions d'exercice de la biologie médicale, a rendu obligatoire la participation à un « Contrôle National de Qualité ». Seule la participation est obligatoire, la qualité des résultats n'étant pas sanctionnée. L'adhésion à des programmes de contrôle de qualité s'est ensuite étendue à l'ensemble des spécialités techniques.

- **Le « contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale » :**

Ses modalités étaient fixées par le décret 83-104 du 15 février 1983 puis il fut introduit dans le code de la santé publique. Ce contrôle était mené par les inspecteurs de la santé et de la pharmacie avec l'aide de biologistes experts, proposés par le conseil de l'ordre. Son usage fut très limité faute de référentiel.

- **Le GBEA :**

C'est le décret 93-354 du 15 mars 1993 qui apporte le référentiel qui servira de cadre pour le contrôle de bonne exécution, il s'agit du « guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale » (GBEA), publié par arrêté du 2 novembre 1994, puis complété par arrêté du 25 novembre 1999. Les règles énoncées sont dites « opposables » c'est-à-dire immédiatement applicables sous peine de sanctions. Il s'applique à tous les laboratoires de biologie médicale et à toutes les personnes qui participent à la réalisation d'analyses.

Le GBEA donne des définitions et définit des règles et des recommandations pour une démarche qualité en prenant en compte les différentes étapes de l'analyse, de l'obtention du prélèvement à la remise des résultats. Le GBEA institue l'établissement d'un système documentaire avec des procédures et des modes opératoires. Cependant sa mise en œuvre a été très lente et reste incomplète.

- **La formation continue :**

En 1992 Bioforma a été créé par les caisses nationales d'assurance maladie et les organisations syndicales, il s'agit d'un organisme de formation continue qui propose des

stages de formation et édite des cahiers thématiques, en excluant toute intervention des fabricants de réactifs et d'automates.

- **Bio qualité :**

Au début des années 2000, trois syndicats de biologistes ont créé l'association Bioqualité. Le but étant de créer un programme d'accompagnement de la qualité en conformité avec le GBEA pour pallier aux difficultés rencontrées par les biologistes dans la mise en place des bases d'une assurance qualité.

- **La normalisation :**

La biologie n'est pas restée à l'écart du processus international de normalisation. En effet, certaines normes étaient applicables aux laboratoires de biologie sur la base du volontariat, depuis déjà plusieurs années c'est le cas de la norme ISO 9001 non spécifique, mais aussi de la norme ISO 17025, spécifique des laboratoires d'essais et d'échantillonnage. Les biologistes, ne trouvant pas ces normes suffisamment adaptées aux exigences médico-cliniques de leur activité, ont insisté pour qu'une norme spécifique soit élaborée, la norme NF EN ISO 15189, ce qui a été fait en octobre 2003.

#### 1.1.2.2 La réforme de la biologie médicale : l'accréditation rendue obligatoire.

La réforme de la biologie médicale a pour objectif de « permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à son juste prix dans un cadre européen » (4). La dernière réforme générale de la biologie datée de plus de trente ans avec la loi du 11 juillet 1975.

##### 1.1.2.2.1 Rapport préliminaire

Cette réforme est l'aboutissement de plusieurs études réalisées depuis le milieu des années 2000. En particulier deux d'entre elles qui ont été déterminantes : un rapport de l'inspection générale des affaires sociales (IGAS) en 2006 et le rapport dit « Ballereau » en 2008.

Tout d'abord le **rapport de l'Inspection Générale des Affaires Sociales** intitulé « la biologie médicale libérale en France : bilan et perspectives » en 2006 (5) qui propose un état des lieux de la biologie médicale. Il est le premier à souligner « la nécessité de réformer la biologie médicale en constatant que, malgré un niveau global satisfaisant de qualité des examens, il restait des insuffisances non compatibles avec les besoins en matière de santé

publique », surtout dans des laboratoires à faible activité. En effet le rapport de l'IGAS fait état de manquement en matière de qualité. Il constate que le biologiste « n'a pas toujours la maîtrise des différentes phases de l'examen ». Il note également que « les efforts des laboratoires pour assurer la qualité sont inégaux : malgré son caractère obligatoire et les facilités accordées, la participation à la formation continue est insuffisante ». « Les défaillances de participation au CNQ ne sont pas corrigées et l'importance des erreurs est sous-estimée ». Selon l'IGAS « la participation à Bioqualité est un progrès, mais ne peut être considérée comme une preuve en soi de qualité ». De son point de vue, « la seule garantie objective semble être la certification et l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) par un organisme tiers ».

De plus, le rapport signale que « les laboratoires ayant un fonctionnement à risques ne sont pas amenés à modifier leurs pratiques car les inspections ne sont pas en nombre suffisant, et les manquements sérieux à la qualité sont rarement sanctionnés ». Ainsi l'IGAS conclut sur le fait que « la loi de 1975 n'est plus adaptée aux enjeux actuels, notamment ceux de la qualité et de la compétitivité et qu'une réforme de l'ensemble du système est indispensable ». Elle propose d'imposer le respect de la qualité comme principale norme, en se référant dans un premier temps au GBEA puis à terme en rendant obligatoire la norme NF EN ISO 15189.

Le **rapport « Ballereau »** (6) a été remis en 2008. Le Ministère de la Santé avait missionné le Dr. Michel Ballereau, alors conseiller général des établissements de santé, pour proposer un projet de réforme de la biologie médicale dans le cadre du projet de loi Hôpital Patient Santé et Territoire (HPST). Dans sa lettre de mission, la Ministre de la Santé, Roselyne Bachelot, partant du constat que « la biologie a été confrontée ces dernières années à de nombreuses évolutions internes et externes : évolution des connaissances médicales, automatisation des techniques, assurance et contrôle qualité, impact de la législation européenne »(4) décide qu' « il devient nécessaire d'envisager une évolution substantielle de l'encadrement juridique de cette discipline » et de veiller « à ce que soient étudiées les modalités de garantie de la qualité de la biologie médicale en France, celles de l'organisation de l'offre de soins dans la discipline et les conditions de son financement »(4) afin que chacun puisse « pouvoir avoir accès sur notre territoire à une biologie médicale de qualité prouvée, rémunérée à sa juste valeur. »

Les propositions du chargé de mission ont donné lieu à un rapport, issu d'un travail commun entre les représentants des professionnels de la biologie médicale, des Ordres, de l'administration et des cabinets des différents ministères concernés. Un des points importants du rapport reprend les conclusions de l'IGAS, notamment le fait que la régulation du système de santé des LBM doit reposer sur la qualité. Il met en avant que « la structure des laboratoires français de biologie médicale n'a pas progressé aussi vite que l'aurait exigé l'évolution des connaissances scientifiques et technologiques. Certains laboratoires d'analyses de biologie médicale ont même une activité trop faible pour être capables de s'adapter aux techniques d'analyses les plus modernes ». Il faut augmenter le niveau d'exigence défini par le GBEA et se diriger vers une « **qualité prouvée** » dans le domaine médical et technique et pour cela il incite à évoluer vers l'accréditation obligatoire.

#### 1.1.2.2.2 Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie (7)

Suite au rapport Ballereau, la Ministre chargée de la santé propose le 13 janvier 2010 une ordonnance relative à la biologie médicale. Cette dernière fait partie d'une réforme plus globale du système de soins français, la loi HPST n° 2009-879 du 21 juillet 2009. En effet l'article 69 de cette loi autorise « le gouvernement ... à prendre par ordonnance, dans un délai de six mois à compter de la publication de la présente loi, toutes les mesures relevant du domaine de la loi, réformant les conditions de création, d'organisation et de fonctionnement des laboratoires de biologie médicale » (8)

Six mois plus tard est donc parue l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Cette ordonnance, qui modifie le Code la Santé Publique constitue la nouvelle référence réglementaire relative à la biologie médicale. Elle a été par la suite ratifiée et modifiée par la loi du 30 mai 2013. (9)

## **Code de la santé publique**

### **Livre II Biologie médicale**

#### **Titre Ier : Définition et principes généraux**

- Chapitre I : examen de biologie médicale
  - Section 1 : Définitions et champ d'application (Art. L. 6211-1 à Art. L. 6211-6.)
  - Section 2 : Conditions et modalités de réalisation (Art. L. 6211-8 à Art. L. 6211-23)
- Chapitre II : laboratoire de biologie médicale (Art. L. 6212-1 à Art. L. 6212-6.)
- Chapitre III : biologiste médical
  - Section 1 : Conditions d'exercice (Art. L. 6213-1 à Art. L. 6213-6)
  - Section 2 : Modalités d'exercice (Art. L. 6213-7 à Art. L. 6213-12.)

#### **Titre II : Organisation**

- Chapitre I : accréditation et contrôle de qualité (Art. L. 6221-1 à Art. L. 6221-13)
- Chapitre II : conditions d'ouverture et de fonctionnement (Art. L. 6222-1 à Art. L. 6222-8.)
- Chapitre III : structures juridiques (Art. L. 6223-1 à Art. L. 6223-7)

#### **Titre III : Inspections**

(Art. L. 6231-1.e Art. L. 6231-2)

#### **Titre IV: Sanctions**

- Chapitre I : Sanctions administratives et disciplinaires
  - Section 1: Sanctions administrative (Art. L. 6241-1. A Art. L. 6241-4.)
  - Section 2 : Sanctions disciplinaires (Art. L. 6241-5 à Art. L. 6241-6)
- Chapitre II : Sanctions pénales (Art. L. 6242-1 à Art. L. 6242-5.)

**Figure 4: Sommaire du code la santé publique concernant la biologie médicale**

Les principales caractéristiques de l'ordonnance sont :

- Le renforcement de la médicalisation de la discipline est le fondement même de cette réforme. L'examen de biologie médicale est redéfini (Art. L. 6211-1 du code la santé publique), en intégrant l'analyse de données cliniques et l'interprétation du résultat. Le but est de placer la biologie médicale comme l'activité de santé qu'elle est, et non comme une activité de service.
- La même réglementation pour les LBM publics et privés, pour favoriser les coopérations entre les établissements de santé et les professionnels libéraux.
- La pluralité de l'offre de biologie médicale, garantie par le schéma régional d'organisation des soins (SROS).
- La « qualité prouvée » : l'accréditation qui jusqu'alors était une démarche volontaire devient obligatoire (Art. L. 6221-1) conformément à la norme NF EN ISO 15189 – (ou le cas échéant la norme NF EN ISO 22870 pour les Examen de Biologie Médicale Délocalisé). La

participation au CNQ de l'ANSM (Art. L. 6221-10) ainsi qu'aux EEQ (Evaluation Externe de la qualité) est rendue obligatoire (Art. L. 6221-9), ces organismes d'évaluation externe de la qualité signalent immédiatement à l'Agence Régional de Santé (ARS) les anomalies jugées graves après en avoir informé le LBM concerné.

### 1.1.3 Accréditation : reconnaissance de la compétence du laboratoire

#### 1.1.3.1 Définition

L'accréditation est une « procédure selon laquelle un organisme faisant autorité fournit une reconnaissance formelle qu'une organisation est compétente pour réaliser des tâches spécifiques »(10). La procédure d'accréditation dans les LBM permet de garantir aux patients et aux prescripteurs la fiabilité des examens de biologie médicale grâce à une vérification de la compétence du LBM par des biologistes indépendants de la structure à accréditer, avec le soutien de qualitiens. Cette accréditation porte sur toutes les phases de réalisation de l'examen de biologie médicale, non seulement sur la phase analytique mais également sur les phases pré-analytique (prélèvement et transport jusqu'au lieu de l'analyse) et post-analytique (validation du résultat, interprétation biologique).

« Cet objectif de qualité est établi dans le seul intérêt du patient ».(11)

L'accréditation est délivrée par l'organisme national d'accréditation sur demande du LBM. En France, cet organisme est le COmité FRançais d'ACcréditation (Cofrac).

Le calendrier d'accréditation a été modifié par la loi du 30 mai 2013 qui ratifié l'ordonnance relative à la biologie médicale (article 8)(9)

- La date d'entrée reste inchangée soit le 31 octobre 2012 pour la voie A (dossier d'accréditation partielle) et le 31 mai 2013 pour la voie B (Bioqualité)
- Accréditation de 50 % des examens à compter 1<sup>er</sup> novembre 2016,
- 70 % à compter 1<sup>er</sup> novembre 2018,
- Et enfin, 100 % à compter 1<sup>er</sup> novembre 2020.

#### 1.1.3.2 Le COFRAC : l'organisme accréditeur

Le règlement européen du 9 juillet 2008 impose un organisme d'accréditation unique dans chaque pays afin de supprimer toute concurrence entre accréditeurs, ce qui pourrait déprécier le niveau des attestations. En France, le Cofrac a été désigné comme l'unique instance d'accréditation nationale. Les organismes nationaux d'accréditation ont mis en

place un système d'audits « croisés » afin d'assurer la reconnaissance mutuelle de leurs prestations. Sa mise en œuvre est assurée par l'EA *European cooperation for Accreditation*, institution qui regroupe tous les organismes d'accréditation européens. Il s'agit d'une association loi 1901, à but non lucratif, créée en 1994 et qui s'est dotée depuis 2009 d'une section Santé Humaine dédiée entre autres à l'accréditation des LBM.

### 1.1.3.3 Le processus d'accréditation.

Le cycle d'accréditation est parfaitement standardisé. Cela commence par une visite initiale d'évaluation suivi de trois évaluations de surveillance. Quatre ans après la visite initiale une première réévaluation à lieu. L'accréditation est ensuite renouvelée tous les cinq ans avec trois visites de surveillance entre chaque renouvellement.

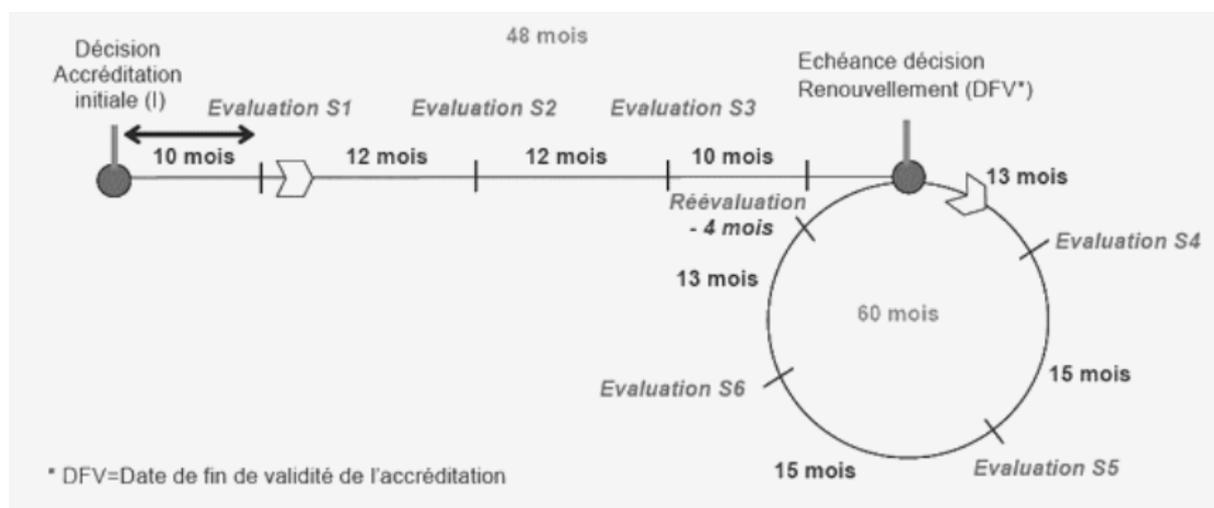


Figure 5: Cycle de vie d'une accréditation (15)

La demande initiale d'accréditation peut porter sur un périmètre restreint de l'activité du LBM, sachant qu'à chaque évaluation périodique du cycle d'accréditation, le LBM peut étendre ce périmètre au fur et à mesure qu'il met en place son système de management de la qualité.

L'accréditation repose sur des évaluations réalisées par des pairs. Les évaluateurs dits « techniques » sont des biologistes médicaux, qui ont une bonne expérience en qualité et en audit. Ils sont accompagnés par des évaluateurs qualitatifs missionnés par le Cofrac. L'ensemble des évaluateurs bénéficie d'une formation initiale et leurs pratiques d'évaluation font l'objet d'une harmonisation.

Il est possible pour le LBM de récuser tout ou partie de l'équipe d'évaluation si cela est dûment justifié. A l'issue de l'évaluation, le LBM a la possibilité de contester et même

refuser les écarts relevés. Les rapports d'évaluation font ensuite l'objet d'un examen collégial par le Comité Technique d'Evaluation (CTA) constitué de personnes n'ayant pas participé à ladite évaluation. C'est le directeur générale du Cofrac qui délivre la décision finale d'accréditation. Le Cofrac peut suspendre ou retirer l'accréditation si les critères ne sont plus satisfaits. Il en informe alors la HAS, l'ANSM et l'ARS.

#### 1.1.4 Les référentiels

Un référentiel regroupe l'ensemble des exigences qui s'appliquent à une activité. La biologie médicale en est dotée de plusieurs :

- Les référentiels réglementaires: lois, décrets, arrêtés comme développé précédemment.
- Les référentiels normatifs : internationaux, européens, nationaux.
- Les référentiels professionnels : sociétés savantes, groupes mutiprofessionnels.

Il est à noter que le GBEA reste le référentiel de base pour les LBM tant que ceux-ci ne sont pas accrédités.

##### 1.1.4.1 La norme NF EN ISO 15189 : « Laboratoire de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence » (10)

La norme NF EN ISO 15189 est fondée sur les normes ISO/CEI 17025 : « prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » et sur l'ISO 9001 : « système de management de la qualité, exigences ». La première version de la norme NF EN ISO 15189 a été publiée en 2001, puis elle a subi deux révisions, une première en 2007 puis une seconde en 2012. La norme évolue dans le sens de la série des normes ISO 9000, en intégrant notamment les exigences relatives à la cartographie des processus du laboratoire (processus métier, processus stratégiques, processus supports).

Cette norme internationale fournit les exigences de compétence et de qualité propres aux LBM. Elle comporte cinq chapitres dont deux principaux : les chapitres 4 et 5.

Chapitre 4- Exigences relatives au management	Chapitre 5- Exigences techniques
<ul style="list-style-type: none"> <li>4.1- Responsabilité en matière d'organisation et de management</li> <li>4.2- Système de management de la qualité</li> <li>4.3- Maîtrise des documents</li> <li>4.4- Contrats de prestation</li> <li>4.5- Examens transmis à des LBM sous-traitants</li> <li>4.6- Services externes et approvisionnement</li> <li>4.7- Prestations de conseils</li> <li>4.8- Traitement des réclamations</li> <li>4.9- Identification et maîtrise des non-conformités</li> <li>4.10- Actions correctives</li> <li>4.11- Actions préventives</li> <li>4.12- Amélioration continue</li> <li>4.13- Maîtrise des enregistrements</li> <li>4.14- Evaluation et audits</li> <li>4.15- Revue de direction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>5.1- Personnel</li> <li>5.2- Locaux et conditions environnementales</li> <li>5.3- Matériel de laboratoire, réactifs et consommables</li> <li>5.4- Processus pré-analytiques</li> <li>5.5- Processus analytiques</li> <li>5.6- Garantie de qualité des résultats</li> <li>5.7- Processus post-analytiques</li> <li>5.8- Compte-rendu des résultats</li> <li>5.9- Diffusion des résultats</li> <li>5.10- Gestion des informations de laboratoire</li> </ul>

**Tableau 2 : Chapitre 4 et 5 de la norme NF EN ISO 1589 version 2012**

Le chapitre 4 énonce les différentes exigences relatives au management. Cela concerne l'organisation générale du LBM et la mise en place du système de management de la qualité ainsi que les exigences à satisfaire pour que le système soit maîtrisé. Un point important réside sur le fait que le système qualité mis en place doit être un processus dynamique en amélioration constante et qui doit être régulièrement évalué.

L'amélioration continue est mise en œuvre grâce à la gestion des non-conformités et des réclamations et par la mise en place d'actions préventives et correctives. L'évaluation est réalisée à l'aide d'indicateurs qualité, d'audits réguliers et d'enquêtes de satisfaction qui feront l'objet de plans d'action.

Le chapitre 5 traite des exigences d'ordre technique, qui constitue le cœur du métier, du pré-analytique jusqu'au post-analytique.

La norme NF EN ISO 15189 encadre donc les différentes étapes de l'acte de biologie médicale : pré-analytique, analytique et post-analytique mais porte aussi sur l'organisation, le management et la compétence du personnel.

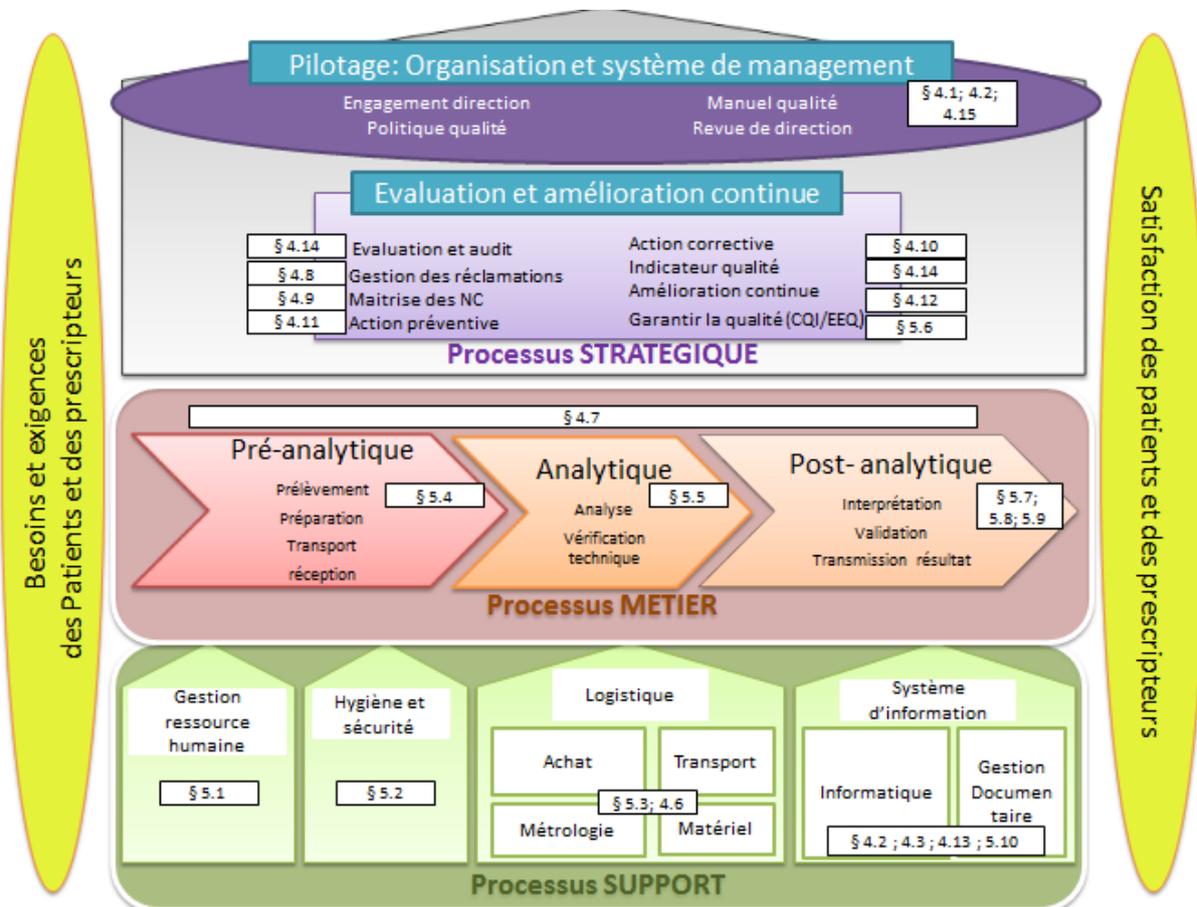


Figure 6 : Représentation des différents points de la norme sous forme de cartographie des processus

Dans le cadre de ce travail, et même si l'ensemble des dispositions générales ou transversales sont applicables, nous nous intéresserons particulièrement aux exigences des paragraphes 5.1 « Personnel », 5.3 « Matériel de laboratoire, réactifs et consommables », 5.5 « Processus analytique » et 5.6 « Garantie de qualité des résultats ».

#### 1.1.4.2 Guide et référentiels Cofrac

Le Cofrac a rédigé un certain nombre de documents relatifs à l'accréditation des LBM. On distingue :

- Les documents de référence (REF) :

Ils constituent des référentiels opposables c'est-à-dire que leur non-respect constitue un écart au même titre que le non-respect de la norme. Le plus important d'entre eux, le SH REF 02 « Recueil d'Exigences Spécifiques pour l'accréditation des LBM en France » a été rédigé par le Cofrac et le Ministère, en concertation avec les professionnels, il reprend les exigences réglementaires et normatives. Il est utile pour les biologistes afin de préciser les points restés vagues dans la norme ou imposés en France par la réglementation (validation,

durée d'archivage ou de conservation des documents, rôle des biologistes, qualifications requises, etc.) ainsi que pour les évaluateurs Cofrac afin d'harmoniser les évaluations des LBM. Le SH REF 02 a suivi les évolutions de la norme et des référentiels législatifs il en est aujourd'hui à sa 4<sup>ème</sup> version.

- Les guides techniques d'accréditation (GTA)

Ils apportent des précisions suffisantes pour atteindre les exigences de la norme. Ils ne sont pas d'application obligatoire. Le LBM peut répondre d'une autre manière aux exigences de la norme, à condition de présenter les éléments de preuve appropriés comme des recommandations ou des documents de société savantes.

Exemple : SH GTA 04 : « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale ». Ce document présente les principes généraux de la validation de méthode ainsi que les critères de performance à vérifier en fonction du type de méthode. De plus il propose des exemples pratiques.

- Les documents d'informations (INF) et les formulaires (FORM) qui ne sont pas non plus d'utilisation obligatoire.

Exemple : SH INF 50 : « Portées-types d'accréditation » / SH FORM 43 : « FICHE TYPE QUANTITATIF – Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale »

<b>Référence</b>	Titre
SH REF 00	Règlement particulier
SH REF 02	<b>Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012</b>
SH REF 03	Règlement de fonctionnement des commissions
SH REF 04	Recueil des notes de doctrine
	Recueil des critères complémentaires pour l'évaluation selon la norme NF EN ISO 15189
SH REF 05	Règlement d'accréditation
SH REF 06	Frais d'accréditation
SH REF 07	Tarifs
SH REF 08	<b>Expression et évaluation des portées d'accréditation</b>
LAB REF 13	Essais et analyses en dosimétrie des travailleurs
SH REF 20	Exigences spécifiques et recommandations d'accréditation en plombémie
SH GTA 01	<b>Guide technique d'accréditation en biologie médicale</b>
SH GTA 02	<b>Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale</b>
SH GTA 04	<b>Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale</b>
SH GTA 14	<b>Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale</b>
SH GTA 06	<b>Contrôle de qualité en biologie médicale</b>
LAB GTA 09	Guide technique d'accréditation dématérialisation des données – 1ère partie : Transmission électronique des rapports sur les résultats
LAB GTA 12	Guide Technique d'Accréditation en parasitologie et mycologie médicale
LAB INF 19	Liste des organisateurs de comparaisons inter laboratoires
SH INF 19	Liste des organisateurs d'évaluations externes de la qualité
SH INF 02	Liste des membres des instances de la Section Santé Humaine
SH INF 20	Modalités de candidature à l'accréditation par la section santé humaine du COFRAC
SH INF 50	<b>Portées-types d'accréditation</b>
SH FORM 03	Questionnaire d'auto-évaluation – Préparation de l'évaluation sur site selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012
SH FORM 05	Demande d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 – Questionnaire de renseignements
SH FORM 06	Liste détaillée des examens/analyses demandés à l'accréditation
SH FORM 43	<b>FICHE TYPE QUANTITATIF – Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale</b>
SH FORM 44	<b>FICHE TYPE QUALITATIF – Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale</b>

**Tableau 3 : Liste des documents COFRAC relatifs à l'accréditation des LBM (en gras les documents utilisés pour ce mémoire)**

## 1.2 Un travail qui s'inscrit dans un projet hospitalier

### 1.2.1 Le pôle de biologie du CHU de Nantes

#### 1.2.1.1 Présentation

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

d'évaluation externe des établissements de santé porte sur trois points : l'organisation et le fonctionnement général des établissements, les pratiques de soins, et l'information du patient.

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

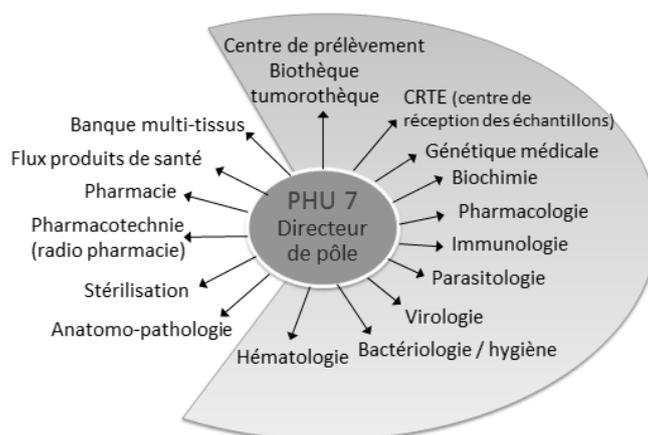


Figure 7 : Représentation schématique du PHU-7

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

#### 1.2.1.2 L'organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes. (12)

##### 1.2.1.2.1 Au niveau de l'institution :

La Direction affirme son engagement dans la mise en place de systèmes qualité spécifiques ou dans l'obtention de certifications. La Direction des Usagers, des Risques et de la Qualité (DURQ) accompagne les secteurs engagés dans des démarches de certification ou d'accréditation spécifiques et assure la cohérence des objectifs retenus.

La démarche d'accréditation du LBM est inscrite dans le plan pluriannuel qualité-risque –évaluation de l'hôpital.

### 1.2.1.2.2 Au niveau du laboratoire :

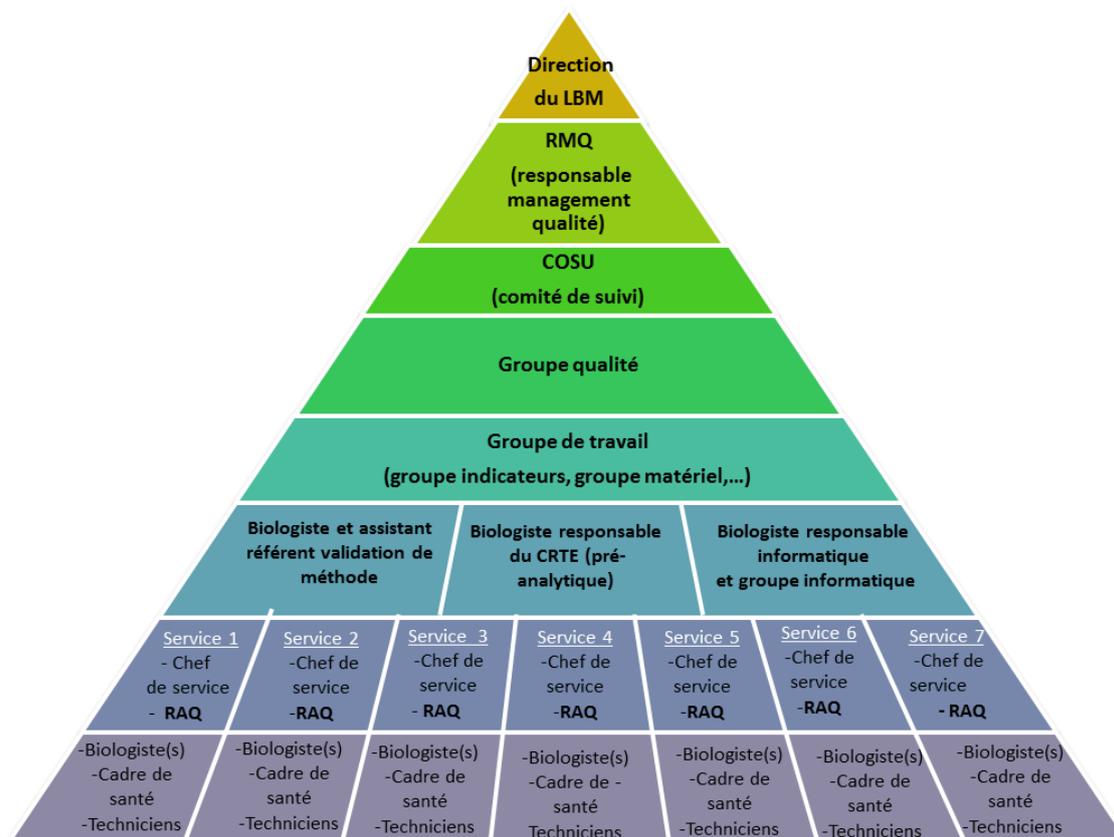


Figure 8 : Organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes en 2014

La Direction du Laboratoire définit la politique qualité. Elle s’engage à promouvoir la dynamique d’amélioration continue de la qualité et de la gestion des risques et donc de donner aux services du LBM les moyens nécessaires pour atteindre les objectifs qu’ils se sont fixés, en adéquation avec les moyens attribués au LBM par la Direction Générale.

Le responsable Management Qualité (RMQ) du LBM a la responsabilité de la mise en œuvre et du maintien du système de management de la qualité. Il travaille en collaboration avec les responsables qualité des secteurs avec qui il définit les priorités et planifie les objectifs. Il s’assure ensuite du suivi des plans d’action qui ont été définis. Il apporte également un soutien méthodologique aux secteurs du pôle, sensibilise les professionnels sur la qualité et veille à la cohérence de la documentation qualité. C’est lui qui a en charge d’organiser la revue de direction du pôle, de planifier les audits internes et d’organiser les équipes d’auditeurs. Une autre de ses missions est d’animer le groupe métrologie pour l’organisation des contrôles des appareils de mesure. Enfin c’est l’interlocuteur du COFRAC pour les modifications ou extensions de portée, transmis par les RAQ des secteurs.

Le pôle de biologie a désigné un biologiste responsable informatique, il est l'animateur du groupe informatique (le GIL) chargé d'assurer le lien entre le laboratoire et la Direction des Systèmes d'Information et Télécommunication (DSIT), notamment avec les informaticiens de la DSIT, référents sur la biologie. Ensemble, ils organisent par exemple les mises à jour de logiciels ou les qualifications du SIL.

Le pôle s'est également doté d'un biologiste et d'un assistant référents pour la validation des méthodes, qui apportent leur expertise et veillent à la cohérence des dossiers de validation dans les différents secteurs du laboratoire.

Le pré-analytique, au CHU de Nantes, est regroupé au sein du Centre de Réception et Traitement des Echantillons (CRTE), placé sous la responsabilité d'un biologiste.

Afin de mettre en œuvre la politique qualité adoptée par le Laboratoire, certaines structures dédiées ont été mises en place:

- Le comité de suivi 15189 (COSU) : ce comité est constitué de la direction et du service qualité du Laboratoire, des représentants de chaque service de Biologie Médicale (le cadre de santé, un biologiste et un technicien) et d'un représentant de la DURQ. Ce comité a pour mission d'assurer le suivi du plan d'actions dans le cadre de la mise en place de la démarche d'accréditation ISO 15189, de suivre les actualités réglementaires et de diffuser toutes informations utiles à la démarche qualité du Laboratoire.
- Le groupe Qualité : c'est un groupe de travail sur la mise en œuvre de la norme NF EN ISO 15189 au sein du laboratoire. Son objectif est de développer des projets transversaux pour l'amélioration de la qualité et l'évaluation des pratiques professionnelles du LBM en lien avec les objectifs définis par la Direction du Laboratoire. Il est constitué d'au moins un biologiste de chaque service de Biologie Médicale et du service qualité du pôle. Il permet l'évaluation et l'harmonisation des pratiques professionnelles du laboratoire. Il organise des actions d'information et de sensibilisation et élabore si nécessaire des documents qualité. Il assure la veille documentaire, réglementaire et normative ainsi que le suivi des actions d'amélioration et des indicateurs.
- Des sous-groupes de travail peuvent enfin être organisés sur certaines thématiques (matériels, validation de méthodes, indicateurs...).

Le responsable management qualité du Laboratoire participe à ces différents groupes et aux réunions dans les services, ce qui permet de mettre en cohérence les actions d'amélioration menées dans les différents services.

#### 1.2.1.2.3 Au niveau des services:

Chaque service de biologie médicale définit dans sa fiche manuel qualité, complément du manuel qualité du LBM, l'organisation qui lui permet de répondre aux exigences de l'accréditation.

De manière générale, le chef de service veille au respect du plan qualité du LBM et au respect des objectifs du système de management de la qualité. Avec le responsable qualité du secteur, il veille à la mise en place des documents « qualité » nécessaires à son activité et s'assure qu'ils sont communiqués à tout le personnel concerné et que les instructions sont comprises et mises en œuvre. Il met en œuvre des méthodes d'analyses validées, adaptées aux besoins et s'assure qu'il dispose des moyens d'assurer la qualité des résultats des examens ou analyses réalisés dans chaque unité fonctionnelle. Il veille à ce que les personnels soient qualifiés et habilités pour exercer les tâches qui leur sont confiées et que leurs compétences sont maintenues.

Le chef de service désigne un ou plusieurs responsable(s) qualité (RAQ) de secteur. Ils sont le garant de l'application de la politique qualité du pôle. Chaque RAQ anime et organise la démarche qualité dans son périmètre d'action et doit rendre compte au chef de service et au RMQ du pôle du suivi de la démarche dans son secteur. Il participe aux groupes liés à la démarche qualité du pôle ou tout au moins se tient informé des travaux des différents groupes de travail auxquels il ne participe pas. Il s'assure de la mise à jour de la liste des analyses et de la portée d'accréditation. Il veille à la bonne application de la procédure de gestion documentaire, ainsi qu'à la mise en place d'un système de déclaration et d'analyse des événements indésirables par l'intermédiaire de la cellule d'analyse des fiches d'évènement indésirable (CAFEI) mise en place à cet effet. Il a en charge d'organiser la revue de direction de son secteur et de s'assurer du suivi des indicateurs qualité. Il évalue également les besoins en audits internes.

Le RAQ peut s'appuyer sur les pilotes de processus ou les personnes référentes (gestion documentaire, matériel, commandes,...) de son secteur.

Le biologiste médical est responsable, dans le respect de l'organisation fonctionnelle du laboratoire, de la définition et de l'application des critères d'acceptabilité des

échantillons biologiques, de la validation des méthodes d'examens ou d'analyses ainsi que de la transmission des comptes rendus d'examens ou d'analyses, validés et interprétés. Il assure une prestation de conseil en réponse à des appels téléphoniques ou par l'intermédiaire de staffs clinico-biologiques, ou de réunions du comité clinico-biologique. Il a également en charge la mise en œuvre de la politique destinée à assurer la qualité des procédures analytiques (suivi des contrôles de qualité interne et évaluation des contrôles de qualité externes). Il s'assure de la mise en place des programmes de maintenance et d'étalonnage, ainsi que des plans d'actions correctives ou préventives. Le biologiste assure la veille technologique et documentaire dans son domaine de compétence, la recherche et le développement de nouvelles analyses, ainsi que le respect des exigences d'accréditation. Il veille à la formation, à l'habilitation et au maintien des compétences du personnel technique, des internes, des étudiants et des stagiaires.

Le cadre de santé assiste le cadre supérieur de santé dans l'exercice de ses missions. Il participe à la démarche qualité du service de biologie médicale et à l'évaluation des fournisseurs.

Les techniciens de laboratoire assurent la réalisation des examens biologiques en garantissant la qualité de la réalisation des analyses dans les délais compatibles avec l'attente des services de soins et l'intérêt du patient, ceci dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire et des règles d'hygiène et de sécurité.

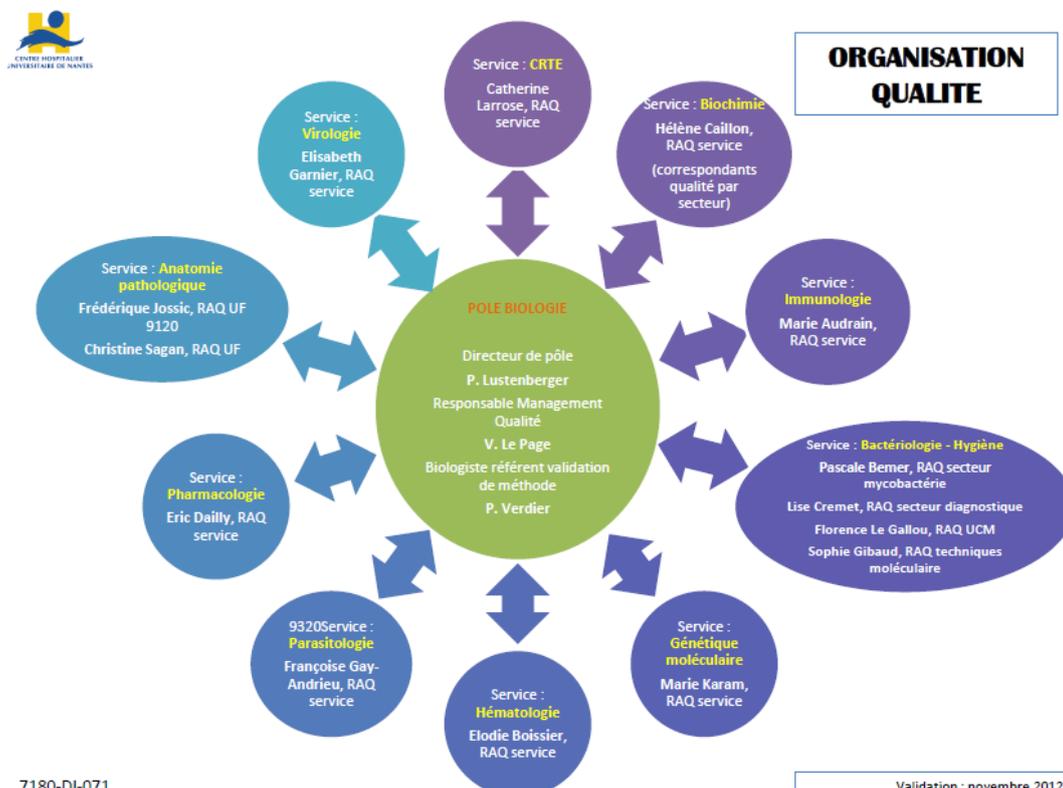


Figure 9 : Organigramme qualité du LBM

#### 1.2.1.2.4 Les outils transversaux de management de la qualité au LBM du CHU de Nantes (13).

##### La revue de direction :

La revue de direction permet de vérifier la pertinence et l'efficacité du SMQ en relation avec la politique qualité et les objectifs fixés. Afin de dégager les opportunités d'amélioration, les audits internes, les indicateurs, les plans d'actions, les non-conformités et événements indésirables et les retours d'information des clients sont revus lors de ces réunions. Cette revue est planifiée au moins une fois par an.

##### Le système documentaire :

Il fait l'objet d'une procédure « Elaboration et Gestion documentaire ». L'ensemble des documents est géré par le logiciel ENNOV, partagé par l'ensemble des services du CHU de Nantes. Ce logiciel permet la consultation des documents validés et de tracer les circuits de validation et de diffusion ainsi que le cycle de vie de chaque document.

La Direction du laboratoire met à disposition des services de biologie des documents (procédures, modes opératoires, autres) dont la portée est transversale. Le service intègre alors cette documentation à son système documentaire. Ces documents peuvent être ensuite complétés pour leur application dans le service.

##### Le traitement des réclamations :

L'enregistrement et le suivi des réclamations des services de soins ou des organismes externes sont réalisés grâce au logiciel Norméa.

##### La gestion des non conformités et événements indésirables, actions correctives :

La gestion des non conformités fait l'objet d'une procédure d'identification, de gestion et de traitement. L'enregistrement et le suivi des événements indésirables sont également réalisés grâce au logiciel Norméa, en revanche les non-conformités des prélèvements, à réception, sont notées dans le SIL.

##### Les actions préventives :

La gestion des actions préventives fait l'objet d'une procédure spécifique « Identification et gestion des actions préventives ».

### Les audits qualité internes :

L'efficacité du système de management de la qualité est évaluée entre autres par un programme annuel d'audits internes. Chaque service établit en fin d'année un planning d'audits internes souhaités sur l'année à venir (voire sur les deux années à venir), en fonction des audits précédents, des événements indésirables, de l'actualité du service ou d'une modification dans la portée d'accréditation. Le responsable management de la qualité planifie alors les audits sur l'ensemble des services du laboratoire. Le planning prévisionnel est envoyé à la DURQ. Les auditeurs internes (biologistes, techniciens, ingénieurs du pôle) sont formés et habilités pour les audits.

#### 1.2.1.3 Avancement de l'accréditation.

Il est à noter que dès 2010, deux services du LBM (génétique et immunologie) ont été certifiés ISO 9001. Leur démarche volontaire répondait à une demande de leurs interlocuteurs, notamment dans le cadre de la participation à des recherches cliniques. Les dispositions mises en œuvre pour répondre à la certification ISO 9001 (approche processus, indicateurs, évaluation fournisseurs) ont pu être déployées dans les autres services du laboratoire. La certification de ces deux services a ainsi permis une bonne préparation à l'accréditation, notamment pour l'application du chapitre 4 portant sur les exigences relatives au management de la qualité.

Fin 2012, le LBM du CHU de Nantes est entré dans la démarche d'accréditation avec le dépôt de son dossier au COFRAC. L'audit initial a eu lieu en octobre 2013 selon le référentiel NF EN ISO 1589 version 2007. L'audit concernait 6 familles réparties entre 4 services du LBM : la biochimie générale et spécialisée (sites HD et HGRL), la pharmacologie, l'immunologie (auto-immunité et allergologie) et enfin la génétique constitutionnelle et somatique, ce qui représentait un total de 157 paramètres. Le COFRAC a relevé 16 écarts dont aucun n'était critique. Le laboratoire a reçu sa notification d'accréditation en avril pour une prise d'effet au 1<sup>er</sup> mai 2014.

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

Il est également prévu, lors de l'audit de surveillance en janvier 2015, le passage de la norme NF EN ISO 1589 version 2007 à la version 2012.

## 1.2.2 Le laboratoire d'hématologie

### 1.2.2.1 Présentation

Le laboratoire d'hématologie est organisé en plusieurs secteurs, répartis sur deux sites : l'Hôtel-Dieu et l' HGRL.

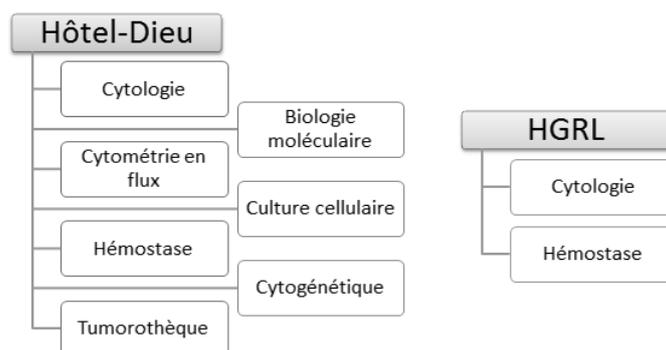


Figure 10 : Organisation du laboratoire d'hématologie

Le service est constitué de quatorze biologistes dont quatre hospitalo-universitaires (1 PUPH, 1 MCUPH et 2 AHU), de deux ingénieurs, d'un cadre de santé et de quarante et un techniciens. Il comporte un responsable qualité et un responsable informatique. L'organigramme est présenté en **annexe I**. Il existe une activité 24/24, 7/7 de cytologie et d'hémostase, et, à l'Hôtel Dieu, des secteurs spécialisés également en cytologie (myélogrammes...) et en hémostase, ainsi que des secteurs de cytogénétique, biologie moléculaire, culture cellulaire et tumorothèque.

Le secteur d'hématologie cellulaire du laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes a comme activité principale le suivi des paramètres hématologiques des patients hospitalisés et externes ainsi que le dépistage et le diagnostic des anomalies du globule rouge, des plaquettes, et des hémopathies malignes. Les analyses sont réalisées sur les mêmes automates en service normal et en service de garde. En 2012, sur le site de l'Hôtel-Dieu, il a été réalisé environ 120 000 numérations seules et 120 000 numérations formules sanguines, avec environ 200 lames par jour.

Le secteur de cytologie utilise comme SIL le logiciel Dxlabs (société Medasys) et comme middleware la solution MPL (société Roche). Ces outils permettent la validation

technique des résultats, et affichent les graphes d'analyse cellulaire, les résultats numériques, les antécédents et les alarmes. Ils prennent également en charge les contrôles qualité et la gestion des maintenances.

#### 1.2.2.2 Le contexte

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

Les objectifs principaux étaient :

- de poursuivre les efforts réalisés au laboratoire concernant la standardisation des processus de prise en charge des prélèvements
- d'augmenter la sécurité et la traçabilité de la gestion des tubes-échantillons et de diminuer le nombre d'erreurs liées au traitement manuel (gestion automatique des ré-analyses)
- d'optimiser le délai de rendu des résultats en particulier durant les phases de pic d'activité afin d'assurer une excellente qualité analytique 24h/24, adaptée à une activité d'urgence en assurant une disponibilité maximale des équipements notamment à l'aide de solutions de backup cohérentes
- d'optimiser les processus automatisés des analyses des échantillons biologiques
- d'améliorer les performances analytiques des automates de numération, notamment en termes de détection de cellules anormales circulantes
- d'améliorer l'hygiène et la sécurité du personnel
- d'inclure un module capable d'analyser les liquides biologiques pour faire face à l'augmentation croissante des demandes dans ce domaine.

Après appel d'offre, l'acquisition et l'installation d'une nouvelle chaîne analytique SYSMEX® de dernière génération, la chaîne XN 9000, ont été décidées.

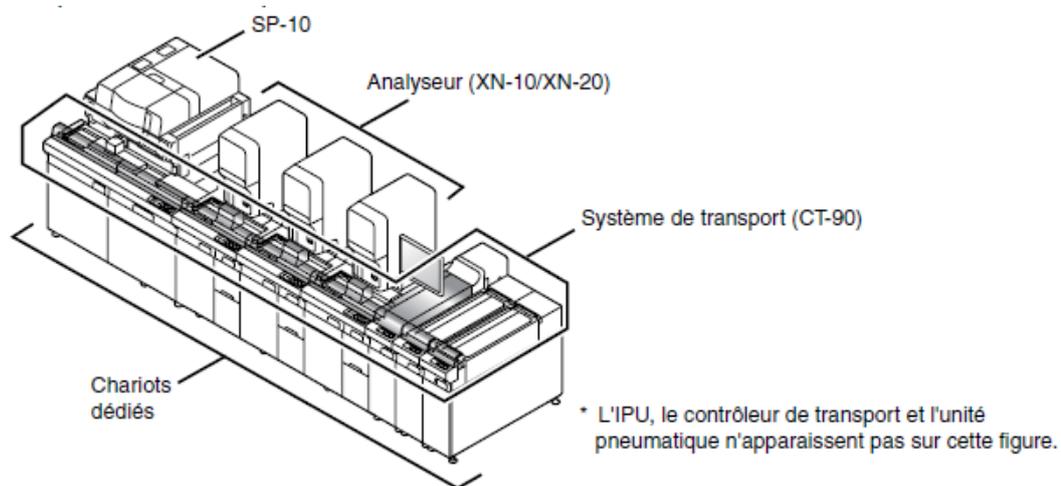


Figure 11 : Chaîne XN-9000 (14)

Cette chaîne est composée:

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

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

préparation des réactifs (RPU) permet de réduire les manutentions en générant la dilution du réactif Cellpack concentré avec de l'eau déminéralisée afin de préparer le diluant et le liquide de gainage.

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

- REFLEX : ces règles sont dictées par l'informatique de l'automate lui-même, imposées par le fournisseur. Il en existe deux : ajout de PLT-F si plaquettes <20G/L, >1000G/L, ou anomalie de la courbe de répartition des plaquettes et le mode « blanc bas » si globules blancs < 1 G/L. Dans ce dernier cas, l'échantillon est analysé de nouveau en comptant trois fois plus de cellules pour une meilleure précision de la formule. Il est à noter que cette dernière règle a été désactivée par choix du laboratoire qui n'effectue pas de formule si le taux de globules blancs est inférieur à 1G/L.
- RERUN : en fonction des résultats, l'E-IPU interroge le middleware et applique directement les règles d'expertise élaborées par les biologistes comme l'ajout d'une formule ou de la numération des réticulocytes, les repassages, ou la création d'une lame...

Pour une application optimale, il est nécessaire de bien en comprendre ce fonctionnement et d'être particulièrement vigilant lors de la rédaction des règles d'expertise. Ce système nécessite dans le cadre de l'accréditation un gros travail de validation afin de s'assurer de la bonne application des différentes règles élaborées. Il est également nécessaire de s'assurer de leur entière compréhension par le personnel technique.

En ce qui concerne la lecture des lames de sang, le laboratoire a fait le choix de ne pas avoir de lecteur de frottis sanguin automatisé. Il dispose de 4 microscopes pour les postes techniciens dont l'un est réservé à l'urgence et de deux microscopes pour les biologistes dont un multi-tête indispensable à la formation des internes et du personnel.

L'arrivée d'un nouvel automate imposant une vérification de méthode a participé à la décision de présenter à l'accréditation la numération formule sanguine pour la prochaine visite COFRAC.

Il faut également noter la présence de deux autres automates de marque SYSMEX® sur le site de l'hôpital HGRL : un XS1000i et un XE2100, qui nécessitent également une vérification de méthode effectuée a posteriori de leur installation. Les étalements de frottis se font manuellement et sont colorés sur un colorateur automatisé sur ce site.

## **2 Deuxième partie : Application des référentiels en vue de l'accréditation de l'hémogramme - processus analytique**

### **2.1 Réalisation de la numération formule sanguine**

#### **2.1.1 L'hémogramme : un examen clé**

L'hémogramme est l'examen de biologie le plus prescrit et ses indications très nombreuses dépassent le cadre des pathologies hématologiques. De manière non exhaustive, il est indiqué notamment en cas de syndrome anémique, infectieux, hémorragique ou tumoral mais aussi devant une altération de l'état général, en cas de thrombose, de prurit à l'eau, ou d'érythrose cutanée. Il est également prescrit au cours de la grossesse, dans le cadre de la médecine du travail ou encore dans la surveillance de certains traitements. Par le grand nombre de paramètres qu'il comporte, il apporte en effet de nombreuses informations. Il est réalisé à partir d'un prélèvement de sang veineux périphérique recueilli dans un tube contenant un anticoagulant de type EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique).

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

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

- Les érythrocytes : avec la numération des globules rouges (GR), le taux d'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), l'indice de distribution des globules rouges (IDR) ainsi que les indices érythrocytaires qui comprennent le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) développé par M. Wintrobe pour

classifier les anomalies des globules rouges. Enfin, la numération des réticulocytes, qui ne fait pas systématiquement partie de l'hémogramme, mais qui peut apporter de précieuses informations notamment lors de la découverte d'une anémie normocytaire.

- Les plaquettes : avec leur numération et des informations sur leur taille grâce au volume plaquettaire moyen (VPM).
- Les leucocytes : avec leur numération (GB), et leur répartition entre les 5 populations normales. La formule comprend : les polynucléaires neutrophiles (PN), éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB), les lymphocytes et les monocytes. Eventuellement, la présence d'autres cellules anormales (immature granuleux, blastes...) peut être mise en évidence.

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

L'hémogramme automatisé se révèle exact et précis quand il est normal ou quand il met en évidence des variations quantitatives modérées. En revanche dans certaines circonstances, liées à certaines caractéristiques de l'échantillon, à une pathologie particulière, à des modifications induites après le prélèvement, ou intrinsèques à la technologie utilisée pour la mesure, les automates peuvent induire des résultats erronés. Il est important que les biologistes et techniciens connaissent ces différentes situations tout comme le principe de fonctionnement des automates pour ne pas rendre de faux résultats pouvant avoir un impact pour le patient et sa prise en charge.

Dans un certain nombre de cas l'hémogramme automatisé doit être complété par un examen du frottis sanguin permettant de mettre en évidence des anomalies morphologiques sur les différentes lignées et de rechercher et d'identifier des cellules anormales : myélémie, blastes ou cellules lymphomateuses.

Normalement comme tout examen complémentaire, la numération-formule doit correspondre à une question posée par le clinicien, et le biologiste doit, par une bonne qualité d'analyse, donner quand c'est nécessaire une interprétation complète et intelligible à partir des renseignements numériques et qualitatifs obtenus.

Le processus d'accréditation qui sous-entend la maîtrise des phases pré-analytique, analytique et post-analytique et qui met l'accent sur la formation, l'habilitation et le maintien des compétences du personnel permet de garantir la bonne exécution de ces analyses.

### 2.1.2 Description du processus

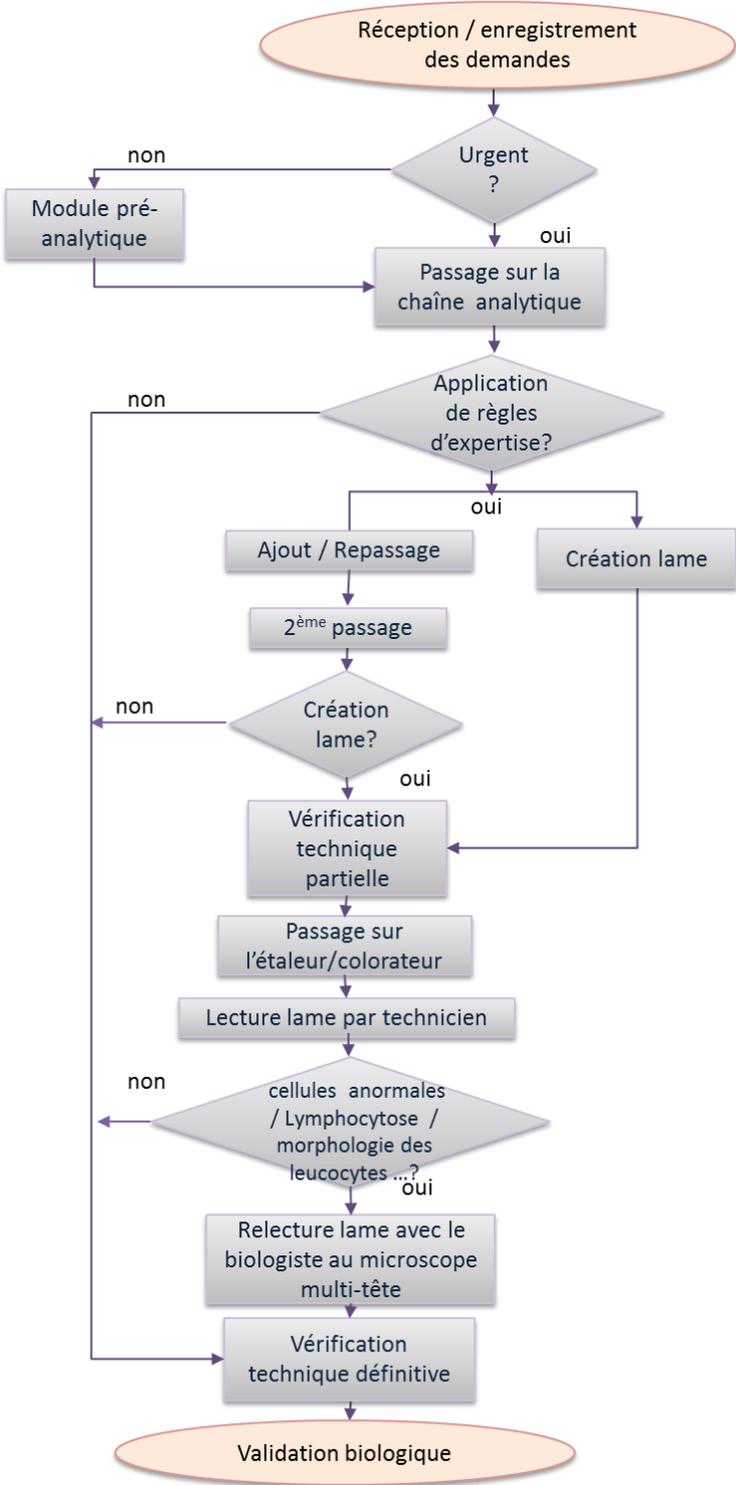


Figure 12 : Logigramme : processus de réalisation de la NFS

### 2.1.3 Choix des intervalles de référence biologique

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

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

**Tableau 4 : Références bibliographiques ayant motivé le choix des intervalles de référence**

Cela a également permis d'actualiser et d'harmoniser les valeurs de référence entre les différentes interfaces utilisées : middleware, SIL, et logiciel informatique du personnel soignant. Les cliniciens ont été tenu informés par courrier de la réactualisation des intervalles de référence.

Les intervalles de référence des paramètres de la numération formule sanguine en fonction de l'âge sont présentés en **annexe II**.

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

### 2.2.1 Introduction- Définition.

La vérification/ validation de méthode s'effectue en deux phases : une phase initiale avant la mise en œuvre en routine et une phase de vérification continue afin de confirmer les performances dans le cadre du fonctionnement quotidien du laboratoire. Cette deuxième phase sera développée dans la partie 2.4.

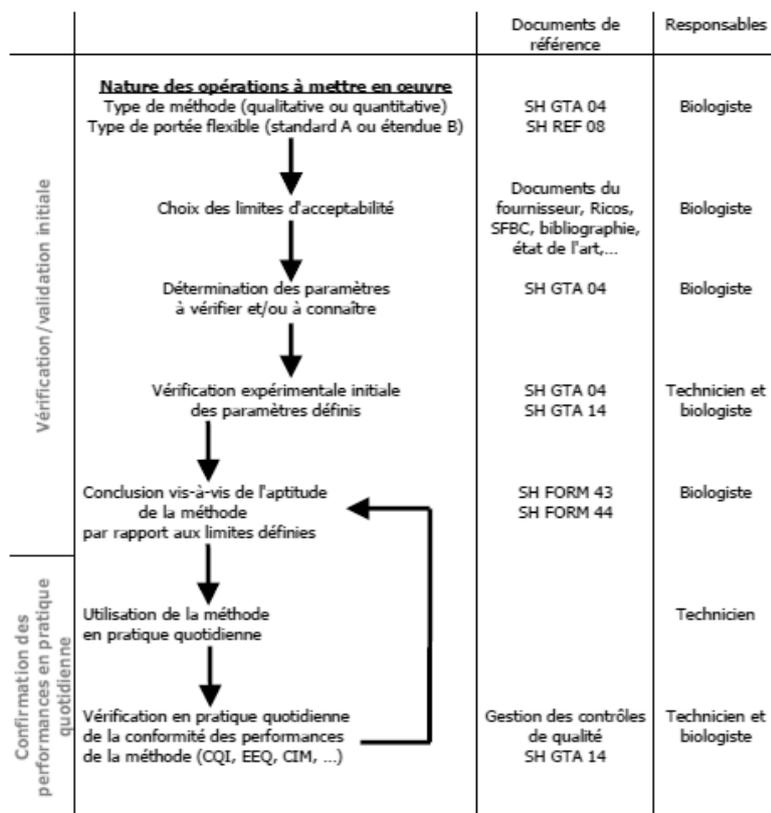


Figure 13 : Logigramme de vérification/Validation des méthodes (15)

La vérification/validation des méthodes d'analyse est une exigence forte de la norme. L'accréditation d'un laboratoire passe forcément par cette étape qui permet d'avoir une bonne connaissance des méthodes d'analyses, de leurs performances et de leurs limites. Elle a pour but d'évaluer les méthodes employées dans les conditions opératoires du laboratoire, de manière objective, et d'apporter les preuves de la validité des résultats rendus, justifiant ainsi leur utilisation pour les patients.

Le laboratoire peut demander une accréditation suivant une portée flexible standard (A) ou suivant une portée flexible étendue (B). Ces notions sont développées dans le SH REF 08.

Portée flexible standard (A) : « portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du Cofrac, d'utiliser sous accréditation les révisions successives des méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées. »(16)

Selon la norme NF EN ISO 15189 chapitre 5.5.1 « les procédures d'examens validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une **vérification** indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement », celle-ci « doit confirmer, par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les performances annoncées pour la procédure ont été satisfaites »(10) En portée A, la validation des méthodes pour un LBM est donc réduite à une « **vérification** » sur site. Celle-ci a pour objectif de montrer que des performances suffisantes sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire.

On adopte ainsi des méthodes reconnues (méthode normalisée, méthodes /équipements/ réactifs « fournisseur » marqués CE, ...) qui reposent sur des compétences techniques déjà démontrées. Le laboratoire doit vérifier que la méthode est bien utilisée dans son domaine et doit prouver sa maîtrise dans son environnement.

Portée flexible étendue (B) : « portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du Cofrac, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées. »(16) Les méthodes conçues ou développées par le laboratoire, les méthodes normalisées mais utilisées en dehors du cadre prévu ou les méthodes modifiées après validation doivent selon la norme faire l'objet d'une « **validation** » et non une vérification. « La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles, que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites »(10). Les recherches bibliographiques ainsi que les études expérimentales devront être plus approfondies.

En matière de validation/vérification des méthodes, il est nécessaire de distinguer deux cas :

- **les méthodes de type quantitatif** : « elles fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité

(analyte, molécule, substance, cellule ou organisme,...) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes). Sont également assimilés au type quantitatif les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable (absorbance par exemple), avec interprétation par rapport à un seuil (examens réalisés en technique EIA ou RIA par exemple) » (17)

- **les méthodes de type qualitatif** : « le résultat de ce type de méthode n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée. On peut classer dans cette catégorie tous les examens où aucune mesure d'une donnée quantifiable ne peut être déterminée et ceux dont le résultat est obtenu par l'observation de la réaction, par comparaison avec des témoins positif et négatif notamment. »(17)

Les éléments à consigner et les critères de performance à évaluer dans le dossier de vérification/validation de méthode dépendent du type de méthode, il est donc très important de le définir précisément pour chacun des examens pratiqués par le laboratoire. Toujours selon la norme « le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification/validation et enregistrer les résultats obtenus. » Ces informations sont consignées dans le dossier de vérification/validation de méthode qui peut s'appuyer sur les formulaires édités par le COFRAC : SH FORM 43 (méthode de type quantitative) ou SH FORM 44 (méthode de type qualitative) ou bien tout autre format mais qui doit comporter au minimum toutes les rubriques présentes sur ces formulaires.

## 2.2.2 L'hémogramme automatisé

### 2.2.2.1 Méthodologie

#### 2.2.2.1.1 Plan d'action

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

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

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

Dans un premier temps, il est indispensable de définir quels sont les paramètres qui devront faire l'objet d'une vérification de méthode, c'est-à-dire ceux mesurés par l'automate. En effet l'hémogramme est composé de nombreuses analyses dont les modalités de détermination diffèrent suivant l'automate utilisé. Nous présentons dans le tableau suivant la liste des paramètres mesurés et calculés pour les automates SYSMEX :

Paramètres mesurés			Paramètres calculés		
Paramètre	unité	Principe mesure	Paramètre	unité	Calcul
GR	T/L	Impédance	VGM	fl	Ht(%)*10/GR(T/L)
Ht	%	Impédance	CCMH	g/dl	Hb(g/dL)*100/Ht(%)
Hb	g/dL	Spectrophotométrie	TCMH	pg	Hb(g/dL)*10/GR(T/L)
IDR	%	Impédance	VPM	fl	PCT % *10000/ PLT (G/L)
Plaquettes-I	G/L	Impédance	PN	%	PN(G/L)*100/GB(G/L)
Plaquettes fluo	G/L	C.M.F	Ly	%	Ly(G/L)*100/GB(G/L)
Plaquetocrite	%	Impédance	Mono	%	Mono(G/L)*100/GB (G/L)
GB	G/L	C.M.F	PNE	%	PNE(%)*100/GB(G/L)
PN	G/L	C.M.F	PNB	%	PNB(%)*100/GB(G/L)
Ly	G/L	C.M.F	IG	%	IG(%)*100/GB(G/L)
Mono	G/L	C.M.F	Réticulocytes	G/L	Ret%o *GR*10 <sup>3</sup> /1000
PNE	G/L	C.M.F	EB	%	EB(%)*100/TNC-N(G/L)
PNB	G/L	C.M.F			
IG	%	C.M.F			
EB	G/L	C.M.F			
Réticulocytes	G/L	C.M.F			

Tableau 5 : la liste des paramètres mesurés et calculés pour les automates SYSMEX

### 2.2.2.1.2 Description de la méthode

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

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

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

**Tableau 6 : Extrait du SH INF 50 (18)**

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

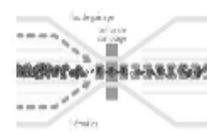
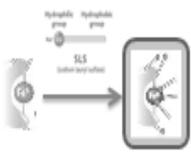
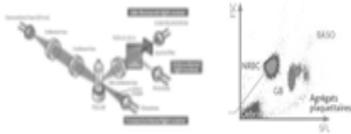
Analyte / Mesurande :	Globules rouges	Hémoglobine	Globules blancs
Principe de la mesure :	Impédance	Spectrophotométrie	Cytométrie en flux
Méthode de mesure :	<p>Le passage de cellules en suspension dans un liquide conducteur ( principe de <b>focalisation hydrodynamique à volume fixe calibré</b>) à travers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

Tableau 7 : Description de la méthode pour la mesure des hématies, de l'hémoglobine et des leucocytes

### 2.2.2.1.3 Maitrise des risques

L'analyse de risque est un élément obligatoire à fournir dans le dossier de validation d'une méthode analytique, et la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 élargit d'ailleurs son domaine d'application à l'ensemble des processus du LBM. Son but est de réaliser une identification des points critiques de chaque technique et d'envisager les mesures de maîtrise à adopter. L'analyse de risque a été réalisée de manière collégiale lors de réunions avec des biologistes et des techniciens. Elle est présentée ici sous la forme des 5 M c'est-à-dire en listant les points critiques et les moyens de maîtrise du Matériel, de la Main-d'œuvre, de la Méthode, du Milieu et de la Matière.

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<b>Matériel</b>		
Automates XN-10	Dérive de l'automate	Passage des CQI/EEQ/ = Vérification des performances en continue
	Absence ou problème de maintenance	Opération de maintenance décrit dans MO (9240-MO-242) Suivie et rappel des maintenances dans le middleware
Systèmes informatiques	Pannes	Procédures dégradée (9240-PR-012, 7180-PR-031)
	Problème de transmission des résultats	Vérifications des connexions et transfert de donnée
<b>Matière</b>		
Echantillon sang EDTA	Problème d'homogénéisation	Agitation rack de tube (x10) avant passage sur automate : formation personnel
	Quantité insuffisante	Vérification visuelle
	Micro caillot dans les tubes pédiatriques	Vérification de l'absence de caillot avant toute analyse de microtube (9240-MO-154)
	Prélèvement hémolysé/lactescent/agglutine froide	Vigilance sur la CCMH Passage à 37° à l'étuve... Substitution du plasma (9240-MO-153)
Réactifs	Péremption / rupture de stock / problème de conservation	Gestion des stocks (par Gesstock), Traçabilité des lots et des péremptions par les automates, MO gestion des réactifs (9240-MO-248)
Contrôle	Gestion	Gestion des CQI (9240-MO-243) Conduite à tenir en cas de CQI non conforme (9240-MO-254)
<b>Milieu</b>		
Conditions environnementales	Température ambiante pour les automates et réactif sauf CQI (2-8°)	Pièce climatisé Frigo cartographié
	Electricité	Automates sur réseau ondulé
<b>Méthode</b>		
Procédure	Mauvaise connaissance des MO/ Procédure obsolète	Gestion documentaire- mise à jour des documents
Résultats urgents	Transmission/information	- Résultats à téléphoner dans les services (9240-DI-072) - Résultats a téléphoné au biologiste en période de garde (9240-DI-078)
Règles d'expertises	Création/modification	- Référent informatique (profil paramétreur limité) - Vérification/ validation de leurs applications
<b>Main-d'œuvre</b>		
Personnel	Vérification analytique	-Formation/habilitation/maintien des compétences (9240-IM-121, 9240-MO-223) - MO de validation de la lignée érythrocytaire, plaquettaire et leucocytaire (9240-PR-027/030/031)
	Fonctionnement des automates	- Formation/habilitation - MO utilisation de la chaîne, passage des tubes (9240-PR-029/ 9240-DI-090/9240-MO-247)

Tableau 8 : Analyse de risque de l'hémogramme automatisé

#### 2.2.2.1.4 Définir les critères de performance à vérifier

Pour déterminer quels sont les critères de performance à vérifier il convient de définir pour chaque examen le **type de flexibilité** et le **type de méthode** (quantitative ou qualitative). En ce qui concerne la réalisation de l'hémogramme automatisé, l'ensemble des analyses correspond à une méthode quantitative de portée A puisque le système analytique est commercialisé et marqué CE.

Pour la réalisation de la vérification/validation de méthode, le LBM peut se reporter au SH GTA 04 "Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / de validation (portée B) des méthodes en biologie médicale" qui présente les critères de performance à vérifier en fonction du type de méthodes. Ainsi pour une méthode quantitative de portée A les données préconisées par le SH GTA 04 sont rapportées dans le tableau ci-dessous :

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

Tableau 9 : Extrait du SH GTA 04 (19)

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

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

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

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

#### 2.2.2.1.5 Choix des limites acceptables

L'objectif d'une vérification / validation de méthode est de déclarer l'aptitude du processus analytique par rapport à des limites acceptables ou des spécifications que le laboratoire s'est préalablement fixées. Le choix des limites acceptables doit se faire préalablement à la vérification bibliographique et expérimentale de la méthode. Les limites acceptables définies par l'état de l'art, comme par exemple les critères publiés par la SFBC pour un certain nombre de paramètres de biochimie, peuvent être utilisées. L'état de l'art représente les performances analytiques obtenues, à un moment donné, dans un certain nombre de laboratoires. (20) Il s'agit d'une approche qui utilise les meilleurs résultats de laboratoires (20 à 50% selon les auteurs) qui participent à des programmes de contrôle de qualité intra et/ou inter laboratoire. Pour que leur utilisation soit pertinente il est nécessaire de s'assurer que les spécimens de contrôle utilisés se comportent comme des spécimens « biologiques ». En ce qui concerne les paramètres d'hématologie, il n'existe à l'heure actuelle aucune publication de limites acceptables basées sur l'état de l'art.

Il existe une autre méthode de détermination des limites acceptables, basée sur l'étude des variations biologiques intra et inter-individuelles, exemple Ricos et al.(21) L'idée est que pour pouvoir mettre en évidence des variations anormales chez une même personne ou par rapport à un groupe choisis comme référence, il faut que la reproductibilité de la technique utilisée soit inférieure à la variation biologique. Différents auteurs, Fraser(22) Ricos (21), définissent des spécifications minimales, souhaitables et optimales de fidélité intermédiaire (I), d'erreur de justesse (B : biais) et d'erreur totale (ET) en fonction des variations biologiques intra-individuelles et inter-individuelles de l'analyte considéré.

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

**Tableau 10 : Objectifs analytiques proposés par Fraser à partir de la variabilité biologique (23)**

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

Le référentiel Ricos et al.(21) ne donne pas de critères d'acceptabilité pour des niveaux bas ou élevés mais seulement pour des niveaux considérés comme normaux contrairement à celui de la SFBC. Cependant ce référentiel à l'avantage d'être revu tous les ans. Les critères d'acceptabilité doivent être fixés en fonction des besoins du laboratoire, en tenant compte de l'interprétation clinique et de la particularité de ses patients.

Cependant lors de la vérification de méthode initiale d'une méthode de portée A, il convient avant tout de s'assurer que les performances de l'automate répondent aux spécifications annoncées par le fournisseur. Il a été décidé dans un souci d'uniformisation de choisir comme critères de performance pour l'ensemble des paramètres de l'hémogramme les items indiqués dans le tableau ci-dessous:

Critère de performance	Choix des limites acceptables
Fidélité intermédiaire	CV Ricos minimal ou CV fournisseur si inférieur à celui de Ricos
Répétabilité	$0.75 * CV$ Fi Ricos (20) ou CV fournisseur si inférieur à Ricos
Exactitude	critère retenu par l'organisme EEQ ProBioqual

**Tableau 11 : Choix des limites acceptables**

### 2.2.2.2 Résultats : vérification expérimentale des critères de performance sur le XN-9000 de SYSMEX®.

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

#### 2.2.2.2.1 Fidélité

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

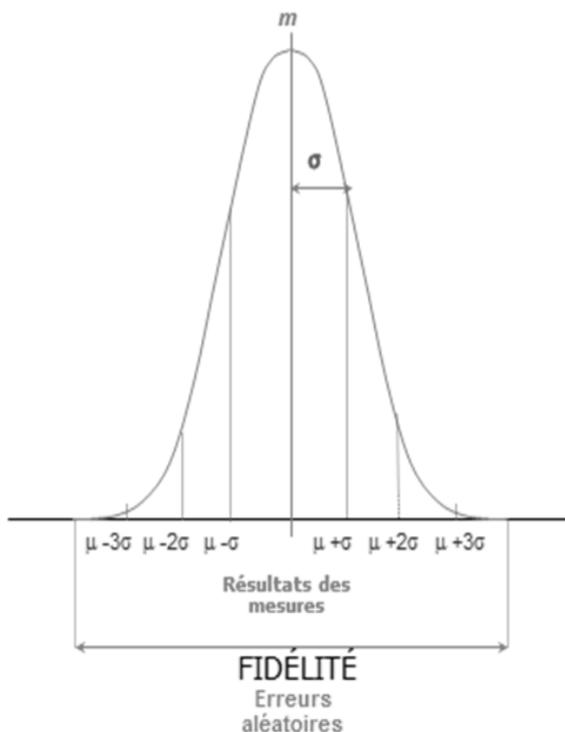


Figure 14 : Représentation schématique de la fidélité

$m$  = moyenne. Elle est égale à la somme des données divisée par leur nombre.

$\sigma$  = écart-type. Il sert à mesurer la dispersion d'un ensemble de valeurs autour de leur moyenne. Plus l'écart-type est faible, plus la population est homogène.

CV= coefficient de variation. Il correspond à une mesure relative de dispersion, c'est le rapport de l'écart-type à la moyenne. Plus la valeur du coefficient de variation est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande. Il est généralement exprimé en pourcentage.

L'utilisation de l'écart-type pour comparer les dispersions de série statistique n'est approprié que si les moyennes sont du même ordre de grandeur et en l'absence de valeurs extrêmes. Quand les moyennes présentent des ordres de grandeur différents, il convient d'utiliser préférentiellement le CV plutôt que l'écart-type.

#### 2.2.2.2.1.1 Répétabilité

##### Définition :

La répétabilité est le premier critère de performance à vérifier avant toute mise en route d'une nouvelle méthode. Son évaluation consiste à analyser dans un délai le plus court possible le même échantillon dans des conditions strictement identiques : même opérateur, même lot de réactif, même instrument, même étalonnage... « L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour le paramètre concerné. »(17). Les données acquises à l'installation pourront être ultérieurement utilisées pour mettre en évidence un dysfonctionnement au cours du temps.

##### Méthode :

La répétabilité, comme les autres critères de performances ont été déterminé sur chacun des trois modules de la chaîne analytique. Chaque module dispose d'un mode manuel et d'un mode automatique. Contrairement à l'automate XE, dans le XN ces deux modes disposent de la même aiguille et du même circuit d'analyse et il n'est donc pas nécessaire d'établir les critères de performance pour chacun d'eux.

Pour établir la répétabilité il est recommandé d'utiliser au moins deux niveaux de concentration dont au moins un si possible proche des seuils décisionnels. Pour une interprétation statistique optimale le nombre de déterminations idéal par niveau est de 30. Il a été décidé d'évaluer la répétabilité à partir des 3 niveaux des contrôles de qualité interne passés 30 fois dans la même série, par le même opérateur et avec les mêmes lots de réactifs. Les valeurs moyennes des différents niveaux de CQI pour l'ensemble des paramètres couvrent bien le domaine d'analyse. Pour chaque niveau et chaque paramètre on détermine la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation de répétabilité. Une répétabilité sur un échantillon patient « normal » a également été réalisée sur un des modules afin de s'assurer que les performances obtenues avec les CQI ne diffèrent pas de celles obtenues avec un échantillon patient.

## Résultats :

Paramètres	CV % fournisseur XN	CV % RICOS optimal	CV % RICOS souhaitable	CV % RICOS minimal	Niveau 1			Niveau 2			Niveau 3			Sang patient
					XN1	XN2	XN3	XN1	XN2	XN3	XN1	XN2	XN3	
GR	1,5 (si > 4 T/L)	0,60	1,20	1,80	0,77	0,73	0,75	0,63	0,59	0,56	0,54	0,54	0,87	0,80
IDR	2,00	0,66	1,35	1,97	0,49	0,44	0,57	0,48	0,42	0,54	0,54	0,48	0,62	0,53
Ht	1,50	0,51	1,01	1,52	0,82	0,92	0,76	0,64	0,75	0,59	0,57	0,52	1,06	0,86
Hb	1,00	0,53	1,07	1,60	0,86	0,63	0,82	0,51	0,42	0,59	0,44	0,47	0,53	0,50
Pq Impédance	4,0 (si>100G/L)	1,71	3,45	5,12	4,41	3,77	4,32	2,22	1,54	1,80	1,42	1,47	1,23	1,45
Pq PLT-F	2,5 (si>100G/L), 5 (si>20G/L)	1,71	3,45	5,12		2,36	2,38		1,20	1,23		0,74	0,82	1,00
GB	3,0 (si >4 G/L)	2,14	4,30	6,41	1,93	1,63	1,64	1,84	1,14	1,15	0,97	0,78	0,83	1,50
Ly	8,0 (si > 0,6G/L)	1,91	3,83	5,74	4,15	4,15	3,25	2,82	3,57	3,58	4,11	2,59	4,69	3,07
PN	8,0 (si > 1,2G/L)	3,21	6,41	9,62	2,57	3,08	2,63	3,54	2,91	2,56	1,33	1,93	2,45	2,00
Mono	20,0 (si>0,2 G/L)	3,34	6,68	10,01	7,88	6,72	7,07	5,47	5,86	7,33	6,26	3,97	8,09	6,51
PE	25,00	3,94	7,88	11,81	7,70	7,65	6,51	8,57	8,82	10,00	3,46	5,76	9,55	13,86
PB	40,00	5,25	10,50	15,75	3,51	3,49	2,32	3,23	2,61	2,90	2,42	2,02	2,32	20,76
Ret	15,00	2,06	4,13	6,19		2,52	2,24		2,48	2,94		4,05	4,46	3,53
EB	25,0 (pour GB>4 g/L)				9,28	8,95	9,28	5,07	5,58	5,85	3,11	2,71	3,47	NR
IG	25,0 (pour GB>4 g/L)				2,89	3,35	3,09	3,51	3,15	3,63	2,89	3,19	3,57	NR
plaquetocrite	6,00	2,23	4,50	6,69				3,20	2,05	2,92	1,60	1,75	1,63	1,45

**Tableau 12 : Tableau de synthèse des résultats de la reproductibilité pour les trois automates XN**

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

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

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

**Tableau 13 : Moyenne des PNE et PNB du sang frais**

## 2.2.2.2.1.2 Reproductibilité

### Définition :

La reproductibilité, encore appelée fidélité intermédiaire, consiste à effectuer plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon mais en faisant varier les conditions opératoires comme les opérateurs ou les lots de réactifs pendant un intervalle de temps donné. L'objectif est de connaître la variabilité analytique de la méthode. Si les résultats d'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité sont proches, cela constitue une manifestation de la robustesse de la méthode.

### Méthode :

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

### Résultats :

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

Tableau 14 : Tableau de synthèse des résultats de la fidélité intermédiaire pour les trois automates XN

On peut conclure que, dans l'ensemble, les données de reproductibilité obtenues pour les paramètres de l'hémogramme sont conformes aux limites acceptables. Il faut cependant noter l'exception des CV élevés obtenus pour le niveau 1 des plaquettes en impédance (PLT-I). La moyenne du CQI niveau 1 pour les PLT-I est de 39 G/L, or le CV fournisseur est indiqué comme étant valable uniquement pour des plaquettes >100 G/L. Le coefficient de variation obtenu est néanmoins très proche de la limite supérieure acceptable Ricos, qui a été établie pour une population "normale". Une variation de 7 % sur le niveau bas est jugée sans impact clinique. La reproductibilité est donc considérée validée.

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

#### 2.2.2.2.2 Justesse /exactitude

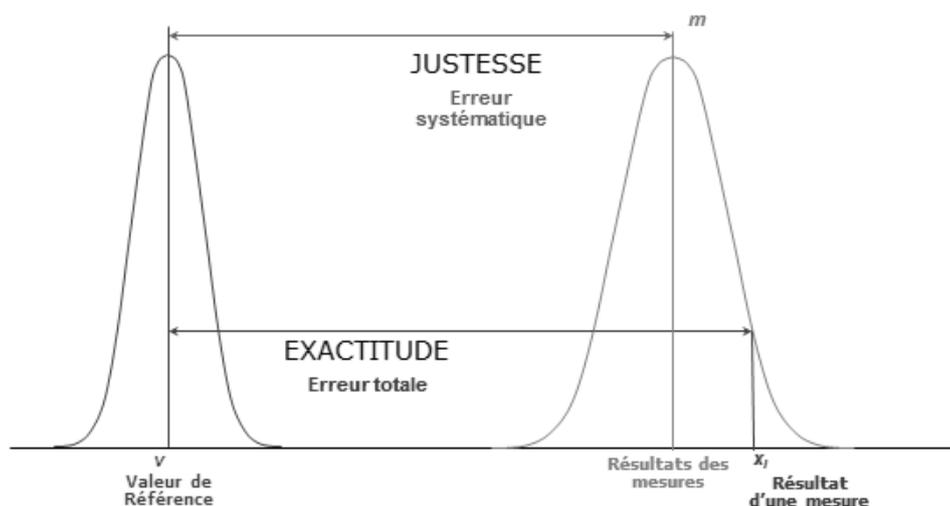


Figure 15 : Représentation schématique de l'exactitude et de la justesse

##### 2.2.2.2.2.1 Justesse

###### Définition :

La justesse correspond à la qualité de l'accord entre la moyenne «  $m$  » d'une série de mesures et la valeur vraie «  $v$  ». L'objectif est d'évaluer l'erreur systématique encore appelé biais. L'obtention d'une valeur vraie nécessite l'utilisation d'un matériau de référence certifié ce qui n'est pas possible en hématologie. Lorsque l'on ne dispose pas de matériaux de référence, le biais est alors déterminé par rapport à une « valeur cible ».

Méthode : la justesse est déterminée grâce au CQI externalisé.

L'erreur systématique est égale au biais exprimé en % calculé par la formule :  $\frac{(m-v) \times 100}{v}$

La justesse n'a pas été déterminée ici, car les CQI externalisés n' étaient pas encore mis en place.

#### 2.2.2.2.2 Exactitude

Définition :

L'exactitude correspond à la qualité de l'accord entre la valeur observée « x » et la valeur vraie « v ». Elle permet de déterminer l'erreur totale (inexactitude), combinaison de l'erreur systématique et de l'erreur aléatoire.

Méthode :

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

L'erreur totale correspond à l'inexactitude en % calculée par la formule :  $\frac{(x-v) \times 100}{v}$

L'inexactitude peut également être exprimée par le calcul du « z-score ». Cette expression en nombre d'écart-type indique l'écart entre le résultat du laboratoire et la moyenne du groupe de comparaison. (17)

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

- $z \leq 2.0$  : indique des performances « satisfaisantes »
- $2.0 < z < 3.0$  : indique des performances « discutables »
- $z \geq 3.0$  : indique des performances « insatisfaisantes ».

Résultats:

L'inexactitude a été déterminée grâce aux résultats des EEQ ProBioQual (PBQ). Les limites acceptables retenues sont celles utilisées par ProBioQual. Elles sont basées soit sur les données Ricos et *al* en prenant l'erreur totale (TE%), soit sur l'expérience acquise dans le

domaine de l'évaluation externe de la qualité c'est-à-dire sur l'état de l'art (valeur généralement plus restrictive que le TE% de Ricos).

On s'assurera également que le z-score calculé est bien inférieur à 2.0.

Pour chacun des paramètres de l'hémogramme, l'exactitude a été déterminée pour au minimum 4 échantillons provenant d'EEQ de concentrations différentes.

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

**Tableau 15 :Exemple1 : tableau de synthèse des résultats de l'exactitude pour les leucocytes sur le XN3.**

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

**Tableau 16 : Exemple2 : tableau de synthèse des résultats de l'exactitude pour les plaquettes en impédance sur le XN3.**

L'exactitude retenue est celle déterminée par comparaison avec le groupe de pairs et non celle par comparaison avec toutes techniques car il n'existe pas de seuil de décision standardisé pour les paramètres concernés (17). Sur les 3 modules, pour l'ensemble des paramètres de la numération, l'exactitude est conforme aux spécifications attendues pour le groupe de pairs.

### 2.2.2.2.3 Limite de quantification

#### Définition :

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

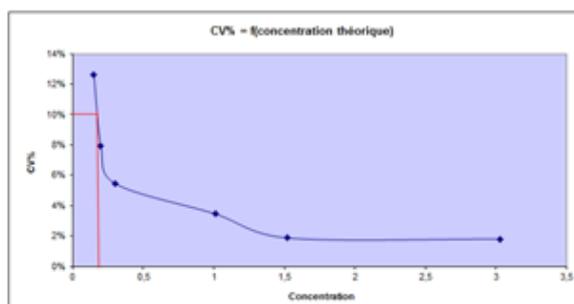
#### Méthode :

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

#### Résultat : exemple pour les leucocytes :

Dilution à partir du CQI niveau 1 sur le XN 3

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



Dans cet exemple, la dernière dilution effectuée à partir du CQI qui permet d'obtenir un CV inférieur à dix, est la dilution au 1/15. Celle-ci correspond à une concentration proche de 0,2 G/L. On a donc ensuite vérifié ce seuil sur l'ensemble des automates en utilisant des patients en aplasie qui avait un taux de globules blancs proche de 0,2 G/L.

### Vérification à partir échantillons patients

Échantillon patient	XN3		XN2		XN1		
	140570508	140640514	140570508	140640514	140570508	140640514	140640529
N°	GB						
10	0,24	0,17	0,21	0,19	0,22	0,19	0,08
9	0,24	0,22	0,2	0,18	0,23	0,18	0,08
8	0,24	0,19	0,21	0,2	0,24	0,17	0,07
7	0,24	0,22	0,19	0,2	0,24	0,18	0,08
6	0,25	0,21	0,2	0,17	0,26	0,16	0,1
5	0,27	0,23	0,18	0,17	0,24	0,18	0,08
4	0,29	0,21	0,21	0,19	0,21	0,18	0,07
3	0,25	0,23	0,19	0,19	0,21	0,17	0,06
2	0,25	0,23	0,19	0,19	0,21	0,18	0,07
1	0,22	0,21	0,19	0,17	0,23	0,17	0,07
moyenne	0,25	0,21	0,20	0,19	0,23	0,18	0,08
ecart type	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
CV	7,28	8,65	5,10	6,04	6,89	4,55	13,42

**Tableau 17 : exemple pour les leucocytes**

Le tableau ci-dessus montre bien que ce seuil de 0.2 G/L est validé pour les trois automates avec des sangs de patients. On a tenté de diminuer ce seuil en testant un patient avec un taux de GB proche de 0.1 G/L mais celui-ci a donné un CV autour de 13% (cf. résultat du XN1). La limite de quantification des leucocytes a donc été fixée à 0.20 G/L.

Les limites de quantification retenues pour les paramètres testés sur les automates XN sont :

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

**Tableau 18 : Limites de quantification retenues pour les paramètres testés sur les automates XN**

Une des règles « rerun » gérées par l'automate est le repassage des plaquettes lorsque la première valeur est inférieure à 20 G/L dans le mode fluo. La détermination de la limite de quantification des plaquettes en apporte une justification. En effet, ce mode de comptage possède une limite de quantification plus basse que le mode impédance ce qui traduit une plus grande précision pour ces concentrations.

#### 2.2.2.2.4 Contamination inter-échantillons

##### Définition :

La contamination est un « phénomène qui résulte du transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre tel qu'il produit une modification dont l'effet peut être évalué et quantifié »(24). Il est intéressant de vérifier l'existence d'une contamination en particulier pour les paramètres pour lesquels il existe un différentiel de concentration important en

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

Méthode :

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

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

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

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

B1m = moyenne des B1

B3m = moyenne des B3

Hm = moyenne des H

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

Résultat :

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

**Tableau 19 : Tableau de synthèse des résultats des tests de contamination effectués**

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

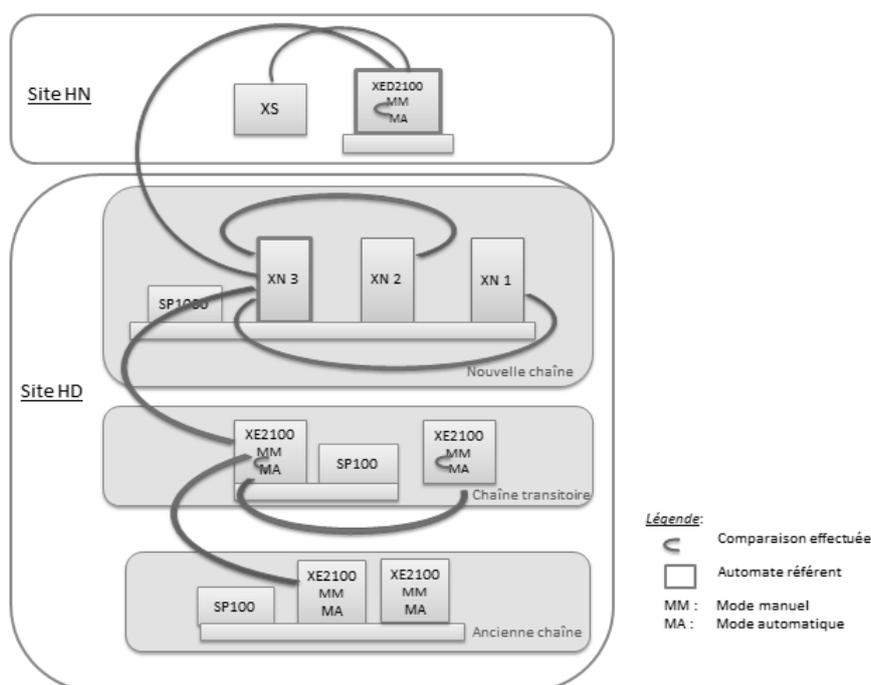
2.2.2.2.5 Comparaison de méthode

Définition :

La comparaison de méthode permet de vérifier la corrélation entre deux méthodes ou deux équipements qui mesurent les mêmes paramètres, que ce soit lors d'un changement d'automate ou entre des automates en miroir ou en back-up. Elle est réalisée après vérification des autres critères de performance (répétabilité, fidélité intermédiaire...).

Sa réalisation est obligatoire si l'on souhaite utiliser les antécédents des patients dans leur suivi. En cas de discordance entre deux méthodes ou deux automates, il conviendra d'en évaluer les causes et d'en informer les prescripteurs et les patients.

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



**Figure 16 : Comparaisons de méthodes effectuées**

**Méthode :**

Pour vérifier la comparabilité entre deux automates, différents échantillons sont analysés successivement sur les deux instruments dans un délai le plus court possible afin de limiter une éventuelle dérive pouvant être due à une instabilité de l'échantillon. Le choix des échantillons est important et il faut tester un effectif de taille significative. Nous avons choisi d'en sélectionner 40 selon les recommandations de la SFBC(24). Ces échantillons ont été sélectionnés afin de couvrir au mieux la gamme de mesure des valeurs rencontrées en physiopathologie. Dans ce but nous avons réalisé un tableau d'aide pour sélectionner au mieux les échantillons de patients :

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

**Tableau 20: Tableau d'aide à la sélection des échantillons pour les comparaisons de méthode**

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

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

Exemple :

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

**Tableau 21 : Résultats de la comparaison entre l'automate XN3 et l'automate XN2**

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

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

Exemple :

Nombre d'essais	Intervalle de comparaison	Equation droite de regression	r <sup>2</sup>	Nombre de déviants
40	2 – 860 G/L	$y = 0.9196x + 6.9223$	0.995	0

**Tableau 22 : Résultats de la comparaison PLT-I/PLT-F sur le XN3**

La comparaison entre les plaquettes impédance et fluo est jugée conforme.

Cette vérification de méthode a permis de mieux appréhender ce nouveau mode de comptage des plaquettes. Il montre surtout son intérêt dans les valeurs basses avec des résultats plus justes et plus précis (CV réduit et limite de quantification plus basse que le

mode impédance). Il a également une grande utilité lors d'anomalies sur la courbe des plaquettes en impédance dues par exemple à la présence de fragment de GR (ex grands brûlés). Ce mode de comptage présente alors des performances similaires à la CMF (utilisation du CD61)(25) et permet ainsi de s'affranchir des méthodes de comptage en cellules de Malassez, fastidieuses et qui demandant une expérience importante de la part des observateurs. En dehors de ces cas, le mode de comptage des plaquettes en impédance montre des performances tout à fait satisfaisantes et il est à préférer au mode fluo beaucoup plus onéreux.

#### 2.2.2.2.6 Vérification des paramètres calculés

L'hémogramme comprend des paramètres mesurés qui font l'objet d'une vérification de méthode et des paramètres qui sont calculés à partir d'eux. On se doit de vérifier au moins une fois que les calculs sont correctement réalisés.

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

**Tableau 23 : Tableau de synthèse de la vérification des calculs des paramètres non mesurés**

Nous avons contacté le fournisseur pour comprendre les non conformités observées au niveau des érythroblastes et du VPM et on nous a assuré que les différences observées étaient dues aux « arrondis ». En effet les calculs ont été réalisés avec les chiffres affichés sur l'IPU à la fin de la mesure alors que l'algorithme interne du logiciel fait le calcul avec la donnée brute de chacun (plus de décimales).

### 2.2.2.2.7 Vérification de la bonne exécution des règles d'expertise.

Comme on l'a vu précédemment la nouveauté de cette chaîne analytique réside entre autres dans l'application automatique d'un certain nombre de règles d'expertise qui ont été paramétrées sur le middleware MPL. Ces règles ont été établies par les biologistes du service en s'appuyant entre autres sur les possibles anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire (26)(27)(28), et sur les recommandations des sociétés savantes : l'ISLH (International Society for Laboratory Hematology) (29) et le GFHC (Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire)(30). Elles constituent des aides à la vérification technique, et permettent une certaine standardisation dans la gestion des échantillons patients. Ces règles ne se substituent en aucun cas au technicien qui valide techniquement toutes les demandes. Elles s'appliquent à la réception par l'automate du résultat brut obtenu lors du 1<sup>er</sup> passage du tube. Elles permettent le repassage, l'ajout d'analyses induisant un repassage automatique, la suppression d'analyses, l'ajout de commentaires d'aide à la validation en regard des résultats sur MPL, la mise en alarme des résultats, la modification de certains résultats ou encore la création de lame. Par exemple si les plaquettes sont inférieures à 150 G/L sans antériorité il faut rajouter une formule et une lame notamment pour vérifier l'absence d'agrégats plaquettaires.

#### Règles d'expertises établies :

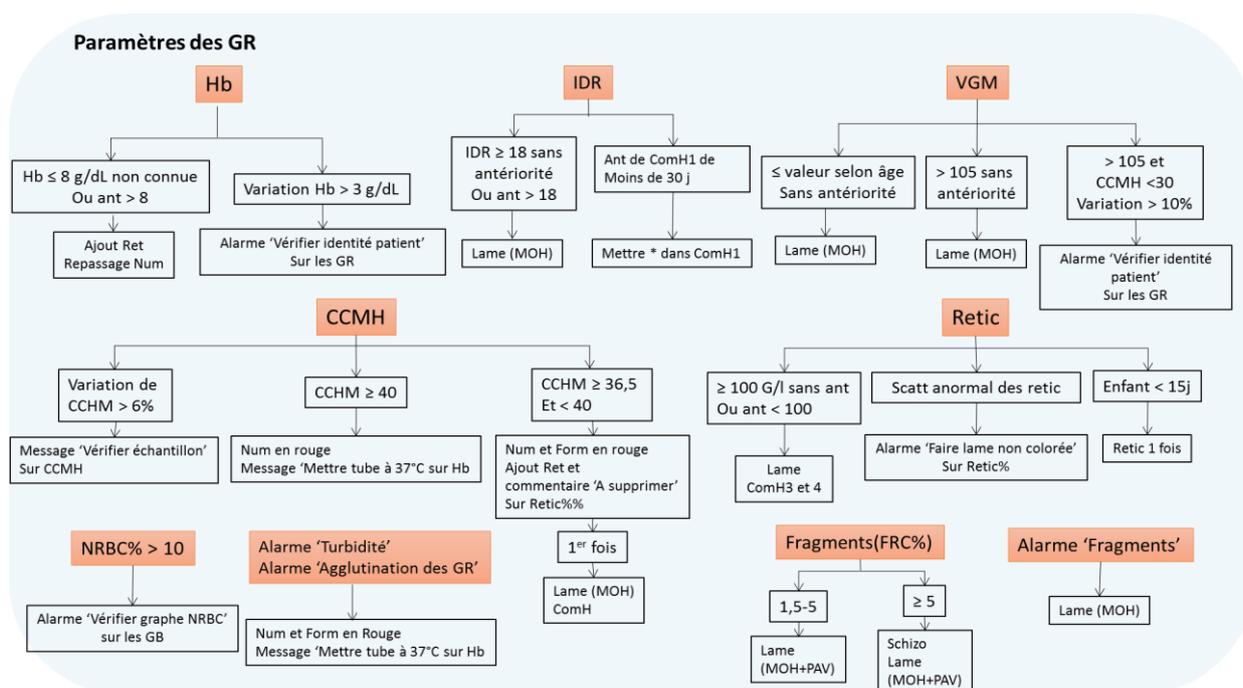


Figure 17 : Règles d'expertises établies : GR

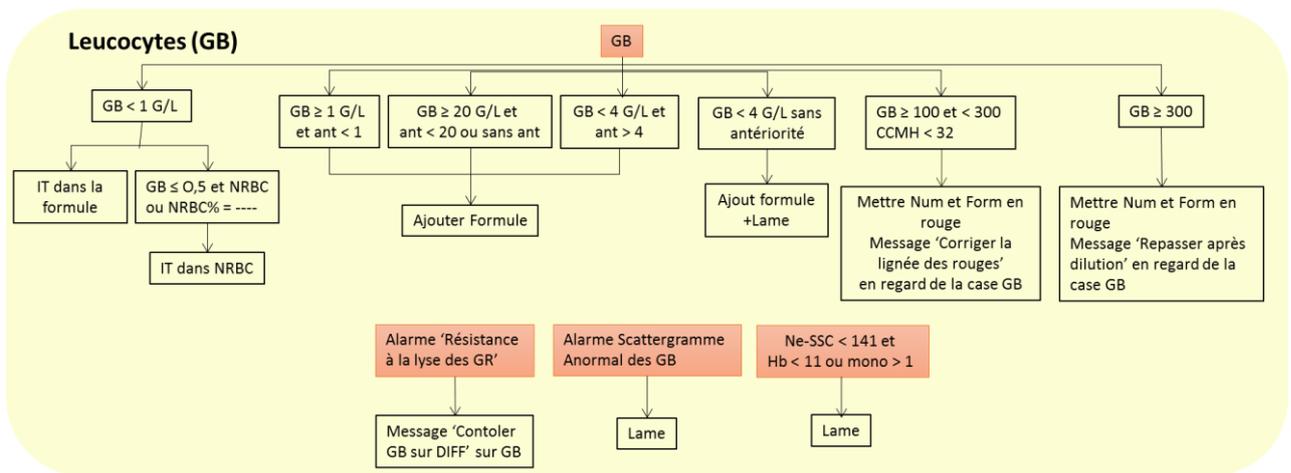


Figure 18 : Règles d'expertises établies : leucocytes GB

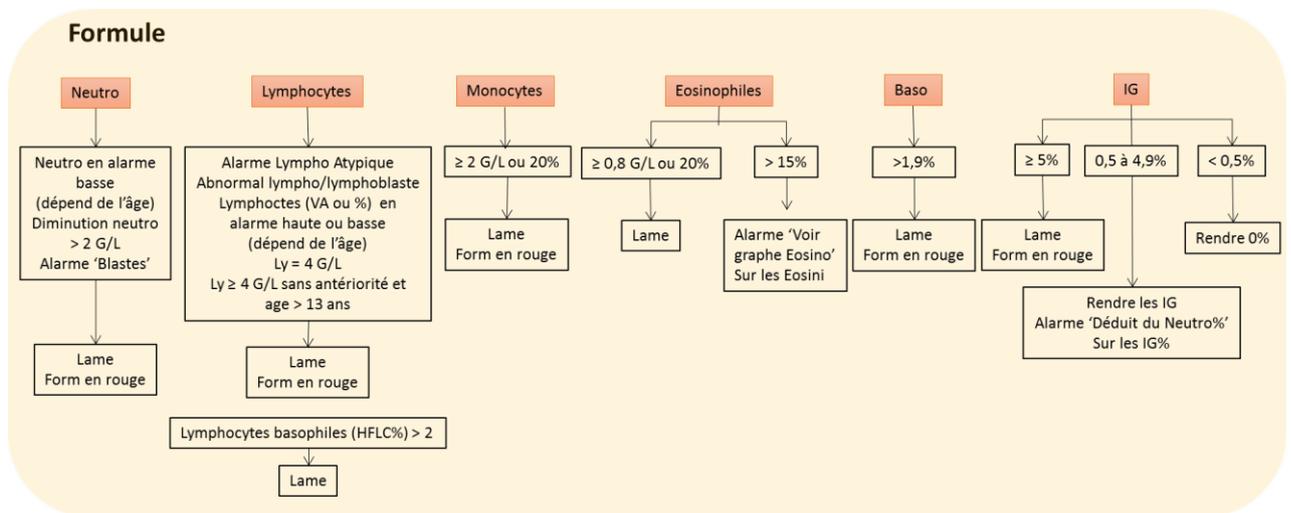


Figure 19 : Règles d'expertises établies : Formule

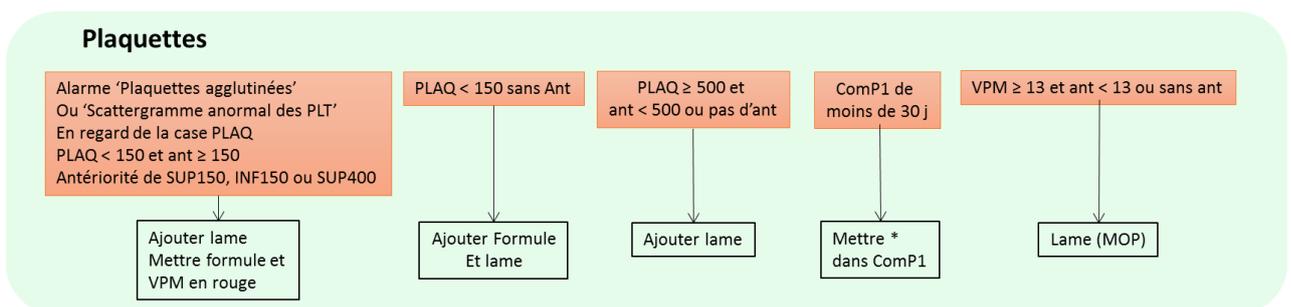


Figure 20 : Règles d'expertises établies : plaquettes

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

Une fois l'ensemble des règles paramétrées sur le middleware, une série de demandes test ont été créées afin de vérifier l'application correcte de ces dernières. Des copies d'écrans constituent la preuve de cette vérification. Ces tests ont eu lieu avant la mise en service de la chaîne. Des tests similaires ont lieu à chaque changement intervenant sur le système informatique, comme le passage à une nouvelle version du logiciel. Un tableau Excel a été élaboré reprenant l'ensemble des règles d'expertise avec les liens renvoyant aux copies d'écran justifiant ainsi leur vérification. Dans ce tableau les règles sont classées en fonction du paramètre déclenchant et l'on retrouve également comme information le numéro de la règle, ses conditions d'applications, les références justificative, le numéro de dossier renvoyant à un lien (copie écran), la date du test et enfin la conclusion de la validité de la vérification.

Au moment du passage en routine, une période probatoire a été réalisée pendant laquelle une vérification technique en double a été mise en place avec un technicien et une personne ayant participé aux vérifications de méthode et notamment des règles d'expertises. Le but était de maintenir une expertise de chaque demande d'examen pendant le temps nécessaire permettant de s'assurer que le système était parfaitement opérationnel.

Il est à noter qu'il existe aussi un certain nombre de règles d'expertise exécutées à l'enregistrement de la demande d'examen et donc paramétrées sur le SIL. Un exemple en est l'ajout d'une formule leucocytaire pour tous les nouveaux patients.

#### 2.2.2.2.8 Rapport de validation de méthode

Comme on l'a vu, la vérification expérimentale sur site a pour but de démontrer que la méthode (couple analyseur/réactif) fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire et qu'elle donne des résultats sûrs pour les patients. Le dossier de validation/vérification de méthode est l'un des documents les plus importants car il conditionne la recevabilité en cas d'audit initial.

Un rapport doit être réalisé pour chacun des paramètres mesurés par le LBM, c'est-à-dire pour chaque « mesurande ». Les résultats obtenus lors des vérifications bibliographique et expérimentale sont comparés aux limites acceptables définies préalablement par le service. Si tous les résultats obtenus sont conformes aux critères d'acceptabilité définis, la méthode est vérifiée/validée. En cas d'anomalie, le biologiste doit en rechercher les raisons et prendre les mesures nécessaires.

Chaque dossier de validation de méthode doit se conclure par une déclaration d'aptitude de la méthode. Il est signé par le biologiste responsable de la validation qui s'engage sur la mise en service de la méthode au sein du laboratoire.

A noter qu'il faut prendre soin de garder les traces provenant des automates pour tous les résultats des tests réalisés, ainsi que les dates, les numéros de lot des réactifs et des CQI qui ont été utilisés pour la validation/vérification des méthodes. Les opérateurs doivent être également identifiés.

La cellule qualité du CHU de Nantes a créé un rapport type de validation/vérification des méthodes quantitatives (réf : 7180-IM-055) en format Excel inspiré du SH FORM 43 (fiche type pour la vérification/validation de méthode quantitative) qui a été utilisé pour l'ensemble des paramètres de la numération-formule. Une fois le rapport terminé, le fichier est converti en format PDF et archivé dans un emplacement prédéfini par la cellule qualité avec l'ensemble des rapports de validation de méthode du LBM.

Un exemple de rapport de validation des leucocytes se trouve en **annexe III**.

### 2.2.3 L'examen du frottis sanguin

#### 2.2.3.1 Critères de revue microscopique du frottis sanguin

Même si aujourd'hui le classement définitif de nombreuses hémopathies ne repose plus exclusivement sur l'analyse morphologique, celle-ci reste indispensable pour orienter le choix des examens complémentaires spécialisés à réaliser pour une meilleure prise en charge du patient. Pour ne pas passer à côté d'une de ces situations pathologiques, il est absolument indispensable d'examiner systématiquement au microscope l'ensemble des cellules sanguines (GR, GB et plaquettes) à partir du moment où il existe une anomalie quantitative ou une alarme sur la numération formule sanguine rendue par les automates.

Un certain nombre de règles d'expertise conduisant à la revue microscopique du frottis sanguin ont été créés en se basant sur les recommandations des sociétés savantes et de l'expérience acquise (cf. règles d'expertise précédemment décrites).

Une lame peut être réalisée pour vérifier l'absence d'agrégats plaquettaires, pour effectuer un contrôle de la formule au microscope ou encore pour évaluer la morphologie des hématies ou des plaquettes. Certaines de ces règles d'expertise, décrites précédemment,

sont basées sur des critères quantitatifs et qualitatifs et s'appliquent dès la réception par l'automate du résultat brut obtenu lors du 1<sup>er</sup> passage du tube. D'autres règles d'expertise s'appliquent directement lors de l'enregistrement de la demande en fonction des analyses prescrites.

Analyse saisie sur DxLAB	Test déclenchant sur MPL	Test généré sur DxLAB	Intérêt
COMH	ComH2	<b>LAME</b>	Générer une lame pour évaluer la morphologie des hématies quand celle-ci est demandée par le service
MOL	ComOL2	RForm, <b>LAME</b>	Générer une formule et une lame pour évaluer la morphologie des leucocytes quand celle-ci est demandée par le service
MOP	ComP2	<b>LAME</b>	Générer une lame pour évaluer la morphologie des plaquettes quand demandé par le service
N ou H	Age < 15 j	RET, PLTF, <b>LAME 1</b> fois	Générer des réticulocytes, des plaquettes fluo et un contrôle sur lame une fois pour les enfants de moins de 15 j
N	Entrant sans antériorité ou antériorité > 180 j	RForm	Ajout d'une formule aux entrants non connus
RLGL	LGL%	RForm, <b>LAME</b>	Générer une lame et une formule si une recherche de LGL est demandée par le service
NBL	NBL	Blaste, NBL2, RForm, <b>LAME</b>	Générer une lame, une formule et les tests nécessaires pour la numération de blastes si une numération de blastes est spécifiquement demandée par le service
PLA	Plasmo	PLA, RForm, <b>LAME</b>	Générer une lame, une formule et le test PLA si une recherche de plasmocytes est demandée par le service
SCHIZO	SCHIZO	<b>LAME</b>	Générer une lame si recherche de schizocytes si demandée par le service
PONCT	PONCT	<b>LAME</b>	Générer une lame si recherche d'hématies ponctuées demandée par le service
SEZ	SEZ	RForm, <b>LAME</b>	Générer une lame et une formule si une recherche de cellules de Sézary est demandée par le service
SPH	SPH	<b>LAME</b>	Générer une lame si une recherche de sphérocytes est demandée par le service
TRICHO	Tricho	RForm, <b>LAME</b>	Générer une lame si une recherche de tricholeucocytes est demandée par le service

**Tableau 24 : Règles d'expertise lors de l'enregistrement des demandes**

Du fait de la liaison bidirectionnelle entre DxLAB et MPL, tout test généré sur MPL dans lequel est saisi le résultat est ensuite validé et automatiquement créé sur DxLAB (sous réserve que le lien informatique existe pour ce test). Ces tests générés ont tous été testés. L'ensemble de ces critères de revue du frottis sanguin doit être colligé dans un document en mentionnant la référence bibliographique qui s'y rattache.

## 2.2.3.2 Méthodologie

### 2.2.3.2.1 Description de la méthode

D'après le document COFRAC « portées-types d'accréditation » (SH INF 50) l'identification morphologique par microscopie optique fait partie de l'analyse « hémogramme ».

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

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

Tableau 25 : Extrait du SH INF 50(23) « portées- types d'accréditation »

Comme on l'a vu pour l'hémogramme automatisé, la première partie du dossier de vérification/validation est consacrée à la description de la méthode. Elle est synthétisée dans ce tableau :

Analyte/Mesurande :	Cellules sanguines circulantes - Normales : Polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, lymphocytes, monocytes. - Anormales : immatures, réactionnelles, tumorales
Principe de la Mesure :	Identification morphologique et numération par microscopie optique (100 cellules observées au minimum, permettant, d'obtenir un pourcentage pour chaque population cellulaire) d'un frottis de sang après coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG)
Méthode de mesure :	Comptage du nombre de cellules d'un type défini sur cent leucocytes.
Type d'échantillon primaire	Sang total
Type de récipient (Additif)	EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	Agitation des tubes par retournement, réalisation du frottis puis coloration.

Unités :	Pourcentage
Intervalles de référence :	Les intervalles de référence de la formule manuelle correspondent aux mêmes intervalles que la formule automatique : Document: 9240 - DI - 136 "Intervalles de référence de la numération globulaire et plaquettaire en fonction de l'âge"
Instruments	SP10 sur chaîne XN-9000 de SYSMEX (n° de série: SN11574); Colorateurs manuels (HD et HN) Microscopes
Réactifs utilisés	May-Grünwald (OXOID BIOLYON REF : FRG765) Giemsa (OXOID BIOLYON REF : FR09265) Eau tamponnée préparée extemporanément (cf. 9240-MO-150), Eau osmosée, huile à immersion (MERCK, REF : HX42100999)
Matériaux d'étalonnage	NA
Contrôle de qualité externe (codage si existe) :	Programme ABP en hématocytologie (Association de Biologie Praticienne)

**Tableau 26 : Description de la méthode de la formule sanguine manuelle**

#### 2.2.3.2.2 Maîtrise des risques

Comme pour l'hémogramme automatisé, une analyse de risque du processus de mesure est indispensable. Elle vise à établir la liste des paramètres susceptibles d'influencer le résultat de l'analyse et d'envisager des moyens de maîtrise. Cette étape est particulièrement importante pour les méthodes qualitatives, seul moyen d'évaluer l'incertitude de mesure. La numération leucocytaire établie par lecture du frottis sanguin est une analyse utilisée dès le début du XX<sup>e</sup> siècle, qui présente une imprécision analytique inhérente à la méthode utilisée. On distingue classiquement trois types d'erreurs pouvant influencer le résultat d'une formule manuelle : l'erreur d'échantillonnage, l'erreur mécanique et l'erreur d'interprétation (31).

**L'erreur d'échantillonnage** est sans doute la plus importante, il s'agit d'une erreur minimale statistique inhérente à la méthode correspondant à l'erreur due au hasard. Elle dépend à la fois de la proportion du type leucocytaire présent dans l'échantillon à analyser et du nombre de cellules comptées. La table de Rümke (32) montre ainsi les variations des valeurs relatives d'une population leucocytaire selon le nombre de cellules comptées.

%	100	200	500	1.000	10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 4.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38.0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0

Tableau 27 : Table de Rümke (33)

L'erreur mécanique conduit à une distribution hétérogène des différents types cellulaires dans l'étalement sanguin. Les cellules les plus volumineuses comme les monocytes prédominent sur les extrémités du frottis alors que les plus petites cellules comme les lymphocytes se retrouvent plus nombreuses au centre du frottis. Cette hétérogénéité est due à de nombreux facteurs. L'étalement du frottis sanguin, en particulier, dépend de la qualité du sang mais aussi de la manière d'effectuer le frottis. Le choix de la zone de lecture ou de la méthode de séchage a également toute son importance.

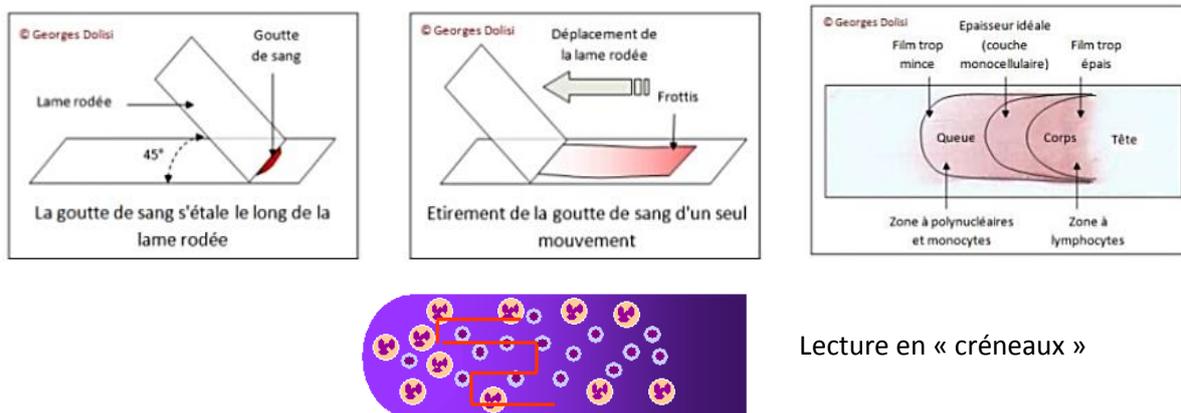


Figure 21: Réalisation d'un frottis sanguin et choix de la zone de lecture (38)

Pour limiter ces erreurs le laboratoire dispose d'un étaleur-colorateur (SP-10 de Sysmex®) qui permet d'obtenir des frottis uniformes adaptés à un examen microscopique. L'étaleur utilise, en fonction de la valeur de l'hématocrite, un profil d'étalement spécifique défini dans son paramétrage (34). Le laboratoire a également rédigé un mode opératoire, « réalisation

d'un frottis sanguin » (9240-MO-156) suivi lorsque l'utilisation du SP-10 est impossible (tube pédiatrique, panne...) afin d'uniformiser au mieux sa réalisation.

Enfin l'**erreur d'interprétation** de la morphologie cellulaire a deux principales causes : la qualité de la coloration et l'erreur humaine de l'observateur. Cette dernière ne peut être contrôlée que par la formation et le maintien des compétences du personnel (cf. chapitre dédié).

L'analyse de risque, est présente dans le dossier de validation de méthode, elle est présentée ici suivant la méthode des 5 M (Main-d'œuvre, Milieu, Matériel, Méthode, Matière).

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<b>Matériel</b>		
Etaleur-colorateur (SP10)	Absence de maintenance	- Suivi des maintenances dans le middleware (9240-PR-024 : utilisation MPL au laboratoire d'hématologie) - Mode opératoire de réalisation des maintenances (9240-MO-242)
	Panne	Solution de back-up avec petit automate de coloration + étalement manuel des lames
Microscopes	Absence d'entretien	- Formation du personnel - Entretien annuel des microscopes par une société externe.
<b>Matière</b>		
Eau tamponnée pour la coloration des frottis sanguins	Préparation	Mode opératoire de préparation de l'eau tamponnée (9240-MO-253)
	Traçabilité	- Formulaire de préparation de l'eau tamponnée (9240-IM-135, 9240-IM-137)
	Stabilité	- Tracer la date de fabrication sur les flacons - Tester la stabilité de l'eau tamponnée sur une durée définie par mesure du PH
Colorant	Traçabilité	- Suivi des lots de colorant par le SP-10 - Pour petit colorateur : formulaire de traçabilité de changement colorant.
	Qualité coloration	- Formation du personnel.
<b>Milieu</b>		
Conditions environnementale	Température	- Etaleur-colorateur dans une pièce climatisée avec suivi de la température - vérification des conditions de stockage des colorants
<b>Main-d'œuvre</b>		
Personnel	Réalisation d'un frottis sanguin	Mode-opératoire : 9240-MO-156
	Utilisation du SP10 ou autre colorateur	- Formation / habilitation du personnel : 9240-IM-121 - Mode-opératoire : 9240-MO-150 (coloration au MGG sur colorateur ACL), 9240-PR-029 (fonctionnement général de la chaîne XN),

Personnel	Lecture des frottis sanguins	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formation/habilitation : 9240-IM-124 (habilitation à la lecture de lame)</li> <li>- Maintien des compétences : confrontation interne (9240-IM-131), lecture lame microscope multi-têtes avec un biologiste, formation interne/externe</li> <li>- Mode-opérateur :</li> <li>9240-MO-162 : vérification formule sur lame</li> <li>9240-MO-160 : morphologie des hématies</li> <li>9240-MO-161 : morphologie des leucocytes</li> <li>9240-MO-159 : morphologie des plaquettes</li> <li>9240-MO-157 : recherche d'agrégats plaquettaires</li> <li>-Harmonisation des commentaires : catalogue de commentaires codés.</li> </ul>
-----------	------------------------------	--

**Tableau 28 : Maîtrise des risques du processus analytique de la formule manuelle**

De plus, il est indispensable que le laboratoire détermine dans une procédure ou un mode-opérateur une conduite à tenir lors de la vérification d'une formule au microscope. Au laboratoire celle-ci est décrite dans le mode-opérateur « vérification d'une formule sur lame » (9240-MO-162). Il est mentionné qu'avant de commencer le décompte, il faut toujours vérifier que le numéro de la lame correspond bien au numéro de demande sur MPL. Il convient également d'observer les résultats de l'automate du jour (chiffres + courbes et scopes) et d'observer les antériorités sur l'écran de MPL. Pour réaliser la formule manuelle on dispose d'un compteur via le clavier relié directement au middleware ce qui permet d'éviter les saisies manuelles (qui nécessiteraient une double saisie). La formule est réalisée sur 100 ou 200 cellules en effectuant des créneaux sur la lame afin d'observer une zone aussi grande que possible. La conduite à tenir est de donner la priorité au résultat de l'automate s'il n'y a pas de cellules anormales et si les scopes de l'automate sont nets. Dans ce cas, un commentaire codé est saisi afin de le préciser sur le compte rendu. Pour une traçabilité optimale le résultat de la formule manuelle est noté sur la feuille de l'automate, ainsi que les initiales de la personne ayant contrôlé la formule. Si une discordance importante entre le compte manuel et l'automate est observé sans explication satisfaisante, un second technicien peut être amené à lire le frottis et en dernier recours un biologiste peut être sollicité.

Les critères de relecture des lames par un biologiste doivent être explicités dans un mode-opérateur et bien connu du personnel. Au laboratoire, cela concerne les lames avec recherche et/ou présence de cellules anormales de type blastique chez un patient non connu, de cellules de Sezary, de tricholeucocytes, de promonocytes, de LGL. Sont également

concernées toutes les demandes de analyse de la morphologie des leucocytes (MOL) par les services, les lymphocytoses > 4 G/L non connues, les myélémies >10% non connues et toutes autres anomalies morphologiques sur les globules rouges, plaquettes ou leucocytes inhabituelles.

#### 2.2.3.2.3 Définir les critères de performance à vérifier

Pour déterminer quels sont les critères de performance à vérifier il convient de définir comme on l'a vu précédemment le type de flexibilité et le type de méthode (quantitative ou qualitative). La réalisation de la formule sanguine au microscope consiste à identifier et compter les sous-populations leucocytaires normales et anormales. Il s'agit d'une méthode à la fois qualitative (identification) et quantitative (numération) de portée A.

Il a été décidé d'effectuer une validation de méthode plutôt quantitative pour les polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et monocytes avec une détermination de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse et une comparaison de méthode avec la formule automatisée. La détection de cellules anormales immatures, réactionnelles ou tumorales ainsi que les polynucléaires éosinophiles et basophiles, trop faiblement représentés à l'état normal et donc assimilés à des « événements rares » sont abordés sous l'angle qualitatif.

Pour une méthode qualitative le SH GTA 04 préconise :

<b>PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>Vérification sur site Portée de type A</b>	<b>Validation Portée de type B</b>
<i>Spécificité analytique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Sensibilité diagnostique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<b>Stabilité des réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<b>Robustesse</b>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Comparaison avec méthode de référence</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si existe)</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire<sup>11</sup></i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>

Tableau 29 : Extrait du SH-GTA-04 (19)

L'étude de la contamination n'a pas lieu d'être et la comparaison avec une autre technique n'est pas réalisable. La vérification de méthode est donc essentiellement basée sur l'analyse de risque, la maîtrise de la formation, l'habilitation du personnel et l'exploitation des résultats des confrontations internes cytomorphologiques ainsi que des résultats des EEQ, témoins du maintien des compétences du personnel.

#### 2.2.3.2.4 Choix des limites acceptables

Contrairement aux paramètres de l'hémogramme automatisé, à l'heure actuelle il n'existe pas pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire de limite d'acceptabilité admis par tous pour la formule sanguine manuelle.

Le LBM a fixé ses limites d'acceptabilité pour la répétabilité à partir d'une publication de Trimoreau et al qui part du principe que « plus un événement est d'occurrence faible, plus un CV élevé peut être accepté » (35), ainsi la limite d'acceptabilité de la répétabilité est établi à partir de cette formule :

$$y = 1/\sqrt{x} \times 100 \quad (36) \quad \text{Avec : } y = \text{CV limite \%}$$

x = valeur cible

La limite d'acceptabilité de la reproductibilité est fixée comme suit:

$$\text{CV\% reproductibilité} = \text{CV\% répétabilité} \times 1.33 \quad (20)$$

La table de Rümke(37) fait correspondre à la valeur vrai de leucocyte, l'intervalle tolérée de leucocytes observés au microscope en fonction du nombre total de cellule comptées. Elle permet donc de fixer les limites d'acceptabilité de la justesse.

% vrai	Cellules comptées										
	Limite basse	Limite haute									
0	0	3,6	26	17,6	35,4	51	41,7	62	76	68,6	88,1
1	0	5,3	27	18,5	36,5	52	42,8	63,1	77	69,7	89,1
2	0,3	7,1	28	19,4	37,6	53	43,8	64,1	78	70,8	90,2
3	0,7	8,6	29	20,3	38,6	54	44,8	65,2	79	72	91,2
4	1,1	10	30	21,2	39,7	55	45,9	66,2	80	73,1	92,3
5	1,6	11,4	31	22,1	40,8	56	46,9	67,3	81	74,2	93,3
6	2,2	12,6	32	23	41,9	57	48	68,3	82	75,3	94,3
7	2,8	13,9	33	24	42,9	58	49	69,4	83	76,5	95,4
8	3,4	15,1	34	24,9	44	59	50,1	70,4	84	77,6	96,4
9	4,1	16,3	35	25,9	45,1	60	51,2	71,5	85	78,7	97,4
10	4,7	17,5	36	26,8	46,1	61	52,2	72,5	86	79,9	98,5
11	5,4	18,7	37	27,8	47,2	62	53,3	73,5	87	81	99,5
12	6,1	19,8	38	28,7	48,3	63	54,4	74,6	88	82,2	100
13	6,9	21	39	29,7	49,3	64	55,5	75,6	89	83,3	100
14	7,6	22,1	40	30,7	50,4	65	56,5	76,7	90	84,5	100
15	8,4	23,2	41	31,7	51,5	66	57,6	77,7	91	85,6	100
16	9,2	24,4	42	32,6	52,5	67	58,7	78,8	92	86,8	100
17	10	25,5	43	33,6	53,6	68	59,8	79,8	93	87,9	100
18	10,8	26,6	44	34,6	54,6	69	60,9	80,8	94	89,1	100
19	11,6	27,7	45	35,6	55,7	70	62	81,9	95	90,2	100
20	12,4	28,8	46	36,6	56,8	71	63,1	82,9	96	91,4	100
21	13,2	29,9	47	37,7	57,8	72	64,2	84	97	92,6	100
22	14,1	31	48	38,7	58,9	73	65,3	85	98	93,7	100
23	14,9	32,1	49	39,7	59,9	74	66,4	86	99	94,9	100
24	15,8	33,2	50	40,7	61	75	67,5	87,1	100	96,1	100

**Tableau 30 : Pour 100 cellules comptées : Table de Rümke extrapolée (36)**

Actuellement les automates d'hématologie comptent en moyenne dix mille leucocytes par échantillon. Ce nombre beaucoup plus important permet d'augmenter très nettement la précision et la justesse de la mesure. Comme on l'a vu précédemment il faut rappeler que les valeurs données par la table de Rümke ne prennent pas en compte les possibles erreurs d'appréciation lors de la lecture de la formule.

### 2.2.3.3 Résultats

#### 2.2.3.3.1 Cellules normales (méthode quantitative).

Nous avons décidé d'étudier les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes.

### 2.2.3.3.1.1 Répétabilité :

#### Méthode :

Compte tenu des caractéristiques de la méthode, la répétabilité a été évaluée par deux méthodes différentes, sur deux niveaux et par 2 lecteurs différents. La formule a été réalisée sur 100 cellules comme c'est le cas en routine pour la grande majorité des demandes.

- Première méthode : le même opérateur lit dix frottis sanguins réalisés à partir d'un même échantillon de sang.
- Seconde méthode : parmi les dix frottis, un frottis est choisi au hasard et il est analysé dix fois par la même personne en prenant soin de retirer la lame du microscope entre chaque lecture .

#### Résultats :

	Niveau 1									
	10 frottis d'un même échantillon				10 lectures du même frottis				Valeur cible* %	CV limite %
	lecteur 1		lecteur 2		lecteur 1		lecteur 2			
	Moyenne %	CV (%)	Moyenne %	CV (%)	Moyenne %	CV (%)	Moyenne %	CV (%)		
PN	13.50	13,6	13.10	22,6	17.20	21,7	12.20	11,5	15.1	25,7
Ly	12.30	22,7	12.50	15,2	10.30	22,0	9.20	28,0	11.0	30,2
Mono	7.80	22,5	6.20	36,3	6.50	35,0	6.10	36,6	7.0	37,8

\*Valeur cible = valeur automate

	Niveau 2									
	10 frottis d'un même échantillon				10 lectures du même frottis				Valeur cible %	CV limite %
	lecteur 1		lecteur 2		lecteur 1		lecteur 2			
	Moyenne %	CV (%)	Moyenne %	CV (%)	Moyenne %	CV (%)	Moyenne %	CV (%)		
PN	75.30	6,7	78.70	5,6	76.90	6,0	77.20	6,4	79.0	11,3
Ly	75.90	3,7	78.30	4,1	72.70	4,8	77.90	3,5	74.8	11,6
Mono	19.20	14,9	17.40	19,8	17.10	<b>28,3</b>	17.50	15,1	20	22,4

Tableau 31: Tableau récapitulatif de l'évaluation de la répétabilité pour la formule manuelle

\*Valeur cible = valeur automate

Comme attendu, les CV sont d'autant plus réduits que la proportion de cellules à compter est importante. On ne distingue pas de différence significative entre les deux méthodes, ce qui tend à montrer une bonne répétabilité du SP10 dans la réalisation des frottis sanguins.

En ce qui concerne les monocytes : pour le niveau 2/ technicien 1, le CV obtenu est supérieur au CV limite. Cela peut être dû à une discordance entre l'automate et la mesure manuelle du fait d'une répartition plus hétérogène des monocytes sur la lame (grandes cellules) (38). En pratique, lors d'une trop grande discordance automate/lecture manuelle, un compte sur 200 cellules est réalisé. Si la différence persiste, un deuxième lecteur peut être sollicité. Le compte automate sera préféré si le scope est de bonne qualité.

#### 2.2.3.3.1.2 Fidélité intermédiaire :

##### Méthode :

L'évaluation de la fidélité intermédiaire a été réalisée grâce à l'exploitation de deux confrontations internes cytomorphologiques à partir des EEQ de l'association de biologie praticienne (ABP), en faisant donc varier le facteur « opérateur ». Le principe de ces confrontations internes est développé plus loin dans la partie maintien des compétences du personnel (p 96).

##### Résultats :

	Niveau A (ABP 2013 1/4) (opérateurs n=26)			Niveau B (ABP 2013 3/2) (opérateurs n=20)		
	Moyenne(%)	CV (%)	CV limite(%)	Moyenne(%)	CV (%)	CV limite(%)
PN	63.9	6.8	16.8	42.6	8.8	20.4
Ly	4.7	50.1	62	44.5	8.1	20.4
Mono	0.3	<b>171.1</b>	126.2	6.2	29.1	56.5

**Tableau 32 : Résultats de la répétabilité**

Pour les PN et lymphocytes les CV de fidélité intermédiaire des deux niveaux sont inférieurs à la limite d'acceptabilité fixée. En ce qui concerne les monocytes pour le niveau A, le CV est supérieur au CV limite fixé mais cette variabilité reste acceptable car les valeurs

mesurées minimums (0%) et maximum (2%) sont suffisamment proches de la valeur cible c'est-à-dire de la valeur moyenne du groupe de pairs égale à 1.11%.

### 2.2.3.3.1.3 Justesse/exactitude

#### 2.2.3.3.1.3.1 Justesse

##### Méthode :

Une approche de la justesse a été réalisée grâce à l'exploitation des confrontations cytomorphologiques internes (à partir des EEQ de ABP) que l'on peut apparenter à un CQI externalisé. On a ainsi comparé la moyenne des n observateurs de deux confrontations (correspondant à des niveaux différents) par rapport à la moyenne du groupe de pairs (valeur cible).

##### Résultats :

		Nombre de lecteurs au labo	Valeur Labo (%)	Moyenne (groupe de pairs)	Biais (%)	Fourchette acceptée (%)	Conclusion
PN	ABP 2013 1/4	23	63,90	62,7	1,5	54,4%-74,6%	Conforme
	ABP 2013 3/2	20	42,60	42,6	0	33,6%-53,6%	Conforme
Ly	ABP 2013 1/4	23	4,70	4,6	1,2	1,6-11,4	Conforme
	ABP 2013 3/2	20	44,50	42,5	4,6	32,6-52,5	Conforme
Mono	ABP 2013 1/4	26	0,30	1,11	74	0-5,3	Conforme
	ABP 2013 3/2	20	6,20	5,54	11,9	2,2-12,6	Conforme

**Tableau 33 : Justesse « moyenne » de l'ensemble du laboratoire**

La justesse est donc vérifiée sur site pour ces paramètres.

#### 2.2.3.3.1.3.2 Exactitude

##### Méthode :

L'exactitude évaluée est celle du biologiste référent. On utilise pour cela les résultats des contrôles externes où la valeur rendue par le biologiste responsable est comparée à la moyenne du groupe de pairs. L'exemple ci-dessous a été pris sur huit confrontations externes.

## Résultats :

Echantillons	Nombre (N)	Valeur Labo (%)	Cible (%) (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Fourchette (%) limite (selon Rümke)	Conclusion
EEQ 2013 1/1 PNN	1	95	93.78	1.30	89-100	Conforme
EEQ 2013 1/2 PNN	1	2	2.18	-8.26	0-7	Conforme
EEQ 2013 1/3 PNN	1	1	3.87	-74.16	1-10	Conforme
EEQ 2013 1/4 PNN	1	64	62.70	2.07	54-75	Conforme
EEQ 2013 2/1 PNN	1	76	78.05	-2.63	71-90	Conforme
EEQ 2013 2/2 PNN	1	6	6.63	-9.50	3-14	Conforme
EEQ 2013 2/3 PNN	1	64	67.87	-5.70	60-80	Conforme
EEQ 2013 2/4 PNN	1	66	64.30	2.64	55-76	Conforme
EEQ 2013 1/1 Ly	1	0	1.53	(-100.0)	0-7	Conforme
EEQ 2013 1/2 Ly	1	28	25.06	11.73	17-34	Conforme
EEQ 2013 1/3 Ly	1	96	60.12	59.68	51-71	Conforme
EEQ 2013 1/4 Ly	1	0	4.60	(-100.0)	1-11	Non Conforme
EEQ 2013 2/1 Ly	1	5	4.16	20.19	1-10	Conforme
EEQ 2013 2/2 Ly	1	8	8.88	-9.91	4-16	Conforme
EEQ 2013 2/3 Ly	1	28	24.05	16.42	16-33	Conforme
EEQ 2013 2/4 Ly	1	16	15.85	0.95	9-24	Conforme
EEQ 2013 1/1 Mono	1	3	2.64	13.64	0-9	Conforme
EEQ 2013 1/2 Mono	1	0	0.70	(-100.00)	0-5	Conforme
EEQ 2013 1/3 Mono	1	0	1.31	(-100.00)	0-5	Conforme
EEQ 2013 1/4 Mono	1	0	1.11	(-100.00)	0-5	Conforme
EEQ 2013 2/1 Mono	1	18	16.50	9.09	10-25	Conforme
EEQ 2013 2/2 Mono	1	1	0.82	21.95	0-5	Conforme
EEQ 2013 2/3 Mono	1	3	2.85	5.26	1-9	Conforme
EEQ 2013 2/4 Mono	1	9	9.83	-8.44	5-17	Conforme

**Tableau 34 : Tableau récapitulatif de l'évaluation de l'exactitude grâce aux EEQ**

Les inexactitudes moyennes sont conformes aux valeurs attendues pour les paramètres évalués PNN, Ly, Mo. On peut noter un seul résultat individuel non-conforme sur les lymphocytes sans signification clinique (le dossier portant sur une leucémie myéloïde chronique). L'exactitude est donc vérifiée sur site.

### 2.2.3.3.1.4 Corrélation automate/microscope

#### Méthode :

Pour la comparaison de méthode entre la formule automate (méthode de référence) versus la formule effectuée au microscope, le laboratoire a choisi d'exprimer les sous-populations leucocytaires en valeur absolue afin de faciliter l'interprétation des données. La

comparaison a été effectuée sur vingt patients, sélectionnés dans une large gamme de mesure (aussi bien en valeur absolue qu'en pourcentage). Le nombre de leucocytes variant de 3 à 22.3 G/L. La lecture des frottis a été répartie entre deux opérateurs.

Les limites d'acceptabilité ont été fixées comme le recommande le SH GTA 04(19)

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

Résultats :

Paramètres	Nombre de mesures	Intervalle de comparaison	Equation de la droite de régression	r <sup>2</sup>	Nombre de déviants
PN	20	1.02 à 18.23 G/L 15.0 à 83 %	y = 0.98 x +0.10	0.999	0
Ly	20	0.15 à 5.04 g/L 6 à 65.5 %	y = 1.02 x +0.03	0.981	0
Mono	20	0.2 à 2.10 G/l 4.0 à 18 %	y = 1.01 x -0.14	0.917	1

Tableau 35 : Synthèse des résultats de la comparaison de la formule automate/microscope

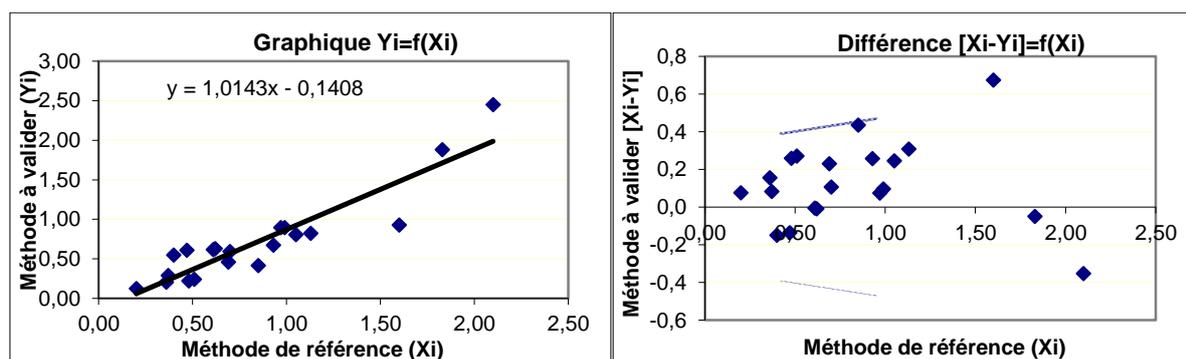


Figure 22: Exemple droite de régression et diagramme des différences pour les monocytes

On remarque un point discordant pour les monocytes pour lequel l'automate donne 1.6 G/L soit 13.8% alors que la lecture manuelle obtient 0.93 G/L soit 8%. Si l'on se réfère à la table de Rümke pour une valeur cible à 14 %, si l'on compte cent cellules, on peut tolérer un pourcentage compris entre 7.6 et 22.1%. La différence est donc jugée non significative.

Il y a donc une corrélation satisfaisante avec la méthode automatisée pour les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes.

#### 2.2.3.3.2 Cellules anormales

On désigne par cellules « anormales » des cellules réactionnelles (lymphocytes activés, plasmocytes...), immatures (myélémie, érythroblastes) ou tumorales (cellules lymphomateuses, blastiques...). La validation se fait de la même façon pour les

polynucléaires éosinophiles et basophiles. En effet ce sont des cellules « normales » de la formule leucocytaire mais présentes à des taux faibles qui avec l'incertitude inhérente à la formule réalisée au microscope ne permettent pas une validation quantitative précise comme pour les PN, lymphocytes ou monocytes.

L'approche est donc qualitative en s'appuyant sur une analyse de risque rigoureuse (cf. plus haut). En pratique, ce qui est attendu c'est une « évaluation et harmonisation des pratiques de lecture »(17) et l'important c'est de dépister et d'identifier correctement les cellules anormales. L'importance de l'habilitation des personnels et de l'utilisation de CQI cytomorphologiques (cf. chapitre dédié) est cruciale sur ce point.

Avant toute chose les cellules anormales ne pourront être mises en évidence que si l'on a réalisé un frottis sanguin, d'où l'importance des critères de revue du frottis sanguin cités plus haut. Parmi ces critères on retrouve la réalisation de lame engendrée par les alarmes automatées.

Indicateur Q	Message	Signification
Type WBC	[Blasts/Abn Lympho?]	Suspicion de blastes ou de lymphocytes anormaux
	[Blasts?]*	Suspicion de blastes
	[Left Shift?]	Suspicion de déplacement à gauche
	[Abn Lympho?]*	Suspicion de lymphocytes anormaux
	[Atypical Lympho?]	Suspicion de lymphocytes atypiques
Type RBC	[RBC Agglutination?]	Suspicion d'agglutination érythrocytaire
	[Turbidity/HGB Interf?]	Suspicion d'interférence de la mesure de l'hémoglobine par la turbidité du plasma
	[Iron Deficiency?]	Suspicion d'anémie ferriprive
	[HGB Defect?]	Suspicion d'anomalie de l'hémoglobine
	[Fragments?]	Suspicion de fragmentation érythrocytaire
Type PLT	[PLT Clumps?]	Suspicion d'agrégats plaquettaires

\* Ces éléments n'apparaissent pas sur tous les types d'analyseurs.

**Tableau 36 : Alarmes automatées XN-10**

Il est nécessaire de connaître la sensibilité et la spécificité de ces alarmes (« flags ») analyseurs. Nous avons fait le choix de ne pas vérifier par nous-même ces performances mais de nous baser sur la littérature(39)(40)(41)(42) ainsi que sur l'expérience acquise par l'utilisation depuis plus de dix ans d'automate de marque Sysmex®. Dans l'ensemble, les performances dans la détection des cellules anormales des XN sont très satisfaisantes.

Un autre point essentiel dans la détection des cellules anormales circulantes concerne la coloration des frottis. Le laboratoire doit s'assurer de sa qualité. Avec l'utilisation d'un colorateur automatique qui assure un renouvellement régulier des

colorants, ainsi qu'une immersion totale des lames, le laboratoire n'a pas pour le moment installé de contrôle à proprement parler de la coloration. Le colorateur est suivi avec des maintenances régulières et les lots de colorant sont tracés. Nous considérons que la formation du personnel associée à une lecture des lames des patients en continu, 24h/24h, permet un dépistage suffisamment précoce d'un problème lié à la coloration. En effet le délai toléré de réalisation d'un frottis sanguin est suffisamment important (< 6h, maximum 12h (43)) pour pouvoir réaliser de nouveaux frottis à partir du prélèvement dès lors qu'un problème viendrait à être détecté. Cependant il est à noter que l'eau tamponnée est un réactif préparé au laboratoire à partir de dihydrogénophosphate de potassium et d'hydrogénophosphate di-sodium dodécahydraté. Une étude de sa stabilité avec contrôle du PH au fil du temps est prévue.

La validation de méthode doit comporter également une étude des performances du laboratoire dans le dépistage et le décompte des cellules anormales et des augmentations des sous-populations normalement très minoritaires, PNE et PNB. Celles-ci ont été évaluées sous un angle plus qualitatif en étudiant les résultats des EEQ et la reproductibilité inter-observateurs.

En ce qui concerne les résultats des EEQ, dont le résultat rendu est celui du biologiste responsable, l'ensemble des résultats de 2013 est retrouvé conforme : les cellules « anormales » d'un hémogramme (ex : myélocytes, blastes) ont été retrouvées et les hypothèses diagnostiques correctement posées. Les résultats obtenus sur 2013 sont résumés dans le tableau ci-dessous (Notes A/B : réponse pertinente, C : réponse insuffisante, D : réponse erronée, E : absence de réponse) :

Confrontation	N° dossier	Site HD
Mars 2013	1	A
	2	B
	3	B
	4	A
Mai 2013	1	A
	2	A
	3	A
	4	A
Septembre 2013	1	A
	2	A
	3	A
	4	A
Novembre 2013	1	A
	2	A
	3	A
	4	A

**Tableau 37 : Résultats EEQ ABP 2013**

La participation de l'ensemble du personnel du laboratoire au programme de l'EEQ permet également de s'assurer de l'homogénéité du rendu de résultat. Chaque résultat est classé suivant trois catégories (A : Résultat compris dans l'intervalle : moyenne +/- 2 écart-type, B : résultat en dehors de l'intervalle précédent, mais compris dans l'intervalle cible (Rümke) et C : résultat hors limites)

	ABP 2013 1/4						ABP 2013 3/2
	PNE	PNB	Métamyélocytes	Myélocytes	Promyélocytes	Blastes	Erythroblastes
Nombre de notes A	26/26	26/26	25/26	26/26	25/26	26/26	20/20
Nombre de notes B	0/26	0/26	1/26	0/26	0/26	0/26	0/20
Nombre de notes C	0/26	0/26	0/26	0/26	1/26	0/26	0/20
Moyenne (m)	1,7	6,2	8,2	12,0	1,6	1,6	1,2
Valeur cible	1,4	6,1	9,6	10,7	1,5	2,1	1,4
m +/- 2S	0,3 -3	2,3-10,0	0,5-15,9	5,1-19,0	0-4,8	0 -3,6	0-3,3
Intervalle cible	0-5	2-13	5-17	5-18	0-5	1-7	0-5
CV (%)	41,7	31,2	46,7	29,0	100,9	64,5	88,0

**Tableau 38 : Exemple de résultat de confrontation cytomorphologique**

Cet exemple montre un dépistage et une numération corrects de la myélémie et des blastes. Cependant on peut noter que les pourcentages pour les promyélocytes et les érythroblastes dans cet exemple sont trop faibles pour s'assurer d'un correct dépistage par le personnel. En effet si l'on se réfère à la table de Rümke pour des valeurs de tels pourcentages cible, l'intervalle toléré est de 0 à 5. Donc si un personnel n'identifie pas ces cellules cela pourra être dû à l'incertitude de la méthode et pas forcément à un défaut de connaissances.

L'uniformisation du rendu des résultats est également assurée grâce à un panel de commentaires codés incrémentés dans le middleware par les biologistes depuis de nombreuses années.

Commentaires généraux (comGE sur Dxlab)			
AC	Absence de caillot visible	MALAG	Leucocytes comptés en cellules de Malassez
AACIT	Absence d'agrégats sur EDTA, examen inutile	MPT	Mauvais prélèvement, demande annulée + Téléphoné
ACT	Absence de caillot visible + Téléphoné	PERF	Prélèvement dilué par une perfusion ?
ACNP	A contrôler sur un autre prélèvement	PERFT	Prélèvement dilué par une perfusion ? + T
ACNPT	A contrôler sur autre prélèvement, Téléphoné	PH	Plasma hémolysé, résultat sous réserve
CAIL	Microcaillot : Résultats erronés	PLNOR	Plasma d'aspect normal
CAILT	Microcaillot : Résultats erronés, Téléphoné	PNNA	PN non accessible
CIT	Faire numération plaquettaire sur tube citraté	QIC	Quantité insuffisante pour contrôle
COAG	Prélèvement coagulé	QIM	Quantité < 2ml = Passage manuel : risque pour le technicien +analyse plus longue : retarde le résultat.
COMPAR	Résultat comparable au précédent	RD	Résultat définitif annulant le précédent
CRYO	Num. faite à 37° : Suspicion de cryoglobuline	RDT	Résultat définitif annulant le précédent + Téléphoné
DIFF	GB du canal DIFF (pas imprimé)	RENS	Renseignements clinique SVP
EB	Déduction faite des érythroblastes	RPEI	Refus du prélèvement = erreur d'identification + Téléphoné
EA	Examen annulé	RPEIT	Refus du prélèvement = erreur d'identification
EAAS	Examen annulé en accord avec le service	SNJ	Service non joignable
FC	Sous facteur de croissance	T	Résultats téléphonés
GB+	Paramètres rouges recalculés	V	RESULTATS VERIFIES
ICTE	Plasma ictérique	VT	RESULTATS VERIFIES, TELEPHONES
LAC1	Plasma lactescent : substitution	37	Numération faite à 37° : Agglutinine froide ?

COMMENTAIRES PLAQUETTES			
Test : Morphologie plaquettaire: COMP1 à COMP4		SUR PLAQ : A la place du résultat chiffré	
AA	Absence d'agrégats plaquettaires	INF150	Numération impossible : agrégats plaquettaires
AAAC	Absence d'agrégats plaquettaires et de caillot	SUP150	Agrégats plaquettaires sans thrombopénie
AC	Absence de caillot visible	SUP400	Sup. à la normale avec agrégats plaquettaires
AANIM	Absence d'agrégats plaquettaires, anisocytose modérée	COAG	Coagulé
AANORM	Absence d'agrégats et plaquettes normales	HI	Hémogramme impossible
CIT	Faire numération des plaquettes sur tube citraté	IT	Impossibilité technique
AGCIT	Plaquettes sur citrate, absence d'agrégats	QI	Quantité insuffisante
MALA	Numération en Malassez	SAT	Numération impossible : satellitisme plaquettaire
VNORM	Résultat vérifié, Plaquettes d'aspect normal	SAT2	Satellitisme plaquettaire sans thrombopénie
POP	Plaquettes optique	Uniquement pour la néo-natalogie et la réa-néo-natalogie	
SAT	Satellitisme plaquettaire numération impossible	29A	Plaq < 30 avec agrégats plaquettaires
ANIP	Anisocytose plaquettaire	29C	Plaq < 30 avec microcaillot
ANIPM	Anisocytose plaquettaire modérée	30A	Plaq > 30 avec agrégats plaquettaires
ANISO	Forte anisocytose	30C	Plaq > 30 avec microcaillot
DEGRA	Plaquettes dégranulées	100A	Plaq > 100 avec agrégats plaquettaires
MKCIR	Mégacaryocytes circulants	100C	Plaq > 100 avec microcaillot
PAUG	Plaq. de taille augmentée, sans plaquettes géantes		
PAUGG	Plaq. de taille augmentée avec plaquettes géantes		
PGEANT	Présence de plaquettes géantes		
PGRIS	Plaq. dégranulées : SD des « Plaquettes grises » ?		
PLADE	Dégradation hétérogène et partielle plaquettaire		

COMMENTAIRES « ROUGES » sur COMOH1, COMOH2, COMOH3, COMOH4			
ACANT	Acanthocytose	HNORM	Hématies d'aspect normal
ANIH	Anisocytose	HYPOC	Hypochromie
ANIHM	Anisocytose modérée	JOLLY	Corps de Jolly
ANIMA	Anisocytose, macrocytose	MACRO	Macrocytose
ANIMI	Anisocytose, microcytose	MASPH	macrocytose, sphérocytose
ANIPO	Anisocytose, poikilocytose	MICRO	Microcytose
ANISO	Forte anisocytose	MIHY	Microcytose, hypochromie
CABOT	Anneaux de Cabot	MIHYP	Microcytose, hypochromie, poikilocytose
CCMH	Impossibilité d'obtenir une CCMH correcte	PALU	Suspicion de Paludisme A confirmer en Parasito
CIBLE	Hématies cibles (Target Cell)	PAPPE	Présence corps de Pappenheimer
DACRY	Dacryocytose	POIKI	Poikilocytose
DOUBL	Double population érythrocytaire	POLYC	Polychromatophilie
ECHACA	Echino-acantho	PONCT	Hématies ponctuées
ECHIN	Présence d'échinocytes	ROUL	Présence de rouleaux érythrocytaires
ELLIP	Elliptocytose	SCHIZO	Présences de quelque schizocytes
FALCI	Hématies falciformes (drépanocytes)	SPHE	Présence de sphérocytes
GRSUR	Globules rouges surestimés, leucocytose majeure	V	Résultats vérifiés

COMMENTAIRES SUR LE TEST FM (COMGE2 sur Dxiab)	
1	Formule contrôlée au microscope (résultat identique à l'automate)
2	Formule contrôlée au microscope (résultat différent de l'automate)
3	Formule contrôlée: sous réserve : éléments altérés(résultat identique à l'automate)
4	Formule contrôlée: sous réserve : éléments altérés(résultat différent de l'automate)

COMMENTAIRES DES LEUCOCYTES (sur COMOL1, COMOL2, COMOL3)		
COMMENTAIRES GENERAUX	Commentaire Polynucléaire Neutrophile	
ABANO	Il n'a pas été vu de cellules anormales	
ABACUT	Absence de signe d'acutisation	
ABRECH	Absence de signe de rechute	
ABTRAN	Absence de signe de transformation	
ACNP	A contrôler sur un autre prélèvement	
ACNPT	A contrôler sur un autre prélèvement + téléphoner	
ALTER	Éléments altérés	
CARYO	Faire un caryotype	
COMPAR	Résultat comparable au précédent	
ECHEC	Echec de traitement	
END	Éléments non dystrophiques	
F50	Formule faite sur 50 éléments	
HISTIO	Histiocytose ?	
1IMMUN	Faire un immunophénotypage des cellules anormales	
1IMMU1	A phénotyper dans 1 mois	
1IMMU6	A phénotyper dans 6 mois	
IMMUC	Immunophénotypage en cours	
ININTE	Ininterprétable	
MASTO	Présence de mastocytes	
REFAJ	A refaire dans qq jours	
RECHUT	Rechute	
RENS	Renseignements clinique SVP	
RESER	Résultats sous réserve, cellules altérées	
SOUF	Signes de souffrance cellulaire : infection ?	
SURVEI	A surveiller	
	<b>Commentaire blastes</b>	
	BL<1	Blastes inférieur à 1000/mm <sup>3</sup>
	BL>1	Blastes supérieur à 1000/mm <sup>3</sup>
	BLHETE	Blastose à morphologie Hétérogène
	FAGOT	Présence de blastes avec Fagot d'Auer
	AUER	Présence de corps d'Auer
	ABAUER	Absence de corps d'Auer
	<b>Commentaire plasmocytes</b>	
	ABPLC	Absence de plasmocytes circulants
	LAPLA	Aspect leucémie à plasmocytes
	PLASAN	Plasmocytes dystrophiques
	PLASND	Plasmocytes non dystrophiques
	<b>Commentaire lymphocytes</b>	
ABLYM	Absence de cellules lymphoïdes anormales	
ABLYAC	Absence de lymphocytes activés	
ABLGL	Absence d'expansion de LGL (LGL<40% des LY)	
ABVAC	Absence de lymphocytes vacuolés	
BURKI	Présence de cellules de Burkitt	
1GUM	Nombreuses ombres de Grumprecht	
1GLYNO	Lymphocytes non dystrophiques avec ombres de Gumprecht	
1LGLNL	Absence expansion de LGL	
1LGL	Présence d'une expansion de LGL (LGL>40% des LY)	
LGRA	Lymphoïdes granulations	
1LYACT	Aspect de syndrome mononucléosique	
LYANO	Lymphocytose cytologiquement anormale	
1LYBAS	Cellules lymphoïdes au cytoplasme basophile	
LYBCL	Lymphocytes basophiles à chromatine lâche	
LYBECL	Lymphocytes basophiles, encochés à chromatine lâche	
LYBLA	Présence de cellules lymphoïdes d'allure blastique	
LYCC	Prés. de cel. d'allure centrocytique	
LYCLI	Prés. de cellules lymphoïdes au noyau divisé	
LYCER	Prés. de cel. lymphoïdes au noyau cérébriforme	
LYCHLA	Lymphocytes à chromatine lâche	
LYECL	Lymphocytes parfois encochés à chromatine lâche	
LYENC	Présence de cellules lymphoïdes au noyau encoché	
LYGRA	Cellules lymphoïdes renfermant des granulations	
TLAT	Présence de Tricholeucocytes atypiques	
	1LYHET	Lymphocytose pléiomorphe, hétérogène
	LYHYP	Hyperlymphocytose non dystrophique
	LYIRR	Cellules lymphoïdes au noyau irrégulier
	LYLP	Présence d'une inflexion lympho-plasmocytaire
	1LYNOR	Lymphocytes non dystrophiques
	LYMON	Lymphocytose monomorphe
	LYMPL	Présence d'une lympho-plasmocytose significative
	LYNUC	Présence de cellules lymphoïdes nucléolées
	LYNUCL	Lymphocytes nucléolés à chromatine lâche
	LYNUG	Prés. de cellules lymph. avec un gros nucléole
	LYPENI	Résultat sous réserve en raison de la profonde lymphopénie
	1LYREAC	Lymphocytose réactionnelle ?
	LYSEZ	Lymphocytes + cellules de Sézary
	LYTACL	Lymphocytes de taille augmentée à chromatine lâche
	LYTANU	Lymphocytes de taille augmentée nucléolée
	LYTRE	Cellules lymphoïdes au noyau en trèfle
	LYVAC	Présence de lymphocytes vacuolés
	MARGI	Présence de cellules lymphoïdes d'allure monocytoïde
	SEZ	Présence de cellules de Sézary typiques
	SEZA	Présence de cellules de Sézary atypiques
	SEZAT	Cellules lymphoïdes Sézaryforme
	1SEZDO	Présence de cellules de Sézary douteuses
	TL	Présence de Tricholeucocytes typiques
	VILLE	Présence de lymphocytes villeux
	<b>Commentaire PNeosinophile</b>	
DEO0	Eosinophiles non dysmorphiques	
DEO2	Eosinophiles anormaux	
DEO3	Eosinophiles très dysmorphiques	
EOHYPE	Hyperéosinophilie	

Tableau 39 Commentaires codés utilisés au laboratoire d'hématocytologie

## 2.3 Processus support

### 2.3.1 Ressources humaines.

La gestion des ressources humaines est un point crucial dans la démarche qualité, qui fait d'ailleurs l'objet d'une attention appuyée de la part des auditeurs COFRAC. Il ne sera développé dans cette partie que la formation du personnel non médical. La gestion des habilitations et le maintien des compétences du personnel médical (internes, biologistes) appartient au processus post-analytique et repose en grande partie sur la formation initiale de ces personnels.

Le chapitre 5.1 de la norme NF/EN/ISO 15189 :2012 (5.1) (10) est consacré au personnel. Il décrit les exigences relatives à la qualification du personnel (5.1.2), à la définition de ses fonctions (5.1.3), à l'accueil de celui-ci dans l'environnement organisationnel (5.1.4), à sa formation (5.1.5), à l'évaluation de ses compétences (5.1.5). Il y est également question de la revue des performances du personnel (5.1.7), et du développement professionnel continu (5.1.8).

La formation et l'habilitation en hématologie cytologie est un point crucial. En effet il s'agit de valider l'hémogramme, un examen qui comprend un ensemble de paramètres pour un même patient et non pas une simple valeur. En ce qui concerne la lecture au microscope, la difficulté de reconnaissance des cellules anormales est un point critique qu'il est indispensable de maîtriser. Ceci ne peut passer que par la formation, l'habilitation et le maintien des compétences du personnel. Le laboratoire n'a bien sûr pas attendu l'accréditation pour former les techniciens mais cette démarche n'était que peu formalisée, souvent formateur-dépendante et d'une durée variable.

Depuis quelque temps le pôle de biologie s'est doté d'une procédure de gestion des habilitations du personnel (7180-PR-018) que le laboratoire d'Hématologie met en place. Cela passe par la création de grilles d'habilitation dont le but est de reprendre l'ensemble des points indispensables que le personnel se doit de maîtriser pour garantir la qualité des résultats. L'utilisation de ces grilles permet également d'uniformiser cette formation. De plus, il est indispensable que chacun sache cerner ses limites et demander un avis le cas échéant.

Il faut distinguer le personnel déjà présent depuis plusieurs années, dont l'habilitation *a posteriori* est basée sur l'expérience, et le personnel nouvellement arrivé qui nécessite une période de tutorat, formalisée et tracée, comprenant classiquement une phase d'observation puis une phase de réalisation. Le laboratoire de cytologie a mis en place depuis quelques années un manuel de formation délivré à chaque nouvel arrivant (technicien, interne...) qui décrit les notions nécessaires à la formation en hématologie-cytologie.

A la suite de cette période de formation et de tutorat il est nécessaire d'évaluer les compétences nouvellement acquises sous forme de dialogue, de mise en situation ou d'un questionnaire qui a lieu le plus souvent au cours d'un entretien avec un biologiste du secteur concerné, le cadre du service et le tuteur.

Enfin le laboratoire doit mettre en place un système de maintien des compétences. L'habilitation aux analyses est revue annuellement lors des entretiens d'évaluation par le cadre du service. Le maintien des compétences n'est évalué que sur les tâches pour lesquelles le technicien est déjà habilité. Une fiche individuelle d'habilitation commune pour les secteurs de cytologie et d'hémostase a été créée par le cadre de santé sous format Excel. Elle reprend les différentes activités que le technicien doit maîtriser, la date d'habilitation initiale et si le maintien des compétences est assuré. Elle précise également si le technicien est référent sur une activité particulière. Ces informations sont reportées automatiquement sur un tableau croisé reprenant les différents agents et les différentes activités du laboratoire. C'est ce que l'on nomme la matrice des compétences.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation, le laboratoire de cytologie a ainsi créé deux fiches de formation/habilitation pour les techniciens. La première concerne l'utilisation de la chaîne XN9000. Elle est divisée en différentes sections comprenant le principe et l'utilisation de la chaîne, la procédure de passage des échantillons, l'utilisation du SP10, la gestion des réactifs, la gestion de l'osmoseur, les maintenances des XN10 et du SP10, la gestion des contrôles de qualité, la gestion des déchets, la réalisation des techniques manuelles et enfin une importante partie portant sur la vérification technique (anciennement appelée validation technique).

La seconde fiche concerne l'habilitation initiale des techniciens à la lecture des lames de cytologie sanguine. La formation passe par la prise de connaissance des différents modes

opératoires relatifs à la lecture d'un frottis sanguin, par des cours théoriques dispensés le plus souvent par un biologiste, sans oublier une formation à l'utilisation et à l'entretien des microscopes. Ensuite la formation se poursuit par la lecture, au microscope à deux têtes en compagnie d'un technicien, de lames normales dans un premier temps puis de lames pathologiques, afin de couvrir l'ensemble des situations pouvant être rencontrées. Puis, pendant au moins une semaine, le technicien en formation double la lecture des lames de routine d'un technicien habilité et assiste à la relecture des lames pathologiques au microscope multi-tête avec le biologiste de validation. A la fin de cette formation, le technicien effectue la lecture de formules sanguines normales et pathologiques de façon autonome avec l'assistance ponctuelle d'un autre technicien. L'habilitation qui fait suite à cette période de formation est basée sur la lecture de 10 lames-test. Le technicien est habilité s'il obtient un résultat de 8 sur 10 minimum. S'il obtient un résultat inférieur, sa formation est prolongée d'une semaine. Les lames qui ont posé problème pourront être revues au microscope multi-têtes avec un biologiste. La fiche d'habilitation des techniciens à la lecture de lame est présentée en **annexe IV**.

Le maintien des compétences est assuré par un nombre minimum d'affectations (défini au préalable par le cadre du service) au poste concerné chaque année. Des confrontations internes cytologiques ont également été mises en place, ciblant l'ensemble du personnel d'hématocytologie. Quatre lames sont ainsi proposées tous les trimestres. Ces lames sont issues du programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) de l'association de biologie praticienne (ABP). Les résultats de chaque personnel sont enregistrés dans un fichier Excel. Les valeurs cibles correspondent aux moyennes des participants à l'EEQ organisée par l'ABP. La fourchette acceptée est définie à partir de la table de Rümke. Une cotation basée sur un article de Trimoreau et al (36) est associée à chaque résultat des techniciens afin de faciliter cette évaluation. (A : résultat compris dans l'intervalle « moyenne du personnel +/- 2 écarts types », B : résultat en dehors de l'intervalle précité mais compris dans l' « intervalle cible défini par la table de Rümke et la valeur cible (v) » et C : résultat hors limites.)

Echantillon N° 2013 114																													
Formule (%)	Biologistes						Techniciens										Formule rendue	Moyenne (m)	Ecart type (S)	Moy -2S	Moy +2S	Valeur cible*	Fourchette acceptée*	Fidélité intermédiaire CV (%) = 100xS/m	CV limite acceptée%* = 100x1,33 / %x				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16										17	18	19	20
PNN	64	60	56	60	71	67	60	68	62	65	56	64	—	65	68	65	64	68	64	—	63,9	4,3	55,2	72,6	62,7	54-75	6,8	16,8	
PNE	2	2	2,5	1	1,5	1	1,5	1	1	3	1	0,5	—	2,5	2	2	0	2	2	—	1,7	0,7	0,3	3,0	1,42	0-5	41,7	111,6	
PNB	6	5	3,5	8	5,5	7,5	8	8	8	7	4,5	6	—	7	5	5	10	3	6	—	6,2	1,9	2,3	10,0	6,12	2-13	31,2	53,8	
Lymphocytes	0	1,5	3,5	2	11	6,5	3	4	1	5	5,5	4,5	—	8	3	6	4	5,5	0	—	4,7	2,3	0,0	9,3	4,6	2-11	50,1	62,0	
Monocytes	0	0	0	2	0,5	0	0	0,5	0	0	0	0	—	0	1	1	0	0,5	0	—	0,3	0,5	-0,7	1,3	1,11	0-5	171,1	126,2	
Ly hyperbaso													—							—								#DIV/0!	
Métamyélocytes	17	15	13	9	2	9,5	7,5	8,5	5	5	11	6,5	—	1,5	13	11	6	4	17	—	8,2	3,8	0,5	15,9	9,6	5-17	46,7	42,9	
Myélocytes	10	14	18	11	6	7,5	17	8	16	13	18	13	—	12	7	8	10	16	10	—	12,0	3,5	5,1	19,0	10,67	5-18	29,0	40,7	
Promyélocytes	0	0,5	1	5	1	1	1	1	7	0	2	3	—	1	0	1	3	2	0	—	1,6	1,6	-1,6	4,8	1,53	0-5	100,9	107,5	
Blastes	1	2	3	2	1,5	0,5	2	1	0	2	3	3	—	3,5	1	1	3	0	1	—	1,6	1,0	-0,5	3,6	2,08	1-7	64,5	92,2	
Cell anormales													—							—								#DIV/0!	
Ly activés													—							—								#DIV/0!	
Ly atypiques													—							—								#DIV/0!	
LGL													—							—								#DIV/0!	
Erythroblastes	0	0	0,5	1	1,5	0	0	0	1	0	1,5	0	—	0	1	1	1	0	0	—	0,4	0,5	-0,7	1,5	0,39	0-5	131,1	213,0	
Commentaires PQ													ANIP/FAUG															#DIV/0!	
Commentaires GR													—															#DIV/0!	
Commentaires GB													—															#DIV/0!	
Autre com.													—															#DIV/0!	
Conclusion	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	—	ok	ok	ok	ok	ok	ok	—								#DIV/0!	
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	—	100	100	100	100	100	100	—									

Valeur cible (v): Moyenne des participants à l'EEQ organisée par l'Association de Biologie Praticienne  
Fourchette acceptée définie à partir de la table de Rumke  
\* Limites fidélité intermédiaire f(x): 1,33 f · %x (selon Trimoreau et al.)  
Cotation associée à chaque résultat des techniciens/biologistes (selon Trimoreau et al.):  
A : résultat compris dans l'intervalle « moyenne des techniciens +/- 2 écart-types »  
B : résultat en dehors de l'intervalle précité mais dans l' « intervalle cible défini par la table de Rumke et la valeur cible (v) »  
C : résultat hors limites

**Tableau 40 : Exemple de confrontation cytomorphologique interne à partir d'une lame de contrôle ABP**

Des réunions animées par un biologiste sont ensuite organisées, au cours desquelles les réponses attendues aux différents cas sont expliquées. Des rappels physiopathologiques sont faits si nécessaire. Le maintien de l'habilitation d'un technicien à la lecture des frottis sanguins est assuré si au cours de l'année au moins 10 résultats de ces confrontations ont été jugés conformes. En cas de réponse non conforme, la relecture de la lame avec un technicien référent ou un biologiste est réalisée.

Le maintien des compétences est également assuré quotidiennement par la relecture des lames pathologiques au microscope multi-tête par le biologiste de validation en présence d'un technicien.

Les connaissances sont également maintenues grâce aux formations dispensées en interne ou par des organismes externes. Par exemple, un nouvel arrivant est convié dans la mesure de ses disponibilités à assister aux cours dispensés par les biologistes aux internes tous les semestres. Ces formations sont tracées par le cadre de santé grâce au logiciel GESFORM proposé par l'Association Nationale pour la Formation permanente du personnel Hospitalier (ANFH).

### 2.3.2 Informatique

L'informatique s'est imposée comme une des clés essentielles du bon fonctionnement des laboratoires d'analyses médicales. Les systèmes informatiques, aujourd'hui omniprésents dans les activités de laboratoire, doivent être considérés comme un équipement critique de laboratoire, au même titre qu'un automate, et doivent donc faire l'objet de validation et de suivi. Il est d'ailleurs indispensable d'avoir dans chaque service des référents informatiques formés à ces outils.

La version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 consacre un chapitre (chap. 5.10 )(10) aux dispositions à mettre en place afin de maîtriser les systèmes informatiques de laboratoire (SIL, middleware, serveur de résultats, ...). Le laboratoire doit vérifier le bon fonctionnement des moyens d'information et s'assurer de la pérennité des informations et de leur bonne transmission aux différentes étapes. Pour assurer la maîtrise du système d'information, le laboratoire peut aussi s'appuyer, en complément de la norme et du SH REF 02, sur le guide technique d'accréditation d'évaluation des systèmes informatiques en Biologie Médicale, le SH GTA 02(44). Nous aborderons ici plus spécifiquement les exigences concernant le processus analytique.

Au niveau du pôle de biologie, un groupe informatique des laboratoires (le GIL), composé de biologistes paramétreurs de DxLAB, a été créé. Ce groupe a pour mission de participer à l'amélioration du SIL, d'anticiper et de préparer les évolutions logicielles, d'instruire les fiches d'événement indésirable relatives au SIL ainsi que les fiches d'anomalies, et de suivre les actions qui en découlent.

Au sein du laboratoire d'hématologie, un biologiste et plusieurs techniciens ont été nommés référents informatiques, ce qui permet de limiter l'accès aux paramétrages des différents systèmes informatiques. Le laboratoire d'hématocytologie dispose de plusieurs logiciels informatiques comme le montre le schéma ci-dessous.

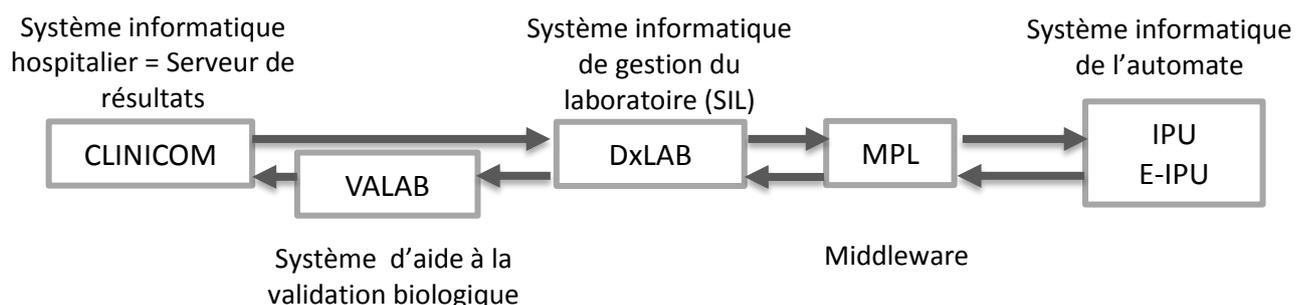


Figure 23 : Systèmes informatiques au laboratoire d'hématocytologie de l'Hôtel-Dieu

### 2.3.2.1 Validation et vérification des systèmes informatiques.

Selon la norme « le laboratoire doit vérifier que les résultats des examens, les informations associées et les commentaires sont reproduits avec précision, au format électronique et papier si pertinent, par les systèmes d'information externes au laboratoire destinés à recevoir directement les informations. »

Lors de l'installation des automates de la chaîne XN9000 au laboratoire, une validation des connexions et du paramétrage entre les automates, le middleware (MPL) et le SIL (DxLAB) a été réalisée et tracée. Le but était de vérifier la bonne transmission des résultats et de s'assurer de l'intégrité des données lors du passage dans les différents systèmes d'information. Toutes les étapes, de la saisie des demandes jusqu'à l'impression ou la transmission des résultats, doivent faire l'objet de vérifications.

Exemple :

Site	Bon de demande	IPU	MPL	DxLAB écran de validation	DxLAB Compte-Rendu	Clinicom Serveur Résultat	Clinicom mode Cumul biologique	Clinicom Compte-Rendu	Date	N° demande
HD XN	<a href="#">1</a>	<a href="#">2</a>	<a href="#">3</a>	<a href="#">4</a>	<a href="#">5</a>	<a href="#">6</a>	7	<a href="#">8</a>	03/04/14	140930090

Ces tests ont été réalisés par l'intermédiaire de dossier-patient réel. Les numéros renvoient à des copies d'écran des différentes interfaces permettant d'apporter la preuve de l'absence de perte et/ou de modification inappropriée des données d'un système à l'autre. Outre la vérification absolument nécessaire de l'intégrité des résultats chiffrés sur les différents systèmes d'information, certains points sensibles doivent également être vérifiés.

Il est notamment important de s'assurer de la bonne exécution des **règles d'expertise**, dont la mise en place permet d'automatiser, de standardiser et de sécuriser le processus analytique. Le LBM doit maîtriser l'utilisation de ces règles et s'assurer de leur stabilité dans le temps. On distingue pour l'examen de numération formule sanguine :

- La bonne exécution des règles de gestion des examens, applicables à l'enregistrement d'une demande, c'est-à-dire les modifications à la prescription qui consistent en l'ajout ou à la suppression de tests lors de la saisie sur DxLAB des tests demandés par le prescripteur. Ces modifications peuvent être opérées par DxLAB lui-même ou par MPL (confer chapitre sur la validation de la formule manuelle).

- La bonne exécution des règles d'expertise élaborées sur le middleware lors de la réception des résultats de l'automate (cf. chapitre sur la vérification des automates). Il est également important de vérifier, dans le paramétrage de la connexion, les modalités de transmission et de gestion des codes d'alarmes transmis par les analyseurs vers le middleware et de s'assurer que les éventuelles règles associées s'appliquent correctement.
- La bonne exécution des règles d'expertise élaborées au niveau du SIL lors de la réception des résultats importés du middleware, par exemple la conversion d'un résultat chiffré en un résultat semi-quantitatif afin de rendre des résultats conformes aux limites des techniques de dosages. C'est le cas du rendu des valeurs basses de plaquettes et de globules blancs. Par exemple on vérifiera qu'un résultat de globules blancs rendu à 0.12 G/L sur MPL sera bien converti en < 0.2 G/L sur DxLAB.

Il faut également vérifier la traduction appropriée dans le SIL puis dans le serveur des résultats, des **commentaires codés** émis dans le MPL. Etant donné le nombre important de commentaires codés existant au laboratoire (pour un code test existant, plusieurs commentaires codés peuvent être proposés), une vérification exhaustive n'était pas réalisable.

	Code test	
	MPL	DxLAB
Commentaires généraux	ComGE	COMGE
Commentaires hématies	ComH1	COMOH1
	ComH2	COMOH2
	ComH3	COMOH3
	ComH4	COMOH4
Commentaires plaquettes	ComP1	COMOP1
	ComP2	COMOP2
	ComP3	COMOP3
Commentaires leucocytes	COMOL1	COMOL1
	COMOL2	COMOL2
	COMOL3	COMOL3
Commentaire réticulocyte	ComRET	Commentaire Rétic

**Tableau 41 : Codes tests associés à des commentaires relatifs à la numération formule sanguine**

Il a été décidé de vérifier environ un commentaire par code test. Il est d'ailleurs mentionné dans le SH-GTA-02 que « les textes jugés non critiques peuvent être contrôlés par simple échantillonnage ».

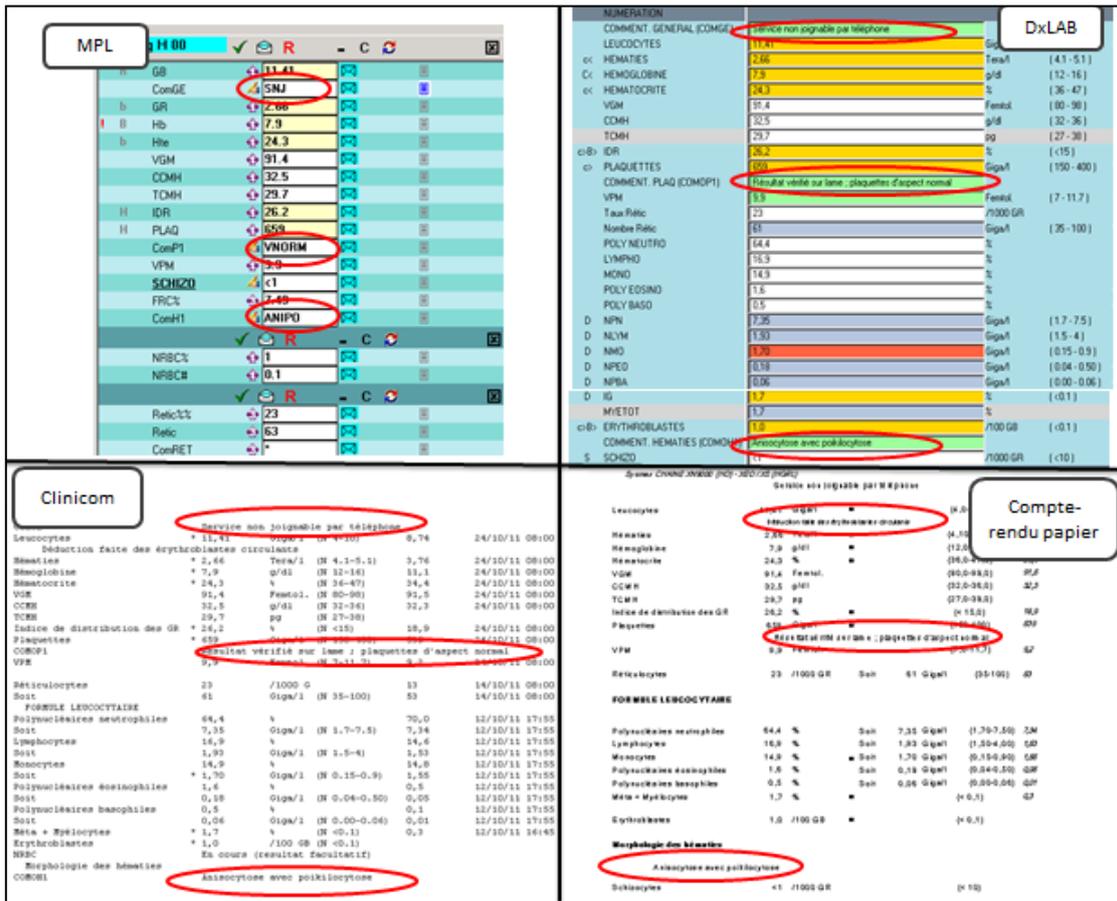


Figure 24 : Exemple de vérification de l'application de commentaires codés sur les différentes interfaces

La vérification régulière de la transmission des informations et de leur intégrité n'a pas encore été formalisée et devra faire l'objet d'instructions précises référencées. Cela peut passer par la création de jeux d'essais de patients-test permettant régulièrement de vérifier le bon fonctionnement du système. Les preuves de vérification initiales ont été apportées par des copies d'écrans des différentes interfaces. Pour le suivi, on pourra envisager la simple confrontation des données d'entrée (par exemple résultats de l'analyseur) et de sortie (par exemple compte-rendu d'examen). C'est ce que l'on nomme une comparaison « point à point ».

Il est noté dans le SH-GTA-02 que « dans de nombreux cas la vérification du transfert de données peut se faire « au fil de l'eau » à l'aide des données réelles produites par la gestion quotidienne des examens. Par exemple, en hématocytologie, lorsque le résultat de l'automate induit une vérification sur lame, l'opérateur peut, en saisissant les résultats de son contrôle de formule, vérifier en même temps le bon transfert des données de la numération et tracer cette vérification directement sur le « ticket automate » utilisé »(44).

Le laboratoire devra également réaliser des vérifications, à l'installation d'une nouvelle version d'un logiciel existant, lors de nouveaux paramétrages ou de toute modification du paramétrage existant.

#### 2.3.2.2 Procédures en cas de panne informatique : mode dégradé

Une autre exigence forte de la norme concernant l'informatique est la nécessité pour les laboratoires de « disposer de plans de contingence documentés pour maintenir les prestations en cas de défaillances ou de pannes des systèmes d'information qui affectent la capacité du laboratoire à fournir une prestation »(10). C'est-à-dire que le laboratoire doit disposer de procédures en mode dégradé en cas de panne d'un ou de plusieurs de ses serveurs critiques, afin d'assurer la continuité de service. A cet effet, le pôle de biologie s'est doté d'une procédure dégradée en cas de panne DxLAB (7180-PR-031), et le service de cytologie a mis en place une procédure dégradée en cas de coupure de connexion entre le MPL et la chaîne XN-9000 (9240-PR-012).

#### 2.3.2.3 Maîtrise de la sécurité informatique

Le laboratoire doit également « garantir la confidentialité permanente des informations des patients » et les logiciels informatiques utilisés doivent être « protégés contre tout accès non autorisé »(10). Pour cela, l'accès aux différents systèmes d'information est assuré par un système sécurisé : accès nominatif à durée limitée, avec traçabilité des connexions et droits d'accès différents selon la fonction du personnel. Le suivi des droits est assuré par les cadres de santé pour DxLAB et par le référent informatique pour MPL. Récemment, dans le cadre d'un projet de sécurité, le CHU de Nantes a mis en place une carte professionnelle d'établissement permettant de s'identifier et de s'authentifier sur le système d'information du CHU, et d'accéder ainsi à de nombreux logiciels (dont Clinicom, DxLAB) sans avoir à gérer de multiples mots de passe.

#### 2.3.2.4 Traçabilité, Intégrité et Conservation des données

Il est important que les systèmes d'information puissent garantir la traçabilité des acteurs effecteurs (biologistes, techniciens) pour les différentes étapes des processus pré-analytique, analytique et post analytique. Il convient également de s'assurer que les données sont correctement archivées et que celles-ci peuvent être relues au cours du temps sans

perte d'information. Le laboratoire doit s'assurer de l'intégrité de ces données dans le temps et vérifier à l'aide de dossiers patients la possibilité de consulter les archives.

La durée de conservation des données est conforme à la réglementation en vigueur et ne peut être inférieure à 18 mois afin de garantir la traçabilité entre deux évaluations successives du Cofrac. Elle doit en fait surtout permettre un suivi adéquat des patients, y compris pour des pathologies chroniques ou au long cours. Les sauvegardes du SIL et du middleware sont réalisées par la DSIT et la sauvegarde des données brutes issues des automates est réalisée périodiquement par les techniciens du laboratoire. Avec le changement de chaîne analytique, un nouveau mode-opératoire a dû être écrit dans ce but pour la sauvegarde des dossiers patients sur l'IPU de la chaîne Sysmex®.

### 2.3.3 Maîtrise du matériel, des réactifs et des locaux

#### 2.3.3.1 Matériel

Comme le demande la norme NF/EN/ISO 15189:2012 dans son chapitre consacré aux équipements (5.3.1) (10), le pôle s'est doté d'une procédure de gestion (7180-PR-014) qui définit les modalités de maîtrise des équipements utilisés au sein du laboratoire, dès leur réception, afin de s'assurer de leur bon fonctionnement. Elle décrit également les mesures à prendre lors des opérations de maintenance préventive et curative.

Chaque service possède une liste de son matériel (7180-IM-019). Au laboratoire d'Hématologie, celle-ci est gérée par le cadre de santé. Elle comporte les informations nécessaires à l'identification et à la localisation de l'équipement : type d'appareil, modèle, numéro de série, numéro d'inventaire du CHU, année de réception, localisation, type de contrat, fin de garantie. Cette liste précise également s'il existe des maintenances préventives, l'organisme qui les gère ainsi que leur fréquence et spécifie également s'il s'agit de matériel « critique ».

Les équipements du secteur de cytologie de routine de l'hôtel-Dieu comprennent entre autres la chaîne analytique Sysmex® composée de trois automates de cytologie et de l'étaleur colorateur, un colorateur manuel, huit microscopes, un réfrigérateur-congélateur, une étuve, un PSL, des pipettes.

Chaque automate dispose d'une fiche de synthèse (7180-IM-038) qui permet un état des lieux succinct des modalités de classement des différents documents relatifs à son entretien et son suivi (connexion informatique, maintenance, contrôle...).

Les maintenances préventives effectuées par un organisme externe, le plus souvent par le fabricant, font l'objet d'un contrat de maintenance accessible dont la fréquence doit être connue et les rapports conservés. Sur chaque équipement, une étiquette mentionne la date de la dernière maintenance-fournisseur et celle de la prochaine. L'ensemble des interventions réalisées sur les automates SYSMEX (intervention préventive ou curative par un technicien SYSMEX, intervention curative inhabituelle réalisée par un technicien du laboratoire) sont tracées sur MPL. Sont notées la nature de l'intervention, la personne étant intervenue et la date de réalisation. Un lien informatique est ensuite créé pour tout document relatif à l'intervention (scan PDF ou document fourni au format PDF par l'intervenant, sauvegarde de mails en format PDF si intervention informatique...)

Certains équipements comme les automates de numération formule sanguine ou l'étaleur-colorateur nécessitent des maintenances préventives journalière, hebdomadaire ou mensuelle qui sont effectuées par le personnel du service. Elles sont décrites dans des modes-opérateurs dédiés et sont également tracées informatiquement via le middleware MPL.

#### 2.3.3.2 Réactifs et consommables

Les réactifs et consommables sont traités dans le chapitre 5.3.2 de la norme NF/EN/ISO 15189 :2012 (10) qui aborde notamment la gestion des stocks, la réception et le stockage des réactifs ainsi que les exigences relatives à la gestion de leurs modes d'emploi.

Il est important que, pour chaque analyse, les lots des réactifs utilisés puissent être facilement retrouvés. Au laboratoire, cette traçabilité est assurée si possible par voie informatique. Les données relatives aux réactifs nécessaires à la réalisation des numérations formules sanguines sont conservées au niveau des automates XN10. Pour les réactifs utilisés par le SP10 pour la réalisation des frottis sanguins, la traçabilité des lots et les dates de péremption sont gérées manuellement via l'onglet maintenance du MPL.

Le laboratoire doit également veiller à disposer des fiches techniques des réactifs à jour et facilement accessibles (version papier ou informatique). Il doit donc être attentif aux changements de version de ces notices. En effet en cas de modification, il faut prendre connaissance des différences pour savoir si cela implique des changements dans les modes-opérateurs, éventuellement la nécessité de donner une information au personnel du service, voire de mettre en application la procédure de gestion de portée flexible. Afin de répondre à ces exigences, un formulaire doit être rempli (7180-IM-134), celui-ci permet de

connaître, pour chaque fournisseur, les modalités d'avertissement de changement de version, de réception de ces notices et leur lieu de conservation.

Un mode opératoire de gestion des réactifs utilisés par les automates XN-10 a également été rédigé (9240-MO-248). Y sont notamment décrits les modes de conservation et de chargement sur l'automate ainsi que leurs fonctions. La gestion des stocks est assurée par un logiciel dédié (Gesstock) et un technicien est nommé référent « gestion des stocks ».

#### 2.3.3.3 Locaux, conditions environnementales, métrologie

Comme le mentionne la norme (chapitre 5.2 locaux et conditions environnementales)(10) « le laboratoire [...] doit disposer d'un environnement adapté aux tâches à réaliser ». Cela est particulièrement vrai en ce qui concerne la lecture de frottis sanguins. En effet le travail au microscope nécessite calme et concentration et donc les conditions de travail doivent être adaptées.

La métrologie en cytologie reste très limitée par rapport à d'autres secteurs. En effet, le prétraitement des échantillons est quasi inexistant (absence de centrifugation), les contrôles de qualité sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de reconstitution et la calibration des automates est réalisée exclusivement par le fournisseur. De plus les températures d'utilisation des automates (15-30°C)(14) et d'utilisation (15-30°C)(14) et de conservation (2-30°C)(14) des réactifs se situent dans une fourchette de température ambiante. Seuls les contrôles de qualité doivent se conserver entre 2 et 8°C, ce qui a nécessité de réaliser une cartographie du réfrigérateur dans lequel ils sont stockés.

#### 2.3.4 Gestion documentaire : documentation des procédures analytiques.

Comme le demande la norme NF/EN/ISO 15189 :2012(10) dans son chapitre 4.3 « maîtrise des documents », le pôle de biologie a mis en place une procédure « d'élaboration et de gestion documentaire » (7190-PR-002). Cette procédure décrit l'ensemble des principes d'élaboration et de gestion des documents internes au sein du pôle de Biologie tout au long de leur cycle de vie depuis leur création jusqu'à leur archivage ou leur destruction.

Les objectifs sont de permettre au personnel concerné de disposer, à tout moment, du document approprié, régulièrement mis à jour et compréhensible, afin de limiter le risque d'utilisation par mégarde de documents périmés et de faciliter l'intégration des

nouveaux personnels sur leur poste de travail. Cette procédure a également pour but d'harmoniser et de faciliter l'élaboration, la modification et la validation des documents selon des règles préétablies tout en limitant ou réduisant le volume documentaire.

La gestion des documents est réalisée avec le logiciel qualité Ennov, logiciel institutionnel, partagé par l'ensemble des services du CHU de Nantes.

Comme chaque service, le laboratoire d'Hématologie a décliné ce processus de gestion des documents internes. Il est représenté par le logigramme ci-dessous qui schématise et explique les actions successives à conduire pour réaliser la gestion des documents internes en précisant à chaque étape les acteurs et leurs responsabilités.

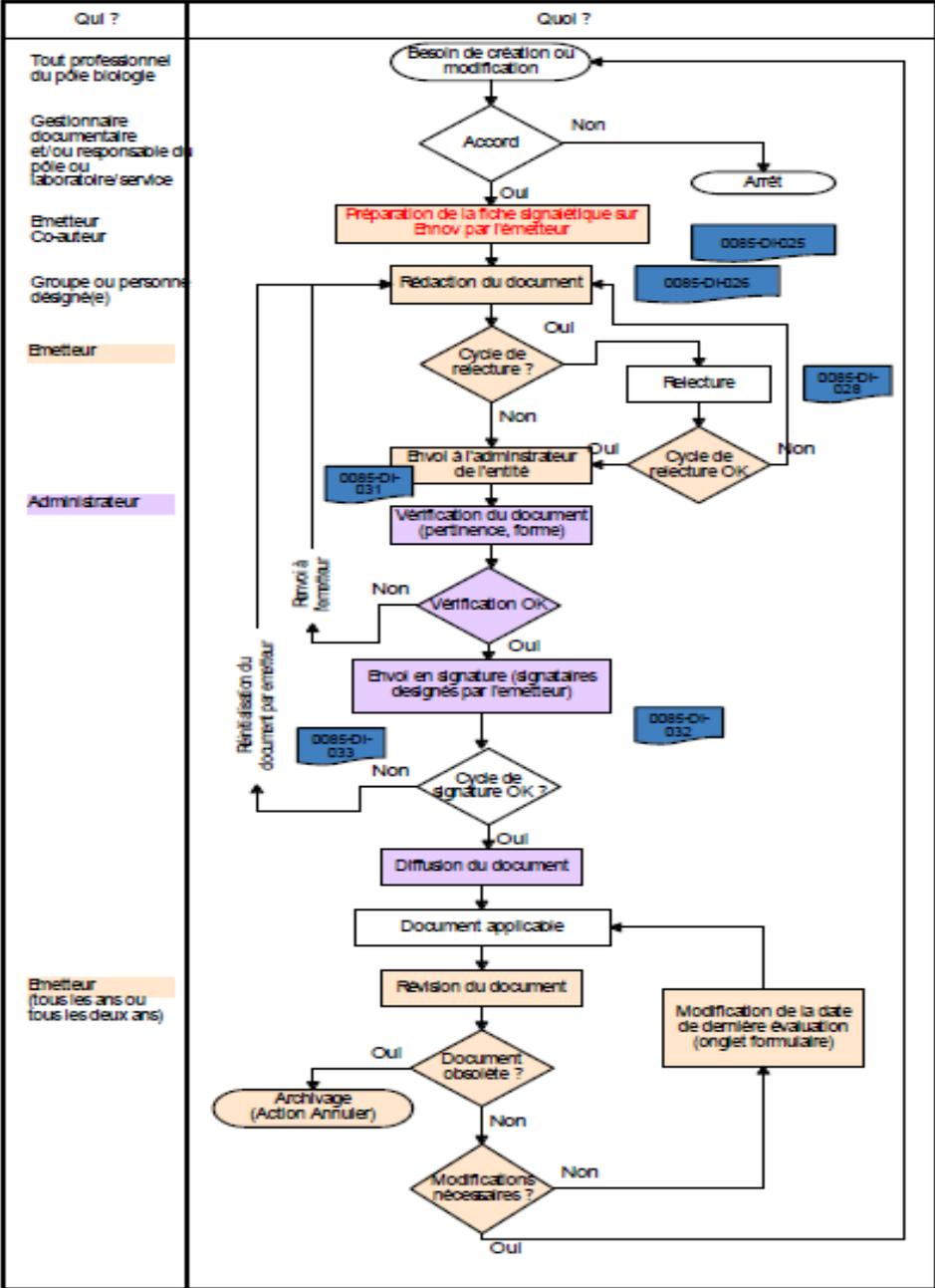


Figure 25 : Logigramme de gestion des documents internes extrait de la procédure de gestion

Depuis des années le laboratoire d'hématocytologie enrichit sa base documentaire, en perpétuelle évolution. L'arrivée d'une nouvelle chaîne analytique a entraîné un important travail de révision et de création de documents. Toute l'équipe du laboratoire s'est mobilisée et chacun a participé à la rédaction de documents.

Documents relatifs à l'utilisation de la chaîne XN 9000	
9240-PR-029	Fonctionnement général de la chaîne XN 9000
9240-DI-090	Description des différents canaux de la chaîne XN 9000
9240-MO-247	Passage des échantillons sur la chaîne XN 9000
9240-MO-248	Gestion des réactifs utilisés sur la chaîne XN 9000
9240-MO-250	Utilisation d'une unité de préparation de réactif (RPU)
9240-PR-032	Utilisation de l'IPU sur la chaîne XN9000
9240-MO-242	Maintenance de la chaîne XN 9000
9240-MO-241	Sauvegarde dossiers patients sur l'IPU à l'HD
Documents relatifs aux techniques manuelles	
9240-MO-154	Recherche d'un caillot
9240-MO-152	Dilution des prélèvements sanguins
9240-MO-153	Substitution du plasma
9240-MO-155	Numération des réticulocytes et des corps de Heinz en technique manuelle
9240-MO-149	Numération des plaquettes en méthode manuelle
Documents relatifs à la coloration et lecture des frottis sanguin	
9240-MO-150	Coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) sur colorateur ACL
9240-DI-081	Coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) sur colorateur ACL
9240-IM-135	Préparation de l'eau tamponnée (feuille de paillasse)
9240-MO-253	Préparation de l'eau tamponnée pour la coloration MGG
9240-IM-137	Feuille de paillasse pesée des poudres
9240-MO-159	Morphologie plaquettaire sur lame (MOP)
9240-MO-156	Réalisation d'un frottis sanguin
9240-MO-157	Recherche d'agrégats plaquettaires sur lame
9240-MO-158	Evaluation du nombre de plaquettes sur lame
9240-MO-160	Morphologie des hématies sur lame (MOH)
9240-MO-161	Morphologie des leucocytes sur lame (MOL)
9240-MO-162	Vérification d'une formule sur lame
Documents relatifs à la validation technique	
9240-PR-031	Procédure de validation de la lignée plaquettaire sur la chaîne XN 9000
9240-PR-030	Procédure de validation de la lignée leucocytaire sur la chaîne XN 9000
9240-PR-027	Procédure de validation de la lignée érythrocytaire sur la chaîne XN 9000
9240-DI-072	Résultats de cytologie à téléphoner
9240-DI-078	Résultats de cytologie à téléphoner par le technicien au biologiste pendant les heures de garde
9240-DI-089	Intervalles de référence de la numération globulaire et plaquettaire en fonction de l'âge
Documents relatifs à l'utilisation des systèmes informatique	
9240-PR-024	Utilisation de MPL au laboratoire d'Hématologie

9240-PR-025	Modification de l'analyse "numération formule" par le système informatique
9240-DI-046	Tableaux récapitulatifs des commentaires sur les tests sur MPL/DxLAB
9240-DI-012	Annexe - Liste des commentaires (généraux, sur les hématies, les plaquettes, les leucocytes) sur MPL/DxLAB
9240-PR-032	EIPU
9240-PR-012	Procédure informatique dégradée en cas de coupure de connexion MPL/chaîne XN9000
Documents relatifs aux contrôles qualité	
9240-MO-213	Contrôle national de qualité
9240-MO-243	Gestion des contrôles sur la chaîne XN 9000
9240-MO-254	Cytohématologie: conduite à tenir en cas de CQI non conforme
9240-MO-255	Comparaison mensuelle inter-sites
9240-IM-139	Comparaison inter-sites en cytologie
9240-MO-256	Gestion des EEQ Probioqual en cytologie
9240-IM-126	EEQ-Fiche de suivi des contrôles
9240-IM-127	fiche d'écart EEQ non conforme
9240-IM-131	Lecture des lames de contrôle externe
Documents relatifs à la formation/ habilitation	
9240-IM-121	Habilitation technicien: utilisation de la chaîne XN9000
7180-DI-055	Technicien de laboratoire-Hématologie secteurs hémostase et cytologie
9240-IM-124	Habilitation technicien à la lecture de lame
9240-MO-223	Manuel de formation laboratoire de cytologie
Autres	
9240-MO-123	Réception et conservation des prélèvements au laboratoire d'Hématologie
9240-IM-052	Plan d'action- suivi des fiches d'évènement indésirable
9240-MO-251	Ajout de paramètres en cytologie et en hémostase à la demande du service

**Tableau 42 : Liste des documents d'hématocytologie relatifs au processus analytique de la NFS applicables sur le site de l'Hôtel-Dieu.**

Bien évidemment cette liste de documents va continuer d'évoluer, de nouveaux documents sont d'ailleurs actuellement en préparation.

Selon la procédure du pôle, le document de référence est la version informatique. La modification manuscrite d'un document validé doit être exceptionnelle. Il est autorisé de modifier le document de façon manuscrite si ceci est approuvé par l'approbateur initial du document. La modification est alors inscrite sur l'ensemble des documents papier diffusés, datée et signée, de manière lisible et indélébile. La personne chargée de la gestion documentaire est informée afin d'effectuer la modification sur le format électronique le plus rapidement possible. Une révision systématique des documents a lieu généralement tous les deux ans.

## 2.4 Assurer la qualité des procédures analytiques :

### 2.4.1 Garantir la qualité de l'hémogramme automatisé.

La vérification/validation d'une méthode comprend une phase initiale, avant son utilisation en routine qui a été développée précédemment, et une phase de vérification continue et de confirmation des performances, pour contrôler la qualité du processus analytique et donc des résultats lors du fonctionnement au quotidien. Les contrôles de qualité constituent la base de cette validation continue.

Quelques définitions extraites du SH GTA 06 (45) pour bien comprendre les différents types de contrôles utilisés sont rappelées ci-dessous.

Contrôle interne de qualité (CQI) : « réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôle lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli ».

Comparaison inter-laboratoires (CIL) : « organisation, exécution et évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées (NF EN ISO/CEI 17043) ». On distingue deux type de CIL :

- L'évaluation externe de qualité (EEQ) : « Procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire [...] par le biais d'une comparaison inter-laboratoires réalisée par un organisateur respectant substantiellement les exigences de norme ISO/CEI 17043 et la réglementation en vigueur à l'aide d'échantillons de contrôle inconnus. »
- Le contrôle interne de qualité externalisé : « CQI réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôle confrontés entre eux par établissement périodique des moyennes (*généralement mensuel*) permettant d'estimer la justesse (biais). Le CQI externalisé n'est pas considéré comme un EEQ (cf. document SH REF 02). »

	Performance analytique
CIQ avec valeurs assignées	Étalonnage ou justesse et fidélité intermédiaire
CIQ sans valeurs assignées	Fidélité intermédiaire
CIQ externalisé	Justesse et fidélité
EEQ	Exactitude
CNQ	Exactitude

Tableau 43 : Complémentarité des contrôles de qualité (46)

#### 2.4.1.1 CQI

Le CQI permet de surveiller en continu le processus analytique pour décider si les résultats sont suffisamment fiables pour être communiqués. Il donne une évaluation indépendante du bon fonctionnement de l'ensemble du système analytique, de la qualité des réactifs, de l'étalonnage et des manipulations effectuées mais il ne permet pas de contrôler les étapes pré et post analytiques.

Il convient en premier lieu de choisir les échantillons de contrôle de qualité. Selon la norme ISO/EU/NF 15189 (chap. 5.6.2) « le laboratoire doit utiliser les matériaux de contrôle qualité qui se comportent par rapport au système d'analyse de manière à être le plus fidèles possible aux échantillons de patients ». Or, les CQI en hématocytologie, quel que soit le fournisseur, sont constitués de sang stabilisé dans un milieu artificiel différent du sang d'un patient, ce qui se traduit par un comportement analytique du CQI sur l'automate légèrement différent, en particulier pour la formule leucocytaire.

Du fait du traitement subi par les globules blancs pour assurer leur stabilité, ces éléments ne peuvent conserver leurs caractéristiques morphologiques et ne sont donc plus reconnaissables sur un frottis sanguin. De plus l'état actuel de la science et de la technologie ne permet pas de stabiliser les polynucléaires éosinophiles (PNE), basophiles (PNB) et les immatures granuleux(IG) dans les matériaux de contrôle. Pour pallier à cela des algorithmes spécifiques au contrôle de qualité sont appliqués sur l'automate afin que certaines parties spécifiques des polynucléaires neutrophiles soient comptées comme PNE, PNB ou IG.

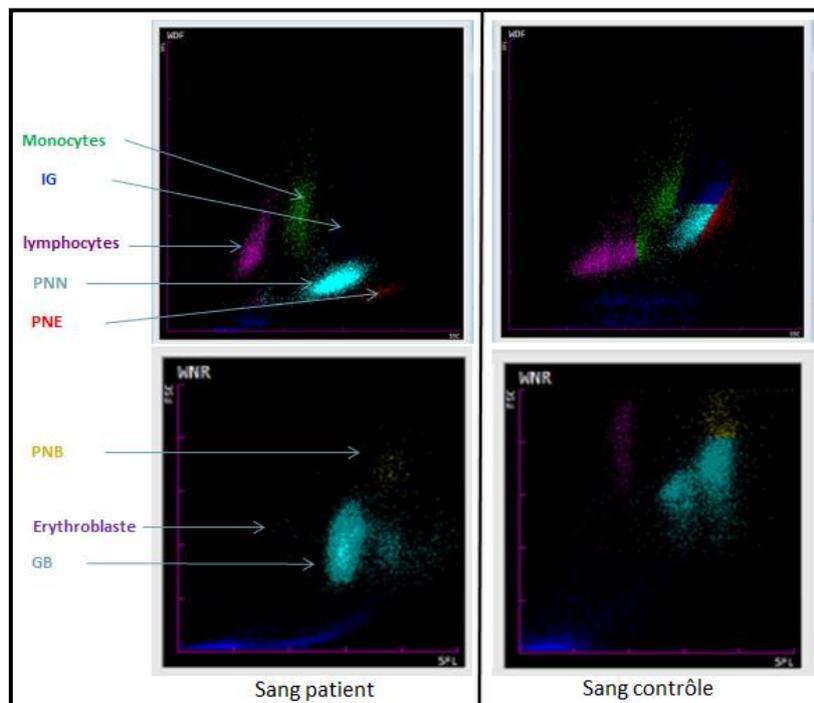


Figure 26 : Comparaison sang d'un patient et sang de CQI

L'utilisation d'un CQI fournisseur est à l'heure actuelle indispensable notamment parce qu'il permet au SAV d'identifier l'origine d'une panne. Cependant selon la norme (note 2 chapitre 5.6) « il convient de considérer l'utilisation de matériaux de contrôle tiers indépendants, à la place ou en plus des matériaux de contrôle fournis par le fabricant de réactifs ou d'instruments ». Il existe en hématologie des fournisseurs de CQI indépendants (Eurocell, Bio-Rad), cependant pour des raisons budgétaires et afin de simplifier la gestion des CQI, le laboratoire ne fonctionne qu'avec des CQI fournisseurs.

L'application du contrôle de qualité en hématocytologie comprend certaines particularités. Compte tenu de la complexité de la méthode, plusieurs analyses sont réalisées de manière simultanée à partir d'un même réactif sur les mêmes cellules (contrôle à la fois pour l'hémogramme complet, la formule leucocytaire, les réticulocytes et les érythroblastes). Il existe aussi des particularités liées à l'interrelation des différents paramètres notamment entre les paramètres mesurés (GR, Hb, Ht) et les paramètres calculés (VGM, TCMH et CCMH). Enfin ces réactifs ont une durée de stabilité limitée avec des lots utilisables seulement 8 semaines, sensibles aux conditions de conservation (conservation à 2- 8°C 7 jours).

Il faut également faire attention aux niveaux de concentration qui doivent refléter les concentrations des échantillons biologiques analysés et si possible se situer proches des

seuils décisionnels cliniques. Au laboratoire, le choix a été fait de fonctionner avec trois niveaux de CQI (normal, haut, bas).

La fréquence des contrôles doit être adaptée au fonctionnement du LBM. Le CQ doit encadrer les séries analytiques. En cas de fonctionnement en continu de l'analyseur il convient de définir une fréquence en fonction par exemple du nombre d'analyses réalisées. En effet en cas de contrôle non conforme, toutes les analyses depuis le contrôle précédent doivent être soumises à une évaluation pouvant conduire à une nouvelle analyse (après d'éventuelles mesures correctives et un contrôle valide). La périodicité tiendra compte également des maintenances puisque celles-ci doivent être encadrées par des CQI, mais aussi des recommandations des fournisseurs.

Après analyse de ces différentes données, le laboratoire a revu sa stratégie de passage des CQI.

Heure de passage des contrôles	NUIT		MATIN		APRES-MIDI	SOIR
	Avant et après la maintenance de 2h		9h		14h	17h
Niveau de contrôle passé	Niveau Bas		Niveau Normal	Niveau Haut	Niveau Normal	Niveau Haut

**Tableau 44 : Tableau Stratégie de passage des CQI**

Selon les recommandations du SH-GTA-06 : « à chaque changement de lot d'échantillons de contrôle, le laboratoire veille à anticiper l'établissement des valeurs cibles et des seuils d'interprétation. Ceux-ci sont déterminés selon des essais probatoires définis par le laboratoire en fonction de la spécificité de l'examen et de la durée de validité du lot. Pendant cette période, la conformité de la technique est assurée par le lot de contrôle en cours. Le nouveau lot est analysé comme un échantillon de patient. La moyenne des résultats obtenus permet de déterminer la valeur cible initiale, les seuils d'interprétations des nouvelles cartes de contrôle sont réajustés si nécessaire. Chaque laboratoire détermine la valeur cible qui correspond à la moyenne des valeurs obtenues pendant la période probatoire. Cette valeur est retenue comme valeur moyenne pour l'établissement de la carte de contrôle. Au cours de l'utilisation du lot d'échantillons de contrôle la valeur cible peut être réajustée si nécessaire »(45)

Le laboratoire a réfléchi à instaurer une période probatoire de quelques jours pour « qualifier » chaque nouveau lot de CQI en vérifiant, en parallèle avec l'ancien lot, la concordance des résultats. Le but serait de pouvoir prévenir rapidement le fabricant en cas

de problème sur le CQ afin qu'un nouveau lot puisse être rapidement commandé, bien que ce cas de figure soit rarissime.

Cependant contrairement à d'autres secteurs de biologie médicale, les CQ en hématocytologie ne sont pas stables plusieurs mois et il est impossible de disposer par exemple d'un lot réservé à l'année. Une période probatoire permettant de définir une moyenne cible et des limites d'acceptabilité est donc quasi impossible, sans mettre en place un système complexe et chronophage, du fait de la péremption rapide (huit semaines) et du chevauchement faible des lots, contrairement à la biochimie par exemple où il est classique de réaliser une période de chevauchement des lots sur 30 valeurs avec des lots réservés. Actuellement nous utilisons les moyennes et limites acceptables du fournisseur malgré les inconvénients que cela représente. De ce fait nous ne répondons pas aux recommandations du SH-GTA-01 qui demande une « redéfinition des intervalles d'acceptation pour être en adéquation avec les performances analytiques réelles et les besoins du laboratoire, afin de conduire à une maîtrise du contrôle efficace, optimale et pertinente »(47). Cependant une réflexion est en cours pour redéfinir ces limites acceptables. Une comparaison sur un lot de CQI a été réalisée pour comparer les CV fournisseurs avec les CV automates, les CV du groupe de pairs (grâce aux CQI externalisés) et les CV Ricos souhaitable et minimale.

Niveau 2 (lot:42091102)	CV Total (3 automates) fin de lot	CV groupe de pairs (SNCS fin de lot)	CV fournisseur	CV RICOS souhaitable	CV RICOS Minimal
GR	0,79	1,16	2,45	1,60	2,40
Hb	0,84	1,04	1,55	1,43	2,14
Ht	1,28	1,69	<b>4,96</b>	1,35	2,03
PLT	2,25	3,11	<b>7,45</b>	4,55	6,83
GB	1,50	1,99	3,02	5,70	8,55
PN	2,75	2,82	7,53	8,55	12,83
Ly	3,32	4,15	<b>10,00</b>	5,10	7,65
Mono	5,64	7,52	<b>30,10</b>	8,90	13,35
PNE	7,50	6,39	<b>25,00</b>	10,50	15,75
PNB	2,73	2,75	<b>39,39</b>	14,00	21,00

**Tableau 45 : Réflexion limites acceptable CQI : exemple avec le niveau 2 d'un lot de CQI**

Pour certains paramètres notamment ceux de la formule les bornes fournisseurs semblent être particulièrement large, l'utilisation des CV Ricos pourrait être un compromis intéressant.

Le laboratoire doit également dans sa gestion des CQI définir des seuils d'alarmes et d'action. Le SH-GTA-06 propose des règles d'interprétation en se basant sur les règles de Westgard(48).

Règles de rejet	$1_{3s}$	Une valeur éloignée de plus de trois écart-types (SD) de la moyenne
	$2_{2s}$	Deux valeurs consécutives éloignées de plus de deux SD du même côté de la moyenne
	$R_{4s}$	Deux valeurs consécutives éloignées l'une de l'autre de plus de quatre SD
Règles d'alarmes	$1_{2s}$	Une valeur éloignée de plus de deux SD de la moyenne
	$4_{1s}$	Quatre valeurs consécutives éloignées de plus de un SD du même côté de la moyenne
	$10_x$	Dix valeurs consécutives situées du même côté de la moyenne.

Tableau 46 : Exemple de règles d'interprétation dans le SH-GTA-06(50) à partir des règles de Westgard

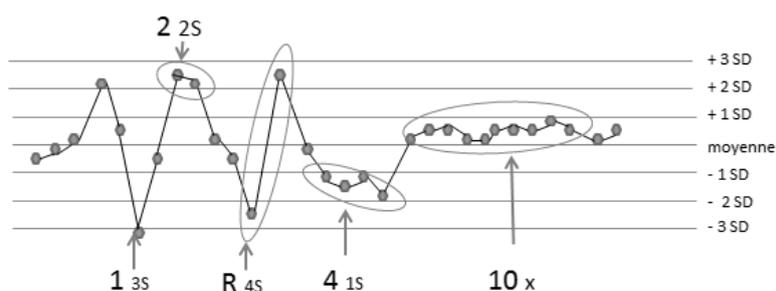


Figure 27 : Schéma représentant quelques règles de Westgard sous forme de carte de contrôle de type Levey-Jennings

Cependant ces règles sont surtout utilisables dans le cas d'intervalles d'acceptation redéfinis par le laboratoire et en utilisant la moyenne cumulée, ce qui n'est pas le cas en hématologie. Le laboratoire a choisi de fonctionner simplement avec le rejet systématique des CQI dépassant deux écart-types.

Le laboratoire doit également élaborer une conduite à tenir en cas d'écart sur un résultat de contrôle et s'assurer de la traçabilité des actions menées.

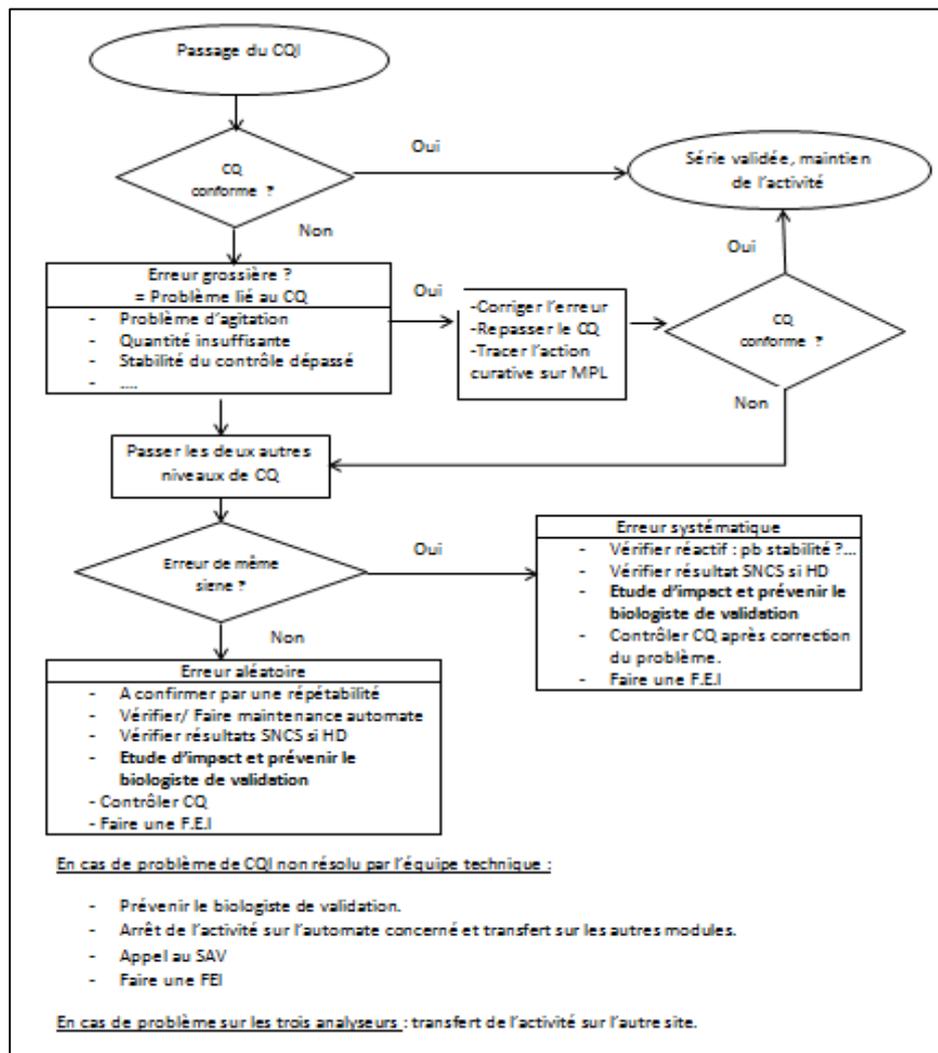


Figure 28 : Proposition de conduite à tenir en cas de CQI non conforme

En cas d'anomalie de CQI, il faut tenter de déterminer d'où vient le problème. On doit bien entendu regarder l'historique des CQI. Mais dans un premier temps il faut se demander s'il ne s'agit pas d'une erreur grossière (quantité insuffisante, contrôle périmé...). Ensuite il convient de comparer au moins deux niveaux de CQI. Plusieurs cas de figures sont à envisager:

- Les différents niveaux de contrôles sont affectés d'une erreur de même signe : il s'agit donc d'une erreur systématique, il faudra alors par exemple regarder la stabilité des réactifs.
- Les contrôles ne sont pas affectés d'une erreur de même signe : il s'agit alors d'une erreur aléatoire qui pourra être confirmée en réalisant une répétabilité, il peut s'agir d'un défaut de maintenance, d'un problème sur les cellules de mesure...

L'ensemble des mesures prises à la suite d'une anomalie doit être tracé sur le middleware. Si l'anomalie n'a pas été résolue, il faudra faire une déclaration de non-conformité.

Le LBM devra si nécessaire réaliser une étude d'impact. Cette étude consiste à évaluer rétrospectivement l'impact sur les résultats rendus depuis le précédent CQI conforme. Le biologiste doit tout d'abord établir le périmètre de l'étude (type d'analyse concerné, nombre, automate concerné) puis évaluer les risques sur les résultats. Si les résultats sont potentiellement remis en question et qu'une ré-analyse est possible, les échantillons incriminés ou un échantillonnage représentatif de ceux-ci sont repassés après résolution du problème. On devra ensuite déterminer la significativité médicale de l'écart constaté par rapport à la cible et corriger le cas échéant les résultats biologiques rendus.

Outre cette exploitation immédiate des CQI permettant de détecter les erreurs en temps réel et de pouvoir en cas de conformité valider les résultats de la série, les CQI doivent également être exploités à plus long terme.

Cette interprétation différée, mensuelle ou à la fin de chaque lot de CQI (toutes les huit semaines), permet de suivre les performances des analyseurs afin de déceler précocement une détérioration du processus. Le relevé des CV et écart-types permet de suivre la reproductibilité des analyseurs sur les différents paramètres. Ces données devront être interprétées par rapport aux spécifications annoncées par le fournisseur et aux recommandations de RICOS.

#### 2.4.1.2 Moyenne mobile.

Le suivi des résultats de patients peut être une source importante de renseignements. Ces méthodes de suivi sont basées sur l'étude mathématique et statistique des paramètres hématologiques. Le calcul de moyennes mobiles pondérées (dénommé « XbarM » sur les automates Sysmex (49)) est réalisé par l'automate pour tous les paramètres de la numération formule sanguine en utilisant un algorithme très complexe élaboré à partir de l'algorithme de Bull (50). Ce dernier est une formule statistique basée sur l'utilisation des résultats des patients qui s'appuie sur le principe que les moyennes respectives des indices érythrocytaires VGM, TCMH et CCMH sont une constante universelle. Les moyennes des indices sont en principe stables dans le temps sur différents échantillons

d'un même laboratoire, bien que ceci soit plus délicat en milieu hospitalier où le recrutement est très hétérogène.

L'analyseur d'hématologie effectue donc ce calcul statistique sur des séries d'une vingtaine d'échantillons analysés. La moyenne des vingt derniers patients est comparée à la valeur cible pour chacun des paramètres. Le X-barM fonctionne donc en continu et peut révéler d'éventuelles dérives sur les résultats plus rapidement que les CQI.

Cependant certains paramètres sont plus adaptés que d'autres pour ce type de contrôles, par exemple la numération des globules blancs, le taux d'hémoglobine ou la numération des plaquettes présentent par nature une grande variabilité biologique et ne sont pas très intéressants à suivre avec ce type de méthode. En revanche d'autres paramètres comme le VGM, TCMH, CCMH, et aussi le VPM sont des indicateurs importants permettant de vérifier le bon fonctionnement de l'analyseur, car ils présentent des variations biologiques beaucoup moins importantes. Par exemple la CCMH, paramètre peu regardé par les cliniciens, est un excellent indicateur de la plausibilité des résultats, car elle varie peu naturellement. De plus, son calcul nécessite le recours à deux canaux différents, canal des globules rouges pour la détermination de l'hématocrite et canal de l'hémoglobine ce qui permet un contrôle simultané de ces deux facteurs.

D'autres paramètres qui ne sont pas des données cliniques sont également intéressants à suivre car ils sont un reflet du réglage de l'analyseur. Par exemple le DIFF-X et le DIFF-Y marquent la position (« les coordonnées ») du nuage des PNN sur le diagramme de dispersion de la formule (canal DIFF)

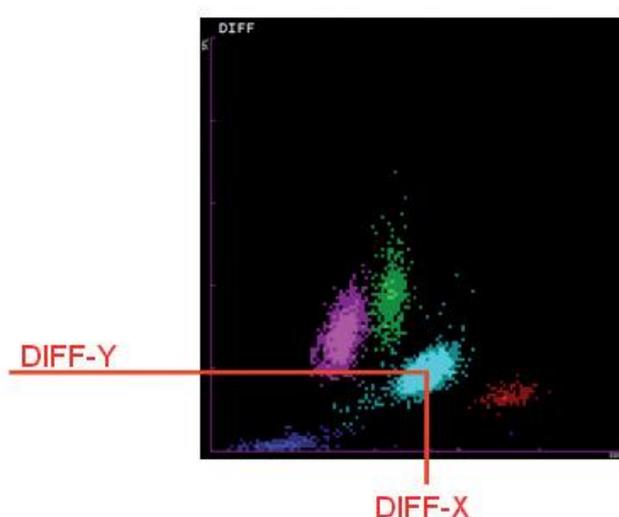


Figure 29 : Canal Diff

Si un problème survient sur ces paramètres (problèmes de réactifs, canaux bouchés...) cela peut entraîner une mauvaise quantification des sous-populations leucocytaires mais aussi un excès ou un défaut de déclenchement des alarmes-automate. Ce type de contrôle ne peut pas se substituer aux CQI mais il peut être utile pour suivre la stabilité des résultats et apporter une aide en cas d'anomalie sur les CQI.

Malgré tout il n'est pas toujours facile pour le personnel de comprendre et d'interpréter les résultats de ces méthodes de contrôle, c'est pourquoi elles ne sont pas utilisées en routine au laboratoire. Ces paramètres sont cependant très utiles à examiner en cas d'anomalie du CQI, permettant le cas échéant de valider ou non la série (dérogation).

### 2.4.1.3 Comparaison inter-laboratoires

#### 2.4.1.3.1 CQI externalisé

Cette évaluation permet de comparer les résultats des contrôles de qualité internes d'un laboratoire à ceux obtenus par d'autres laboratoires (« pairs »). Son utilisation permet une meilleure réactivité dans l'exploitation des CQI et permet une évaluation en continu de la justesse de la méthode analytique. A la différence des EEQ, l'utilisateur connaît les valeurs théoriques des CQI. Pour que cette confrontation ait toute sa valeur, l'utilisateur doit transmettre ses données brutes sans les modifier.

Le laboratoire vient d'installer le programme de CQI externalisé de Sysmex® (IQAS ONLINE). Les résultats individuels du laboratoire peuvent être visualisés sur le site internet du SNCS (Sysmex Network Communication System) après identification protégée spécifique du participant. Une visualisation au jour le jour, par mois ou par lot est proposé.

La justesse peut être évaluée par le SDI (Standard Deviation Index) aussi appelé z score. Une valeur proche de 0 traduit une absence de biais par rapport au groupe.

$$\text{SDI} = (\text{Moyenne labo} - \text{Moyenne du groupe}) / \text{Ecart type groupe de pairs}$$

La fidélité est évaluée par le PI (Indice de Précision), qui compare notre précision par rapport à celle du groupe de pairs.

$$\text{PI} = \text{écart-type automate} / \text{écart-type groupe de pairs}$$

Une valeur proche de un correspond à une performance équivalente au groupe de pairs. Une valeur inférieure à un correspond à une performance supérieure. Une valeur supérieure à un correspond à une performance dégradée.(37) Enfin une valeur supérieur à deux n'est pas acceptable et le paramètre ne devrait plus être rendu.

Les groupes de pairs sont constitués de « clients » utilisant le même type de contrôle sur des automates analogues. Un rapport mensuel est réalisé par le programme, comparant les résultats du contrôle interne de qualité du laboratoire à ceux des pairs.

ITEM	Control Lot	* YOUR LAB *				** GROUP TOTAL (YOUR METHOD) **					* TRUENESS *							* PRECISION *						
		MEAN	SD	CV	N	MEAN	TOTAL-SD	INTER-SD	INTRA-SD	LABS	SD1	3	-2	-1	0	1	2	3	PI	0	1	2	3	JUDGE
WBC	QC-42091101	3.065	0.0427	1.39	30	3.074	0.0749	0.0483	0.0572	519 L	-0.115	+	+	+	+	+	+	+	0.746	+	+	+	+	
	QC-42091102	6.736	0.0601	0.89	30	6.783	0.1352	0.0995	0.0914	565 L	-0.344	+	+	+	+	+	+	+	0.657	+	+	+	+	
	QC-42091103	16.281	0.0983	0.60	29	16.463	0.2876	0.2311	0.1712	354 L	-0.632	+	+	+	+	+	+	+	0.574	+	+	+	+	
RBC	QC-42091101	2.407	0.0220	0.91	30	2.377	0.0300	0.0234	0.0187	519 L	1.003	+	+	+	+	+	+	+	1.174	+	+	+	+	
	QC-42091102	4.492	0.0289	0.64	30	4.489	0.0521	0.0419	0.0309	565 L	0.071	+	+	+	+	+	+	+	0.935	+	+	+	+	
	QC-42091103	5.366	0.0305	0.56	29	5.445	0.0690	0.0549	0.0418	354 L	-1.153	+	+	+	+	+	+	+	0.729	+	+	+	+	
PLT	QC-42091101	6.19	0.039	0.63	30	6.16	0.074	0.057	0.047	519 L	0.340	+	+	+	+	+	+	+	0.833	+	+	+	+	
	QC-42091102	12.91	0.089	0.69	30	12.89	0.132	0.106	0.078	565 L	0.119	+	+	+	+	+	+	+	1.136	+	+	+	+	
	QC-42091103	16.40	0.058	0.35	29	16.64	0.175	0.134	0.112	354 L	-1.394	+	+	+	+	+	+	+	0.516	+	+	+	+	
HGB	QC-42091101	6.19	0.039	0.63	30	6.16	0.074	0.057	0.047	519 L	0.340	+	+	+	+	+	+	+	0.833	+	+	+	+	
	QC-42091102	12.91	0.089	0.69	30	12.89	0.132	0.106	0.078	565 L	0.119	+	+	+	+	+	+	+	1.136	+	+	+	+	
	QC-42091103	16.40	0.058	0.35	29	16.64	0.175	0.134	0.112	354 L	-1.394	+	+	+	+	+	+	+	0.516	+	+	+	+	

Figure 30: Extrait d'un rapport mensuel (09/2014) pour les GB, GR, Plaquettes et hémoglobine sur les 3 niveaux.

#### 2.4.1.3.2 EEQ

Tout comme le contrôle national de qualité (CNQ) réalisé par l'ANSM, l'évaluation externe de la qualité (EEQ) est une obligation légale pour l'ensemble des examens (L.6221-9/ L.6221-10). Les EEQ sont des contrôles ponctuels. Le laboratoire soumet le résultat d'un échantillon de concentration inconnue à un organisme indépendant permettant ainsi un contrôle de l'exactitude. L'objectif est donc d'évaluer a posteriori l'exactitude des résultats fournis et d'apporter la preuve de la fiabilité des résultats, mais il permet également d'évaluer la cohérence des résultats entre laboratoires.

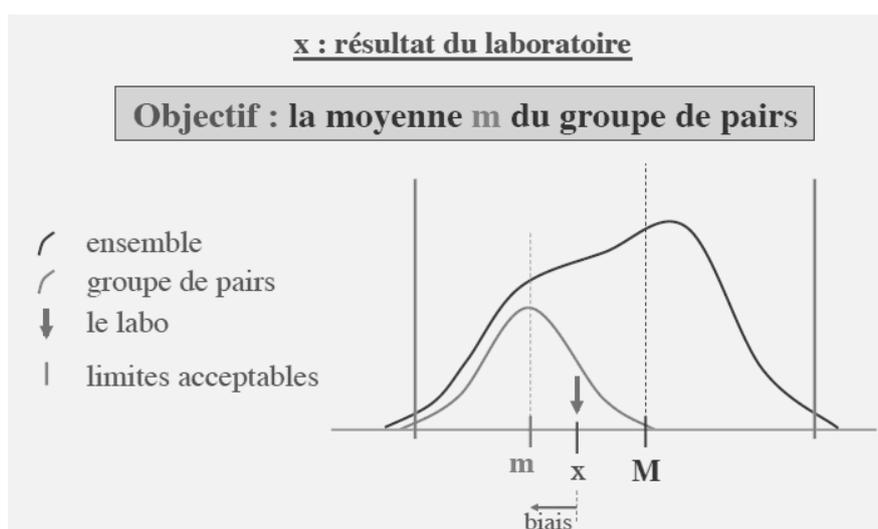
Il existe aujourd'hui plusieurs organismes d'EEQ pour l'hémogramme, pilotés par des industriels ou des associations (Bio-Rad, Eurocell, Biologie prospective, ProBioQual...). Le SH-INF-19(51) en présente la liste.

Le choix de l'EEQ doit prendre en compte certaines données comme le nombre de participants, le nombre d'enquêtes par an, la matrice des échantillons de contrôles utilisée, le délai de rendu des résultats et leur exploitation.

En ce qui concerne l'hémogramme automatisé, le laboratoire est actuellement abonné au programme ProBioQual® (centre lyonnais pour la Promotion de la Biologie et du contrôle de Qualité). L'abonnement à l'année comprend quatre enquêtes pour la numération seule avec deux niveaux de concentration pour chaque paramètre sur du sang stabilisé et deux enquêtes pour la numération formule et les réticulocytes sur un seul niveau mais avec du sang « frais ».

L'EEQ doit être traité comme un échantillon-patient, il est enregistré sur le SIL selon une identification bien définie, validé techniquement sur le middleware puis validé par le biologiste suivant le mode opératoire « gestion des EEQ ProBioQual en cytologie » (9240-MO-256). Une fiche de traçabilité est complétée pour chaque EEQ. Elle comporte la référence du contrôle, la date de réalisation, les noms du technicien et du biologiste qui ont réalisé l'analyse et validé le résultat, ainsi que l'identité des personnes qui ont envoyé les résultats à l'organisme externe.

Pour chaque enquête, un dossier est créé contenant le scan de la "fiche de suivi des contrôles ProBioQual" (9240-IM-126), le scan des CQI du jour de réalisation des analyses, le scan des résultats bruts des automates, le scan des résultats DxLab, le scan du résumé de la saisie du site web et bien entendu le rapport d'analyse et les fiches d'écart éventuelles. L'interprétation des données statistiques permet l'évaluation de l'exactitude estimée par le biais en %. Il doit être compris dans l'intervalle des limites acceptables (définies selon RICOS ou l'expérience acquise).



**Figure 31 : Interprétation EEQ (52)**

ProBioQual exprime ce résultat par une note qui est établie par un calcul de l'écart en % du résultat du laboratoire par rapport à la cible, et cette valeur est située dans une des classes définies en fonction des limites acceptables. La note est calculée à partir des limites

acceptables, elle ne dépend pas de la dispersion des résultats des laboratoires. Si le résultat est conforme cela signifie que l'erreur observée sur le résultat ne modifie pas son interprétation clinique.

Valeur cible  
↓

-X	-5	-4	-3	-2	-1	B-	TB	B+	+1	+2	+3	+4	+5	+X
Résultats non conformes						Résultats conformes		Résultats non conformes						

Figure 32: interprétation de la note donnée par le programme d'EEQ

L'intervalle dans les limites acceptables est divisé en ½ zones :

- B- (-1 à -0,5), TB (-0,5 à +0,5), B+ (0,5 à 1), résultats conformes

Au-delà des limites acceptables :

- 1/+1, -2/+2, -3/+3 (1, 2 ou 3 fois les LA)... résultats non conformes

L'exactitude peut être également exprimée par le calcul du Z-score avec l'interprétation correspondante. Cette expression en nombre d'écart-type indique l'écart entre le résultat du laboratoire et la moyenne du groupe de comparaison.

Signification du Z-score  
↓

-X	[-3	[-2	[-1	0	+1]	+2]	+3]	+X
Discordance avec les autres participants	alarme	accord avec les autres participants	parfait accord avec les autres participants		accord avec les autres participants	alarme	Discordance avec les autres participants	

Figure 33 : Interprétation du Z-score

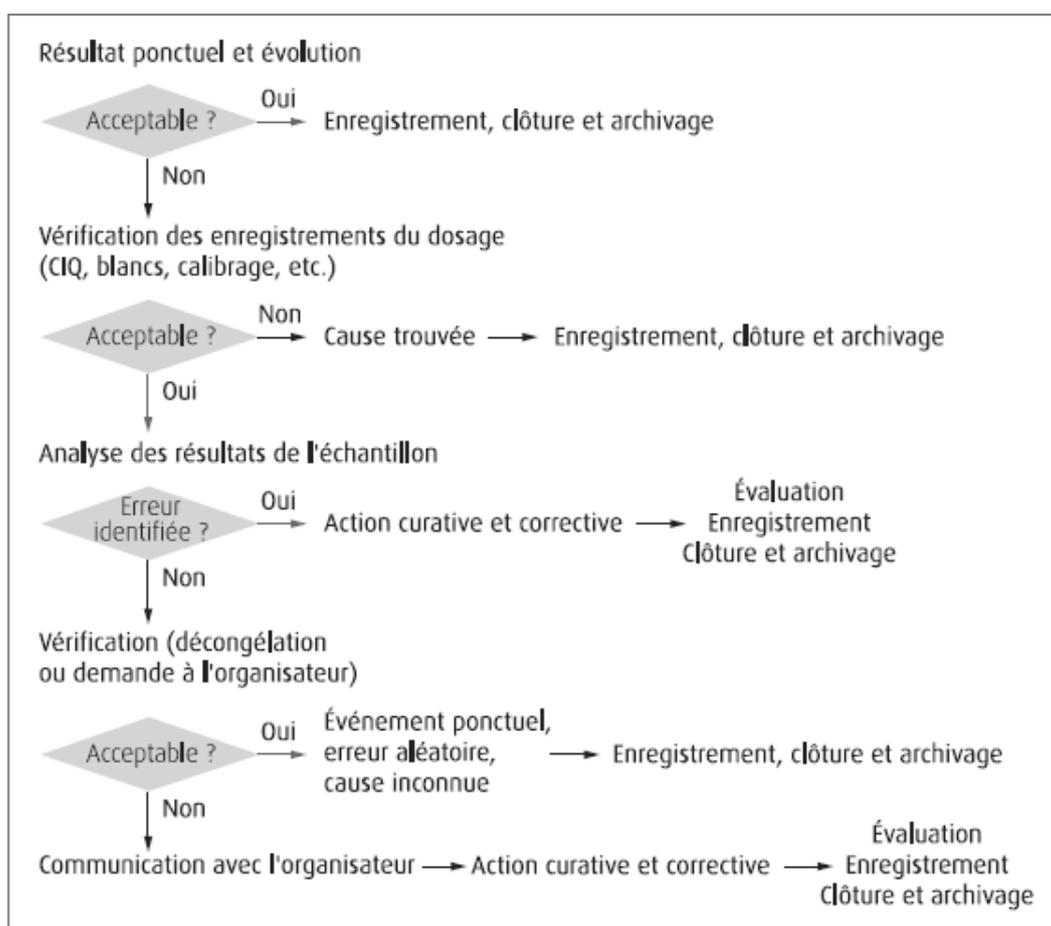
Le z-score est un indicateur de performance du laboratoire par rapport aux autres laboratoires. Elle prend en compte à la fois le biais d'exactitude du laboratoire et la dispersion inter-laboratoires (l'écart-type).

14HD01 / Leucocytes (G/L)		Limites acceptables à ± 7,3 % (Ricos optimal) Statistiques robustes (algorithme A - norme ISO 13528)					
Groupes techniques/pairs	Codage	Histogramme	n	Cible	CV	E/M%	Limites
ENSEMBLE DES RESULTATS	6		1013	24,62	4,5		22,82 - 26,42
				Note : TB	zscore 0,3		Biais 1,1%
SYSMEX	XX NK		454	24,31	4,2	-1,3	22,54 - 26,08
- dont XN 1000/2000/9000	XX NK9		74	24,58	2,9	-0,2	22,79 - 26,37
				Note : TB	zscore 0,4		Biais 1,3%

Figure 34 : Exemple : extrait d'un rapport d'EEQ ProBioQual pour les leucocytes.

La norme stipule que « le laboratoire doit surveiller les résultats des programmes de comparaison inter-laboratoires et participer à la mise en œuvre des actions correctives lorsque les critères de performance préalablement déterminés ne sont pas satisfaits » (chapitre 5.6.3). Ainsi pour chaque paramètre non conforme (z-score et/ou note), une "fiche d'écart EEQ non conforme" (9240-IM-127) est complétée, les causes seront recherchées, une étude d'impact pourra être réalisée avec la mise en place d'actions curatives et correctives.

Le rapport et les fiches d'écart EEQ non conforme sont ensuite diffusés par mail à l'ensemble des techniciens, internes et biologistes de cytologie.



CIQ : contrôle interne de qualité.

Figure 35 : Exemple d'analyse du rapport d'évaluation externe de la qualité (53)

A noter que les organismes d'EEQ sont considérés comme fournisseurs de services critiques et doivent être à ce titre évalués par le LBM (voir chapitre 4.6 de la norme).

#### 2.4.1.4 Calcul des incertitudes de mesures

Le laboratoire peut s'appuyer sur le SH GTA 14(17) qui définit des méthodes d'évaluation de l'incertitude de mesure (IM) pour pouvoir répondre à l'exigence de la norme NF EN ISO 15189 qui stipule que : "le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans les cas où cela est pertinent et possible. » (Chapitre 5.6.2)

A partir du moment où le résultat est le fruit d'une mesure, il est impacté d'une certaine inexactitude propre à la méthode. L'incertitude de mesure permet « de définir l'intervalle dans lequel se situe, avec une probabilité donnée (95% pour une distribution normale) la « valeur supposée vraie » du résultat que l'on communique »(54). Sa détermination ne peut s'appliquer qu'aux méthodes quantitatives.

La connaissance de l'incertitude est une aide pour le biologiste dans l'interprétation du résultat, par exemple quand on le compare à une antériorité où à un seuil décisionnel. Il peut aussi être une aide pour le médecin dans sa prise de décision diagnostique ou pour le suivi thérapeutique. Cependant pour ne pas surcharger le compte rendu de résultat les incertitudes n'y sont pas mentionnées mais comme le demande la norme « sur demande, le laboratoire doit remettre ses estimations de l'incertitude de mesures aux utilisateurs ».

Le calcul des incertitudes est d'autant plus robuste que l'on dispose de suffisamment de données (environ un an), cependant le laboratoire peut réaliser une évaluation provisoire sur une période plus courte. Il faut noter que certaines composantes de l'incertitude ne sont pas prises en compte dans ce type de calcul. C'est le cas par exemple des variations intra-individuelles, des variations pré-analytiques, de l'hémolyse....

Il existe plusieurs méthodes de détermination des incertitudes de mesure, le laboratoire a retenu la méthode CQI/EEQ qui repose sur l'exploitation de données de contrôles internes et externes.

L'incertitude composée  $u(C)$  :

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

- $u(CQI)$  représente l'estimation de la variabilité des résultats du CQI pendant une période donnée.

$$u(CQI) = \frac{CV \times moyenne}{100}$$

- $u(EEQ)$  = Incertitude du à la justesse réaliser à partir de plusieurs résultats d'EEQ :

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

- $\sigma E$  = Ecart-type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur cible de l'EEQ.

$$\sigma E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n - 1}}$$

- $\bar{E}$  = moyenne des écarts entre les valeurs du laboratoire et la valeur cible

$$\bar{E} = \frac{\sum_i (\text{Valeur labo} - \text{Valeur cible})}{n(\text{nbr de mesure})}$$

L'incertitude élargie (k=2) pour un intervalle de confiance de 95%:

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

Exemple appliqué à l'hémoglobine sur l'automate XN3:

Hb	Référence EEQ	Résultat labo (g/dL)	Moyenne Groupe de pairs	Moyenne toute technique	z-score	Biais limite (%) Ricos	Biais %	(Valeur labo - Valeur cible)	$\bar{E}$	$\sigma E$
Niveau 1	14HD02	6,00	5,99	6,07	0,10	4,10	0,17	0,01	0,01	0,00
	14HD03	6,50	6,49	6,59	0,10	4,10	0,15	0,01		
Niveau 2	14HD01	14,60	14,75	14,64	-0,90	4,10	-1,02	0,15	0,14	0,12
	14HD04	13,80	13,82	13,70	0,50	4,10	-0,14	0,02		
	14HDF3	11,90	12,15	12,15	-1,00	4,10	-2,06	0,25		

Tableau 47 : Résultat d'EEQ classé par niveau

Hb	Moyenne	CV%	ET = $u(CIQ)$
Niveau 1 lot-40411101	5,78	0,66	0,04
Niveau 2 lot- 40411102	12,01	0,53	0,06

Tableau 48 : Résultat CQI (ceux de la vérification de méthode initiale) donc n=30

Exemple de calcul de l'incertitude pour le niveau bas :

$$u(EEQ) = \sqrt{\left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}}\right)^2 + \sigma E^2} = \sqrt{\left(\frac{0,01}{\sqrt{3}}\right)^2 + 0,00} = 0,0058$$

$$u(C) = \sqrt{u^2(CQI) + u^2(EEQ)} = \sqrt{0,04^2 + 0,0058^2} = 0,0401$$

$$U = 2 \times u(C) = \mathbf{0,081}$$

Ainsi une hémoglobine rendue à 6.0 g/dL est en fait comprise entre 5.92 et 6.08 g/dL.

	Incertitude de mesure niveau bas	Incertitude de mesure niveau moyen	Incertitude de mesure niveau haut
GR (T/L)	2.32 +/- 0.10		5.35 +/- 0.17
Hb (g/dL)	5.78 +/- 0.08	12.0 +/- 0.31	
GB (G/L)	3.01 +/- 0.14	6.8 +/- 0.38	16.19 +/- 0.80
Plaquettes (G/L)		234.57 +/- 30.55	542.37 +/- 25.56

**Tableau 49 : Incertitudes de mesure provisoire pour l'XN3**

La méthode étant installée depuis peu, le laboratoire ne dispose pas encore de suffisamment de données d'EEQ pour calculer toutes les IM à toutes les concentrations.

Au LBM, un logiciel sous format Excel aide au calcul de ces incertitudes. Les résultats des EEQ sont rapportés dans ce tableur en les classant par niveau. Il faudra attendre d'avoir suffisamment de résultats d'EEQ pour que les incertitudes ainsi calculées soient réellement significatives.

Il est également possible de calculer ces incertitudes en utilisant les résultats des CQI externalisés à la place des EEQ. Cependant le laboratoire n'a pas retenu cette méthode car elle fait appel exclusivement à des contrôles fournisseurs et de plus son utilisation biaise le calcul de l'incertitude en utilisant la moyenne des écarts entre les valeurs du laboratoire et celle du groupe de pairs, lissant ainsi les différences.

#### 2.4.1.5 Comparaisons inter-automates

Il s'agit d'une exigence de la norme ISO/EU/NF 15189 (chapitre 5.6.4), « le laboratoire met en place une comparaison entre les équipements employés pour la réalisation de mêmes analyses, non seulement initialement dans le cadre de la validation/vérification sur site de méthode, mais aussi à intervalles définis (ex. au quotidien à l'aide des contrôles de qualité ou de patients), pour s'assurer que les résultats sont comparables et prévenir des risques de dérive »(47)

##### 2.4.1.5.1 Comparaison des automates de la chaîne XN9000

Les trois automates de la chaîne sont comparés quotidiennement par l'intermédiaire des CQI. Etant donné que le choix a été fait de conserver les même cibles et limites quel que soit l'appareil, celles-ci sont identiques pour les trois analyseurs. Une fonctionnalité de la chaîne permet de superposer les résultats des CQI des différents automates permettant une vision globale et rapide. Les graphiques linéaires s'affichent dans des couleurs différentes pour chaque fichier QC.

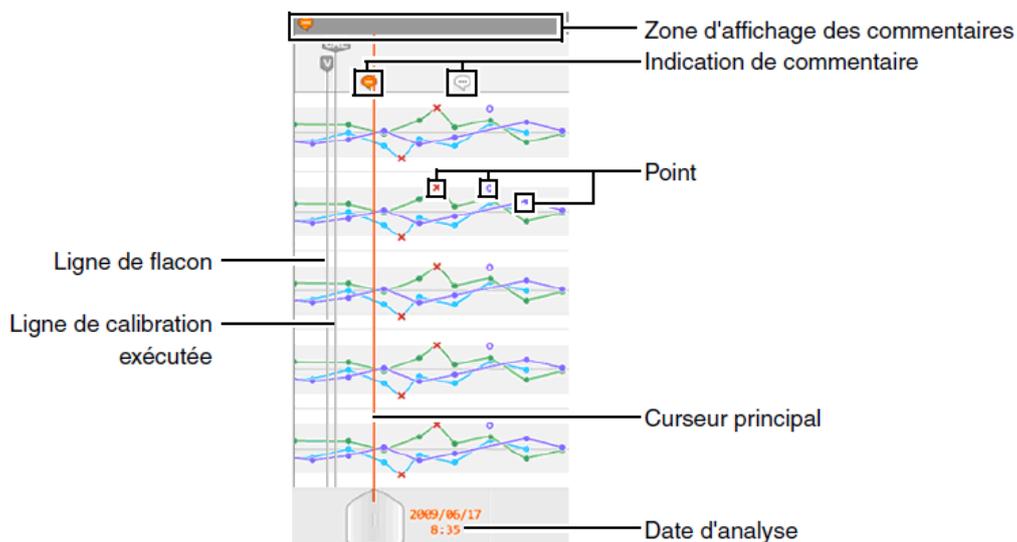


Figure 36 : Exemple d'écran d'affichage de comparaison des CQI extrait du manuel utilisateur de la chaîne Sysmex® (14)

#### 2.4.1.5.2 Comparaison des automates inter-sites

Le laboratoire dispose de deux sites (l'Hôtel-Dieu et l'HGRL) effectuant des numérations formules sanguines. Tous les automates sont de marque Sysmex® mais ils n'utilisent pas les mêmes CQI. Le laboratoire a donc mis en place une comparaison mensuelle inter-sites. Le site de l'Hôtel-Dieu sélectionne dix tubes et les ré-identifie à l'aide d'étiquettes prévues à cet effet. Les tubes sont ensuite passés sur un des automates de la chaîne puis envoyés sur le second site.

GB		Hb		Ht		Plaquettes		PNN		Ly	
G/L	n	g/dl	n	%	n	G/L	n	G/L	n	G/L	n
≤4	2	≤10	3	≤35	2	≤100	3	≤1.5	2		
≥10	2	≥14	2	≥45	1	≥400	2	≥8	2	>4	1

Tableau 50 : Tableau d'aide pour le choix des tubes de la comparaison inter-sites (9240-MO-255)

Les données des différents automates sont ensuite extraites et compilées sur un fichier Excel commun permettant la comparaison.

Echantillon	Analyseur XN					Analyseur XE					Ecart (%) analyseur XE par rapport à l'analyseur XN				
	GB	GR	Hb	Ht	PLQ	GB	GR	Hb	Ht	PLQ	GB	GR	Hb	VGM	PLQ
1	3,27	2,57	7,9	23,3	60	3,29	2,63	8	23,6	62	0,6	2,3	1,3	1,3	3,3
2	2,94	3,93	11,8	36,9	94	2,98	3,96	12,1	37,2	94	1,4	0,8	2,5	0,8	0
3	21,69	3,89	11,6	36,2	211	21,59	3,92	11,8	36,3	210	0,5	0,8	1,7	0,3	0,5
4	16,79	7,95	15,1	52,7	497	16,51	7,63	14,8	49,5	414	1,7	4	2	6,1	16,7
5	10,64	4,72	15	44,1	271	10,64	4,62	15,1	43,5	266	0	2,1	0,7	1,4	1,8
6	12,81	4,36	12,9	40,2	246	12,96	4,33	13,2	40,6	263	1,2	0,7	2,3	1	6,9
7	11,35	4,58	11,9	35,8	426	10,82	4,6	12	36	400	4,7	0,4	0,8	0,6	6,1
8	3,74	2,27	6,4	18,8	184	3,48	2,3	6,5	19	173	7	1,3	1,6	1,1	6
9	3,64	2,51	9,7	29,1	333	3,62	2,6	9,7	30,3	333	0,5	3,6	0	4,1	0
10	2,57	3,89	10,2	32,3	155	2,75	3,92	10,3	32,3	153	7	0,8	1	0	1,3

**Tableau 51 : Extrait comparaison inter-sites 05/2014**

Le biologiste du site de l'HGRL interprète ensuite les résultats. Si l'ensemble des différences est conforme aux limites fixées alors la corrélation inter-sites est validée. Si l'ensemble des paramètres sont non-conformes, il faut rechercher la cause et éventuellement déclencher le SAV. Pour les situations intermédiaires, des contrôles pourront être réalisés sur de nouveaux échantillons.

#### 2.4.1.6 Gestion des ré-analyses

Pour la validation analytique le LBM doit définir des règles de contrôle d'un résultat, celles-ci ont été énumérées précédemment avec les règles d'expertises (exemple ré-analyse des hémoglobines inférieur à 8 g/dl). Mais le LBM doit également définir des critères d'acceptabilité pour ces ré-analyses. En effet une fois le contrôle effectué, le technicien doit pouvoir dire si le deuxième résultat obtenu est significativement différent du premier ou non. Pour cela, on peut utiliser la règle énoncé dans la norme NF ISO 5725-6(55) qui stipule que la différence entre deux résultats doit être inférieur à 2.8 fois l'écart-type de la fidélité intermédiaire (FI). Afin de simplifier cette démarche dans la pratique quotidienne, le LBM a décidé de gérer automatiquement ces re-dosages grâce au middleware utilisé pour la validation technique. Celui-ci propose de rentrer pour chacun des paramètres un % de différence maximum toléré entre deux résultats. En cas de différence significative, un symbole ≠ apparaît sur l'écran de validation à côté du paramètre concerné. Le middleware ne peut gérer qu'une seule donnée par analyse, on ne peut donc pas adapter celui-ci au niveau de concentration. Une proposition de critères de repasse a été élaboré à partir des

données de la FI de la méthode et de celle de référence. Ces critères seront prochainement mis en place.

Paramètres	2,8 x CV FI Ricos souhaitable %	2,8 x CV FI Ricos minimal %	2,8 x moyenne CV FI tous niveau	2,8 x moyenne CV FI niveau 1	Proposition de critère d'acceptation des re-analyses (%)
GR	4,48	6,72	1,90	2,18	<b>4,0</b>
IDR	4,9	7,35	1,73	1,58	<b>4,0</b>
Ht	3,78	5,67	2,46	2,49	<b>4,0</b>
Hb	3,99	5,985	1,67	2,18	<b>4,0</b>
PLT Impédance	12,74	19,11	9,77	18,88	<b>20,0</b>
PLT fluo	12,74	19,11	5,27	8,33	<b>10,0</b>
GB	15,96	23,94	4,04	4,84	<b>5,0</b>
Ly	14,28	21,42	9,78	11,03	<b>15,0</b>
PN	23,94	35,91	8,00	10,49	<b>15,0</b>
Mono	24,92	37,38	18,40	21,32	<b>25,0</b>
PNE	29,4	44,1	22,07	20,80	<b>25,0</b>
PNB	39,2	58,8	8,25	9,24	<b>40,0</b>
Réticulocytes	15,4	23,1	9,75	8,19	<b>15,0</b>
EB			16,64	26,54	<b>25,0</b>
IG			10,81	11,76	<b>15,0</b>
plaquetocrite	16,66	24,99	6,66	8,15	<b>10,0</b>

Tableau 52 : Critères d'acceptation des ré-analyses

#### 2.4.2 Garantir la qualité de la formule manuelle

La garantie de la qualité d'une méthode qualitative est multifactorielle. Elle fait appel à différents points qui ont été développés précédemment. En effet le maintien de la qualité demande la maîtrise continue (45) :

- Du maintien des compétences du personnel
- Des équipements (colorateurs, microscope)
- De l'échantillon primaire (qualité étalement, stabilité)
- De de la méthode (mise à jour des différents modes opératoires)
- Des réactifs (colorants).

Mais il repose également sur la mise en place de CQI (confrontations cytomorphologiques) et d'EEQ (Association de biologie praticienne). Les incertitudes de mesures pourront être calculées quand on disposera de suffisamment de données de confrontations internes cytomorphologiques.

## Conclusion et perspectives

L'accréditation des LBM est aujourd'hui une démarche obligatoire qui présente de nombreuses contraintes mais qui comporte beaucoup d'avantages pour l'amélioration de la qualité des résultats en apportant la preuve des compétences techniques et organisationnelles du laboratoire.

Le LBM doit mettre en place des dispositions pour répondre aux exigences normatives. Pour cela, il peut s'appuyer sur les référentiels édités par le Cofrac et sur les données de la littérature. La mise en place de cette nouvelle « culture » qualité demande l'implication de l'ensemble du personnel et il est nécessaire de définir clairement les responsabilités.

L'accréditation apporte une plus grande rigueur dans les méthodes de travail et dans l'organisation et permet d'homogénéiser les pratiques professionnelles et de pouvoir ainsi assurer en permanence la même qualité de rendu des résultats. La qualité doit avant tout être utile au patient, réaliste, pratique et efficace. Il faut éviter le piège de la sur-qualité, coûteuse, démotivante et souvent néfaste et ne pas perdre de vue ce qu'il y a de plus important à savoir le service rendu au patient.

L'accréditation en hématologie cytologie présente certaines difficultés inhérentes à la discipline. Les spécificités techniques font appel à des méthodes automatisées standardisées relayées si besoin par des méthodes manuelles. De plus, en hématologie, on valide des analyses, comme la numération formule, qui regroupent de nombreux paramètres étroitement liés.

Dans ce travail je me suis intéressée aux dispositions que le laboratoire doit mettre en place pour maîtriser la phase analytique de réalisation de l'hémogramme, indispensable pour avoir confiance dans la validité des résultats. Cette maîtrise passe tout d'abord par la vérification des méthodes qui est une exigence forte de la norme et qui permet d'acquérir une bonne connaissance des méthodes d'analyses utilisées, de leurs performances et de leurs limites. La suite logique est la mise en place des moyens nécessaires pour garantir la pérennité des performances tout au long de l'utilisation de ces méthodes. Une partie de la solution réside dans la mise en place et la gestion de contrôles de qualité internes et externes. Le contrôle de cette phase analytique passe également par la maîtrise des

processus supports transversaux comme les systèmes informatiques aujourd'hui omniprésents dans l'activité des LBM ou bien la gestion des habilitations et du maintien des compétences du personnel élément critique en particulier lorsqu'il s'agit du contrôle des frottis sanguins au microscope.

Pour parvenir à ce but il a fallu s'appuyer sur les documents officiels (norme, référentiels...) mais aussi sur le système global de management de la qualité mis en place par la cellule qualité du pôle de biologie, qui depuis plusieurs années fournit des documents facilitant la mise en œuvre de la démarche qualité et permet une harmonisation des pratiques dans les différents secteurs du LBM.

Ce travail s'est donc principalement intéressé aux exigences techniques de la norme (chapitre 5) appliquées à la phase analytique de la NFS. La partie concernant les exigences relatives au management n'a été que partiellement survolée et les phases pré- et post-analytique n'ont pas été traitées. Le laboratoire a bien avancé mais doit continuer dans la mise en place de ces processus. Il devra mettre en œuvre les moyens nécessaires à l'évaluation du système de management de la qualité, notamment avec les relevés des indicateurs qualité choisis par le groupe qualité, mais aussi dans la gestion des événements indésirables et des non-conformités, en sensibilisant l'équipe à leur déclaration et en mettant en place une cellule d'analyse des fiches d'évènement indésirable (CAFEI). La réalisation d'audits internes est également un élément clé qui a déjà commencé dans le service avec la réalisation d'un audit sur l'évaluation des analyses au poste d'hématologie cellulaire et un autre prochainement sur le système documentaire. Enfin le service devra procéder à des revues de direction régulières au moins annuellement dans le but de vérifier que le système de management de la qualité est toujours pertinent, adéquat et efficace et qu'il concourt aux soins prodigués aux patients.

La présentation de l'hémogramme à la prochaine visite Cofrac n'est donc que le début du processus d'accréditation pour le secteur d'hématologie cytologie, d'autres suivront et pas des moindres avec l'accréditation du myélogramme ou encore de la cytologie des liquides de ponctions qui font appel à des méthodes essentiellement qualitatives pour lesquels la mise en place de contrôle qualité n'est pas toujours facile. Le personnel du laboratoire devra maintenir la dynamique d'amélioration commencée et s'approprier pleinement le système de management de la qualité.

# Annexe I : Organigramme du laboratoire

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

<b>Direction biologie</b>  <b>Pr Patrick LUSTENBERGER</b> <i>Directeur médical</i>  <b>Isabelle BERARD</b> <i>Cadre administratif</i>  <b>Marie-Paule MELLERIN</b> <i>Cadre supérieur</i>   <i>Cellule qualité</i> <b>Valérie LE PAGE</b> <i>Responsable Management Qualité</i>  <b>Florent KRASKE</b> <i>Assistant Qualité</i>  <b>Pascal VERDIER</b> <i>Biologiste, référent validation de méthode</i>	<b>service : HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE</b>		<b>Chef de service : Pr Marie-Christine BÉNÉ PU PH</b>		
	<b>Site : Hôtel Dieu</b>		<b>Cadre de santé : François CARCOUËT</b>		
	<i>Responsable qualité</i> <b>Elodie BOISSIER</b>  <i>Responsable Informatique</i> <b>Marc FOUASSIER</b>  <i>Responsable métrologie</i>	UF 9104 / Cytologie <b>Soraya WUILLEME, PH</b> <i>Responsable</i>  <b>Marion EVEILLARD, PHC</b> <b>Yannick LE BRIS, AHU</b> <b>Sophie NION, ATT (0.2)</b> <b>Elisabeth LETARD, ATT (0.1)</b> <b>François SUBIGER, ATT (0.1)</b>  <b>Claire AUDEBERT</b> <b>Marine CARL</b> <b>Alexis CHARPENTIER</b> <b>Myriam CHEVALIER</b> <b>Samuel CONTAMINE</b> <b>Elodie DUCLOUX</b> <b>Sandrine GRIMAUT</b> <b>Marie-France LE GOFF</b> <b>Stéphanie ROCUET</b> <b>Aline ROCHERIOUX</b> <b>Khadija VIAU</b>	UF 9103 / Hémostase <b>Marc TROSSAERT, PH</b> <i>Responsable</i>  <b>Marc FOUASSIER, PH</b> <b>Marianne SIGAUD, PH</b> <b>Catherine TERNISIEN, PH</b> <b>Assori ITOUAN GAPORO, AS</b>  <b>Catherine BADAUD</b> <b>Emmanuelle CADOR</b> <b>Gwennaëlle CHOLLET</b> <b>Nathalie DELANOE</b> <b>Pauline HENSEVAL</b> <b>Nathalie LE COQ</b> <b>Anne-Sophie LUQUET</b> <b>Catherine VEINSTEIN</b>  UF 9106 / Culture cellulaire <b>Sylvie HERMOUET MCU PH</b>	UF 9107 / Cytométrie Flux <b>Marie-Christine BÉNÉ PUPH</b> <i>Responsable</i>  <b>Soraya WUILLEME, PH</b> <b>Marion EVEILLARD, PHC</b> <b>Yannick LE BRIS, AHU</b> <b>Nelly ROBILLARD, IH</b>  <b>Yves GARREAU</b> <b>Christophe GUILLEVIN</b> <b>Alexia MERLOZ</b> <b>Caroline PANNETIER</b>  UF 9311 / Tumorothèque <b>Laurence LODE, PH</b> <i>Responsable</i>  <b>Réjane DOUAUD</b> <b>Olivia NAGEL</b> <b>Anne PORTUGAL</b>	UF 9161 / Bio. moléculaire <b>Laurence LODE, PH</b> <i>Responsable</i>  <b>Audrey MENARD, IH</b>  <b>Laetitia AUBERT</b> <b>Marie-Christine BOURSIER</b> <b>Véronique CHENAIS</b> <b>Fabienne PERRAULT</b> <b>Amandine SEBIE</b>  UF 9161/ Cytogénétique <b>Catherine GODON, PH</b> <i>Responsable</i>  <b>Olivier THEISEN, PHC</b>  <b>Pierre-Yves BRUNEAU</b> <b>Nadège COLIN</b> <b>Axelle DAVIET</b> <b>Audrey MOREL</b> <b>Hélène VAN OOST-MASSON</b>
	<b>Site : HGRL</b>		<b>Cadre de santé : François CARCOUËT</b>		
UF 9302 / Cytologie - Hémostase <b>Elodie BOISSIER, ATT</b> <i>Responsable</i>  <b>Simone BONNET</b> <b>Nathalie LOQUAI</b> <b>Françoise OERTLIN</b> <b>Fanny LENOBLE</b> <b>Véronique VAILLANT</b>		UF 9227 / Unité Mixte de Génomique du Cancer <b>Stéphane MINVIELLE, DR</b> <b>Florence MAGRANGEAS, IH</b>  <b>Elise DOUILLARD</b> <b>Nathalie ROI</b>			

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

## Annexe II :

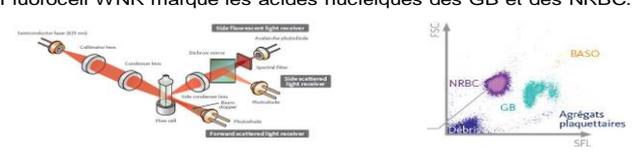
Intervalles de référence des paramètres de la numération formule en fonction de l'âge :

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

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

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

## Annexe III : Rapport de validation provisoire des globules blancs :

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

#### 4- EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

##### REPETABILITE XN 3 (13622)

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

**Conclusions :**

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

##### REPETABILITE XN 2 (13621)

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

**Conclusions :**

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

##### REPETABILITE XN 1 (13620)

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

**Conclusions :**

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

##### FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE 13622 (XN3)

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

**Conclusions :**

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

##### FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE 13621 (XN2)

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

**Conclusions :**

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

##### FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE 13620 (XN1)

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

**Conclusions :**

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

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

<u>INCERTITUDES_XN1(13620)</u> (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :			
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	CIQ + EEQ		
Quantification de l'incertitude Niveau 1	3,05 +/- 0,21	G/L	
Quantification de l'incertitude Niveau 2	6,84 +/- 0,31	G/L	
Quantification de l'incertitude Niveau 3	16,31 +/- 0,42	G/L	
Interprétation :	Incertitude estimée à 7 % pour le niveau bas et inférieure à 5 % pour les deux autres niveaux		
<u>INCERTITUDES_XN2(13621)</u> (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :			
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	CIQ + EEQ		
Quantification de l'incertitude Niveau 1	3,01 +/- 0,14	G/L	
Quantification de l'incertitude Niveau 2	6,8 +/- 0,38	G/L	
Quantification de l'incertitude Niveau 3	16,19 +/- 0,80	G/L	
Interprétation :	Incertitude estimée à 5 % pour tous les niveaux.		
<u>INCERTITUDES_XN3(13622)</u> (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :			
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	CIQ + EEQ		
Quantification de l'incertitude Niveau 1	3,03 +/- 0,13	G/L	
Quantification de l'incertitude Niveau 2	6,84 +/- 0,22	G/L	
Quantification de l'incertitude Niveau 3	16,36 +/- 0,52	G/L	
Interprétation :	Incertitude estimée inférieure à 5 % pour chaque niveau		
<b>Conclusions :</b>			
Incertitudes comparables entre les différents modules de la chaîne.			

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

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

## Annexe IV : Formulaire de formation / habilitation des techniciens à la lecture de lame

 CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES	IMPRIME	Diffusion par : PHU 07 - Biologie - HEMATOLOGIE
	<b>Habilitation technicien à la lecture de lame</b>	
Processus : RSH-Gestion des ressources humaines\Formation		

Service d'hématologie UF 9240

Nom : Prénom : Date d'arrivée dans le service :
---

Responsable de l'unité : Cadre de santé
--

Actions	Tuteur	Vu le	Fait-le	Réalisé seul le
Utilisation / Entretien du microscope				
Lecture des modes opératoires				
<b>Cours théorique</b>				
Lecture d'un frottis sanguin : Recommandations (zones de lecture...) Cellules sanguines normales				
Etude morphologique des hématies				
<b>Lecture de lames (au moins 10 lames pour chaque cas)</b>				
Lecture de frottis normaux (adulte, nourrisson)				
Anomalies des plaquettes (morphologie et quantification)				
Comptage de schizocytes				
Comptage des érythroblastes et si besoin déduction des leucocytes				
<b>Lecture de lames d'archive ou de lames du jour pathologiques, avec un technicien sur un microscope multitêtes (une lame minimum par cellules anormales)</b>				
Anomalies des globules rouges (hématie cible, dacryocyte, hématie falciforme, paludisme, anisocytose, poïkilocytose, corps de Jolly...)				
Anomalies des polynucléaires neutrophiles (vacuolisation, dégranulation, corps de Döhle, segmentation anormale)				
Myélémie				
Lymphocytes activés				

Nom du technicien : \_\_\_\_\_

<b>Actions</b>	<b>Tuteur</b>	<b>Vu le</b>	<b>Fait-le</b>	<b>Réalisé seul le</b>
LGL				
Coqueluche				
Plasmocytes				
LLC (typique avec ombres de Gumprecht et atypique)				
Leucémie à Tricholeucocytes				
Cellules des autres LNH en phase leucémique				
Cellules de Sézary				
Syndrome myéloprolifératif				
Blastes LAM (avec corps d'Auer ou indifférenciés)				
Blastes LAL				
<b>Lecture en double avec un technicien habilité (au moins une semaine)</b>				
<b>Réalisation d'au moins 20 formules sanguines de façon autonome avec assistance ponctuelle d'un technicien habilité (10 frottis pathologiques minimum)</b>				
<b>Lecture de lames au microscope multitétes avec les biologistes (au moins une semaine)</b>				

**=> Commentaires :**

**• Validation habilitation technicien à la lecture de lames au microscope :**

<b>Biologiste (date et signature)</b>	<b>Cadre (date et signature)</b>	<b>Agent (date et signature)</b>

## Bibliographie :

1. Charrat N. Editorial, la qualité un concept vieux comme le monde. Actualité. Biologie & santé. 2007;7(1).
2. Martinez F. Les principes généraux de la qualité. Accréditation et Qualité des soins hospitaliers [Internet]. 2001 [cité 1 juin 2014]; Disponible sur: <http://www.hcsp.fr/hcspi/explore.cgi/ad351778.pdf>
3. Siegel D. Le diagnostic stratégique et la gestion de la qualité. Paris: L'Harmattan; 2004.
4. La ministre de la santé, de la jeunesse et des sports. Lettre de mission à Michel BALLEREAU [Internet]. 2008. Disponible sur: [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/lettre\\_de\\_mission\\_Michel\\_BALLEREAU.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/lettre_de_mission_Michel_BALLEREAU.pdf)
5. Lalande F, Laconde C, Yeni I. La biologie médicale libérale en France: bilan et perspectives [Internet]. Inspection générale des affaires sociales (IGAS); 2006 avr. Report No.: 2006 045. Disponible sur: [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport\\_IGAS\\_2006.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_IGAS_2006.pdf)
6. Ballereau M. Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale [Internet]. Paris, ministère de la Santé, de la Jeunesse, des Sports et de la Vie associative; 23 septembre 2008 . Disponible sur: [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_pour\\_la\\_biologie\\_medicale.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_pour_la_biologie_medicale.pdf)
7. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [Internet]. JORF n°0012 janv 15, 2010 p. 819. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&dateTexte=>
8. LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant sur la réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires [Internet]. 2009-879, JORF n°0167 juill 21, 2009 p. 12184. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020879475&categorieLien=id>
9. LOI n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant sur la réforme de la biologie médicale [Internet]. 2013-442, JORF n°0124 mai 30, 2013 p. 8954. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027478077&dateTexte=&categorieLien=id>
10. Afnor, NF EN ISO 15189:2012 - Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigence concernant la qualité et la compétence. 2012 sept.
11. COFRAC, section Santé humaine. SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012, révision 04 [Internet]. 2013. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>.
12. Responsable qualité. Manuel qualité du Laboratoire de Biologie Médicale et Environnementale du CHU de Nantes. 2013.
13. Organigramme qualité (7180-DI-071). Base documentaire qualité CHU Nantes; 2012.
14. Sysmex® corporation. Mode d'emploi - Série XN. 2010.
15. Lelievre C. Validation de méthodes qualitatives en continu. IXème journées professionnelles de l'AFTLM; 2012; Paris.

16. COFRAC, section Santé humaine. SH REF 08 Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 1 [Internet]. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
17. COFRAC, section Santé humaine. SH-GTA-14: Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>
18. COFRAC, section Santé humaine. SH-INF-50: Portées-types d'accréditation [Internet]. 2013. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-INF-50>
19. COFRAC, section Santé humaine. SH-GTA-04 : guide technique d'accréditation de vérification (Portée A) / validation (Portée B) des méthodes en biologie médicale. [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
20. Vassault A, Grafmeyer D, Graeve J de, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Annales de Biologie Clinique*. 24 nov 1999;57(6):685-95.
21. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. nov 1999;59(7):491-500.
22. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):758-64.
23. Scherrer F, Boisson RC, Cartier R, Cohen R, Eynard JC, Poggi B, et al. Réflexion sur le choix des limites acceptables dans les programmes d'évaluation externe de la qualité. *Ann Biol Clin (Paris)*. déc 2007;65(6):677-84.
24. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giraud C, groupe de travail SFBC. SG2-07: Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. Qualité et accréditation en biologie médicale - *Annales De Biologie Clinique*. 2010;68 (hors-série n°1):247-94.
25. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, et al. Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers: Platelet Counting by Fluorescent Dye Staining. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. sept 2014;28(5):341-8.
26. Tessier-Martreau A, Geneviève F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. [Automated hematology analysers and spurious counts. Part 1. Platelets]. *Ann Biol Clin (Paris)*. août 2010;68(4):393-407.
27. Geneviève F, Godon A, Martreau-Tessier A, Zandecki M. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 2. Leukocyte count and differential]. *Ann Biol Clin (Paris)*. avr 2012;70(2):141-54.
28. Godon A, Genevieve F, Martreau-Tessier A, Zandecki M. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes]. *Ann Biol Clin (Paris)*. avr 2012;70(2):155-68.
29. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E, international consensus group for hematology. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol*. 2005;11(2):83-90.
30. Geneviève F, Galois A.C, Mercier-Bataille D, Wagner-Ballon O, Trimoreau F, Fenneteau O, Schillinger F, Leymarie V, Girard S, Settegrana C, Daliphard S, Soenen-Cornu V, Cividin M, Lesesve J.F, Châtelain B, Troussard X, Bardet V. *Revue microscopique du frottis sanguin: proposition du GFHC*. mars 2014;LV(317):p7.

31. Barnett CW. THE UNAVOIDABLE ERROR IN THE DIFFERENTIAL COUNT OF THE LEUKOCYTES OF THE BLOOD. *J Clin Invest.* janv 1933;12(1):77-85.
32. Ruemke CL. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. *Triangle.* janv 1960;4:154-8.
33. CD-ROM « Das interaktive Handbuch der Hämatologie ».
34. Sysmex® corporation. Mode d'emploi - SP-10. 2012.
35. Emile C. Accréditation de la formule sanguine manuelle. *Option/Bio.* févr 2013;24(484):22-4.
36. Martin C, Thoinet S, Donnard M, Gachard N, Trimoreau F. Contraintes et opportunités pour l'accréditation de la formule sanguine au microscope. *Spectra biologie.* août 2013;(202):27-41.
37. Arnoux I, Loosveld M. Accréditation d'un laboratoire d'hématologie cytologie. *Feuillets de biologie.* juill 2012;LIII(307):49-59.
38. Sysmex. Monocyte counting: a comparison of manual and automated counting methods [Internet]. 2011. Disponible sur: [http://www.sysmex.co.za/files/articles/Xtra\\_online\\_Monocyte\\_counting.pdf](http://www.sysmex.co.za/files/articles/Xtra_online_Monocyte_counting.pdf)
39. Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol.* nov 2012;65(11):1024-30.
40. Hotton J, Broothaers J, Swaelens C, Cantinieaux B. Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters: Cell-Dyn Sapphire, DxH-800, and XN-2000. *Am J Clin Pathol.* déc 2013;140(6):845-52.
41. Lee EJ, Lee K, Kim M, Kim H-S, Kang HJ, Lee YK. Evaluation of the Sysmex XN-20 Complete Blood Count Analyser. *Journal of Laboratory Medicine and Quality Assurance.* 30 juin 2014;36(3):140-8.
42. Nguyen VTP, Vancles P, Rozen L, Noubouossie D, Demulder A. Évaluation de l'automate d'hématologie Sysmex XN-2000® pour une utilisation en routine : comparaison avec l'Advia 2120i®. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* avr 2013;28(2-3):125-32.
43. Trimoreau F, Gachard N, Leymarie V, Frébet E, Perroud P, Feuillard J. Étapes préanalytiques pour la numération et cytologie sanguine. Elsevier Masson [Internet]. 2011 [cité 4 nov 2014]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/297948/etapes-preanalytiques-pour-la-numeration-et-cytolo>
44. COFRAC, section Santé humaine. SH-GTA-02 : guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale. [Internet]. 2013. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-02>
45. COFRAC, section Santé humaine. SH-GTA-06 : Guide technique d'accréditation: contrôle de qualité en biologie médicale. [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
46. Klein J-P, Gorsy T. L'accréditation en hématocytologie: de la théorie à la pratique. *Revue Francophone des Laboratoires.* avr 2012;2012(441):75-89.
47. COFRAC, section Santé humaine. SH-GTA-01: Guide technique d'accréditation en biologie médicale. [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-01>

48. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem. mars 1981;27(3):493-501.
49. Sysmex® corporation. The 'XbarM control' program –use it wisely. 2010.
50. Bull BS, Elashoff RM, Heilbron DC, Couperus J. A study of various estimators for the derivation of quality control procedures from patient erythrocyte indices. Am J Clin Pathol. avr 1974;61(4):473-81.
51. COFRAC, section Santé humaine. SH-INF-19: liste des organisateurs d'évaluations externes de la qualité. [Internet]. 2014. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-INF-19>
52. Vassault A. Comparaison inter-laboratoire/ Evaluation externe de la qualité. 2014 janv 27; DU PARIS 6- Assurance qualité au LBM.
53. Arnaud J, Adjidé V, Vassault A, groupe de travail SFBC. SG2-05: Comparaison inter-laboratoires/ évaluation externe de la qualité. Qualité et accréditation en biologie médicale - Annales De Biologie Clinique. 2010;68 (hors-série n°1):227-36.
54. Vassault A. Incertitude de mesure [Internet]. [cité 14 nov 2014]. Disponible sur: [http://www.feuilletsdebiologie.fr/29\\_276\\_Incertitude-de-mesure.html?idAcc=10](http://www.feuilletsdebiologie.fr/29_276_Incertitude-de-mesure.html?idAcc=10)
55. Afnor, NF ISO 5725-6: application de la statistique exactitude (justesse et fidelite) des résultats et méthodes de mesure. Partie-6 utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude. 1994 déc.

## Liste des Figures

Figure 1 : Roue de Deming : cycle PDCA principe de l'amélioration continue (3) .....	14
Figure 2: Schéma du diagramme d'Ishikawa (5) .....	15
Figure 3: Evolution du concept de la qualité (6) .....	16
Figure 4: Sommaire du code la santé publique concernant la biologie médicale .....	23
Figure 5: Cycle de vie d'une accréditation (15) .....	25
Figure 6 : Représentation des différents points de la norme sous forme de cartographie des processus.....	28
Figure 7 : Représentation schématique du PHU-7 .....	31
Figure 8 : Organisation de la qualité au LBM du CHU de Nantes en 2014.....	32
Figure 9 : Organigramme qualité du LBM .....	35
Figure 10 : Organisation du laboratoire d'hématologie .....	38
Figure 11 : Chaîne XN-9000 (14).....	40
Figure 12 : Logigramme : processus de réalisation de la NFS .....	45
Figure 13 : Logigramme de vérification/Validation des méthodes (15).....	47
Figure 14 : Représentation schématique de la fidélité .....	57
Figure 15 : Représentation schématique de l'exactitude et de la justesse.....	61
Figure 16 : Comparaisons de méthodes effectuées.....	67
Figure 17 : Règles d'expertises établies : GR.....	71
Figure 18 : Règles d'expertises établies : leucocytes GB.....	72
Figure 19 : Règles d'expertises établies : Formule .....	72
Figure 20 : Règles d'expertises établies : plaquettes .....	72
Figure 21: Réalisation d'un frottis sanguin et choix de la zone de lecture (38) .....	78
Figure 22: Exemple droite de régression et diagramme des différences pour les monocytes.....	88
Figure 23 : Systèmes informatiques au laboratoire d'hématocytologie de l'Hôtel-Dieu.....	98
Figure 24 : Exemple de vérification de l'application de commentaires codés sur les différentes interfaces.....	101
Figure 25 : Logigramme de gestion des documents internes extrait de la procédure de gestion.....	106
Figure 26 : Comparaison sang d'un patient et sang de CQI .....	111
Figure 27 : Schéma représentant quelques règles de Westgard sous forme de carte de contrôle de type Levey-Jennings .....	114
Figure 28 : Proposition de conduite à tenir en cas de CQI non conforme .....	115
Figure 29 : Canal Diff .....	117
Figure 30: Extrait d'un rapport mensuel (09/2014) pour les GB, GR, Plaquettes et hémoglobine sur les 3 niveaux. ....	119
Figure 31 : Interprétation EEQ (52) .....	120
Figure 32: interprétation de la note donnée par le programme d'EEQ.....	121
Figure 33 : Interprétation du Z-score .....	121
Figure 34 : Exemple : extrait d'un rapport d'EEQ ProBioQual pour les leucocytes. ....	121
Figure 35 : Exemple d'analyse du rapport d'évaluation externe de la qualité (53).....	122
Figure 36 : Exemple d'écran d'affichage de comparaison des CQI extrait du manuel utilisateur de la chaîne Sysmex® (14).....	126

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Petit historique de la qualité avant l'avant la révolution industrielle (2) (1) .....	12
Tableau 2 : Chapitre 4 et 5 de la norme NF EN ISO 1589 version 2012 .....	27
Tableau 3 : Liste des documents COFRAC relatifs à l'accréditation des LBM (en gras les documents utilisés pour ce mémoire).....	30
Tableau 4 : Références bibliographiques ayant motivé le choix des intervalles de référence .....	46
Tableau 5 : la liste des paramètres mesurés et calculés pour les automates SYSMEX.....	50
Tableau 6 : Extrait du SH INF 50 (19).....	51
Tableau 7 : Description de la méthode pour la mesure des hématies, de l'hémoglobine et des leucocytes.....	52
Tableau 8 : Analyse de risque de l'héмограмme automatisé.....	53
Tableau 9 : Extrait du SH GTA 04 (20) .....	54
Tableau 10 : Objectifs analytiques proposés par Fraser à partir de la variabilité biologique (24) .....	56
Tableau 11 : Choix des limites acceptables.....	56
Tableau 12 : Tableau de synthèse des résultats de la reproductibilité pour les trois automates XN..	59
Tableau 13 : Moyenne des PNE et PNB du sang frais .....	59
Tableau 14 : Tableau de synthèse des résultats de la fidélité intermédiaire pour les trois automates XN .....	60
Tableau 15 :Exemple1 : tableau de synthèse des résultats de l'exactitude pour les leucocytes sur le XN3. ....	63
Tableau 16 : Exemple2 : tableau de synthèse des résultats de l'exactitude pour les plaquettes en impédance sur le XN3.....	63
Tableau 17 : exemple pour les leucocytes .....	65
Tableau 18 : Limites de quantification retenues pour les paramètres testés sur les automates XN ...	65
Tableau 19 : Tableau de synthèse des résultats des tests de contamination effectués.....	66
Tableau 20: Tableau d'aide à la sélection des échantillons pour les comparaisons de méthode .....	68
Tableau 21 : Résultats de la comparaison entre l'automate XN3 et l'automate XN2 .....	69
Tableau 22 : Résultats de la comparaison PLT-I/PLT-F sur le XN2 .....	69
Tableau 23 : Tableau de synthèse de la vérification des calculs des paramètres non mesurés .....	70
Tableau 24 : Règles d'expertise lors de l'enregistrement des demandes.....	75
Tableau 25 : Extrait du SH INF 50(23) « portées- types d'accréditation » .....	76
Tableau 26 : Description de la méthode de la formule sanguine manuelle .....	77
Tableau 27 : Table de Rümke (34).....	78
Tableau 28 : Maîtrise des risques du processus analytique de la formule manuelle .....	80
Tableau 29 : Extrait du SH-GTA-04 (20).....	81
Tableau 30 : Pour 100 cellules comptées : Table de Rümke extrapolée (37) .....	83
Tableau 31: Tableau récapitulatif de l'évaluation de la répétabilité pour la formule manuelle .....	84
Tableau 32 : Résultats de la répétabilité.....	85
Tableau 33 : Justesse « moyenne » de l'ensemble du laboratoire .....	86
Tableau 34 : Tableau récapitulatif de l'évaluation de l'exactitude grâce aux EEQ.....	87
Tableau 35 : Synthèse des résultats de la comparaison de la formule automate/microscope .....	88
Tableau 36 : Alarmes automates XN-10.....	89
Tableau 37 : Résultats EEQ ABP 2013 .....	90
Tableau 38 : Exemple de résultat de confrontation cytomorphologique .....	91
Tableau 39 Commentaires codés utilisés au laboratoire d'hématocytologie.....	93

Tableau 40 : Exemple de confrontation cytomorphologique interne à partir d'une lame de contrôle ABP .....	97
Tableau 41 : Codes tests associés à des commentaires relatifs à la numération formule sanguine ..	100
Tableau 42 : Liste des documents d'hématocytologie relatifs au processus analytique de la NFS applicables sur le site de l'Hôtel-Dieu. ....	108
Tableau 43 : Complémentarité des contrôles de qualité (47).....	110
Tableau 44 : Tableau Stratégie de passage des CQI.....	112
Tableau 45 : Exemple de règles d'interprétation dans le SH-GTA-06(50) à partir des règles de Westgard .....	114
Tableau 46 : Résultat d'EEQ classé par niveau.....	124
Tableau 47 : Résultat CQI (ceux de la vérification de méthode initiale) donc n=30 .....	124
Tableau 48 : Incertitudes de mesure provisoire de l'XN3 .....	125
Tableau 49 : Tableau d'aide pour le choix des tubes de la comparaison inter-sites (9240-MO-255)	126
Tableau 50 : Extrait comparaison inter-sites 05/2014 .....	127
Tableau 51 : Critères d'acceptation des ré-analyses.....	128

---

**Nom - Prénoms :** BRANGER Marine

**Titre de la thèse :** Démarche qualité en hématologie : application à la maîtrise du processus analytique de la numération formule sanguine.

---

**Résumé de la thèse :**

L'accréditation des laboratoires d'analyse médicale (LBM) est depuis l'ordonnance du 13 janvier 2010 une démarche obligatoire, qui présente de nombreuses contraintes mais qui comporte beaucoup d'avantages pour l'amélioration de la qualité des résultats en apportant la preuve des compétences techniques et organisationnelles du laboratoire.

Dans le cadre de la présentation par le laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes de l'hémogramme à l'accréditation, ce travail a porté sur les dispositions que le service doit mettre en place pour maîtriser le processus analytique de cette analyse. Cette maîtrise passe tout d'abord par la vérification des méthodes qui est une exigence forte de la norme et qui permet d'acquérir une bonne connaissance des méthodes d'analyses utilisées, de leurs performances et de leurs limites. Il faut ensuite mettre en place les moyens nécessaires pour garantir la pérennité des performances tout au long de l'utilisation de ces techniques. Il faut y ajouter la maîtrise des processus supports transversaux comme les systèmes informatiques aujourd'hui omniprésents dans l'activité des LBM ou bien la gestion des habilitations et du maintien des compétences du personnel, éléments majeurs en particulier pour les méthodes manuelles comme le contrôle des frottis sanguins au microscope.

---

**MOTS CLÉS :** ACCREDITATION, HEMMOGRAMME, VALIDATION DE METHODE, QUALITE

---

**JURY**

**PRÉSIDENT :** Mr Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie.  
Faculté de pharmacie de Nantes.

**ASSESEURS :** Mme Marie-Christine BENE, Professeur d'Hématologie.  
Faculté de médecine de Nantes.

Mr Marc MAYNADIE, Professeur d'Hématologie.  
Faculté de médecine de Dijon.

Mme Soraya WUILLEME, Praticien Hospitalier.  
Laboratoire d'hématologie CHU de Nantes.

Mr Pascal VERDIER, Praticien Hospitalier.  
Laboratoire du CHU de Nantes.

Mlle Marion EVEILLARD, Praticien Hospitalier.  
Laboratoire d'hématologie CHU de Nantes.

---

**Adresse de l'auteur :** 8 rue Frédéric Caillaud, 44000 Nantes