UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : **2015** **2015 TOU3 2069**

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

Mémoire du DIPLÔME d'ÉTUDES SPÉCIALISÉES de BIOLOGIE MÉDICALE
(Conformément à l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement

par

Alice TACHOIRES

le 12 octobre 2015, à Limoges

VALIDATION INITIALE ET SUIVI CONTINU DES PERFORMANCES DES MÉTHODES QUANTITATIVES ET QUALITATIVES RELATIVES AU MYÉLOGRAMME

Directeur de thèse: Franck Trimoreau

JURY

Président : Mme le Professeur Sylvie Rogez
1er assesseur : M. le Docteur Franck Trimoreau
2ème assesseur : Mme le Maître de Conférences Françoise Esclaire
3ème assesseur : M. le Professeur Jean Feuillard

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2014

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUAJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAEVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. OLICHON A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PHILIBERT C	Toxicologie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C (**)	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
M. PÉRES M. (**)	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1er novembre 2014

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Sylvie Rogez, de me faire l'honneur de présider ce jury. Croyez en mes plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Françoise Esclaire, un grand merci pour avoir accepté de juger mon travail. Soyez assurée de mon profond respect et de ma considération.

A Monsieur le Professeur Jean Feuillard, merci pour vos conseils avisés et votre accueil au sein du service. Je vous remercie de bien avoir voulu juger mon travail.

A Monsieur le Docteur Franck Trimoreau, d'avoir accepté de diriger ma thèse et de m'avoir transmis le goût de l'hématocytologie. Je vous remercie pour votre sympathie, votre grande disponibilité et votre aide tout au long de cette thèse.

A Sophie Dupuy et Claire Bernard. Votre aide au cours de la réalisation de cette thèse m'a été très précieuse. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Merci à Estelle et Jasmine qui ont spontanément participé à la lecture des premiers CIQ myélogrammes du laboratoire.

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

Un grand merci à mes co-internes Thibault, Marine et Florian qui m'ont bien aidé pour ces fameux CIQ myélogrammes !!!

A mes parents et ma sœur Lucille, merci pour votre patience et votre indéfectible soutien pendant toutes ces années d'études (10 ans ce n'est pas rien !).
A ma famille (mamie, parrain, marraine, Cécile, Sophie…), j'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés.

A mes deux meilleurs et plus vieux amis d'enfance, Thomas et Angélique !!!Angélique mon binôme de choc depuis le lycée, nos TP de chimie orga et de galénique étaient magiques et surtout pas racontables !! Thomas mon plus vieil ami depuis la maternelle, presque 25 ans d'amitié ça commence à faire ! Mais ce n'est que le début de notre vie d'adulte : oui oui nous sommes encore jeunes.

A Jessica, mon coup de cœur amical de l'internat. Nos discussions entre filles, notre coloc de folie, les soirées internats, les restos limougeauds que nous avons quasiment tous fait.... sont de merveilleux souvenirs !!

A mes amis limougeauds et biologistes préférés Batiste, Marianne et Elsa !! Nous n'avons passé qu'une année tous ensemble, mais nous sommes bien partis pour être amis pour la vie !! Et un grand grand grand merci à Marianne pour ton aide précieuse sur la mise en page de la thèse, je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi !!!!

A Lauriane, nous avons passés nos études de pharmacie à nous croiser sans vraiment nous connaître. Donc merci à Limoges de m'avoir fait découvrir une super copine toujours dispo pour rigoler, s'amuser et se raconter les derniers potins.

A Célia, Adam, Claire, Carine, Marie, Sarah, Julien, Marmotte alias Gaelle et tous les autres dont j'ai oublié de citer le prénom et qui m'ont accompagné durant ces quatre années d'internat qui resteront gravées dans ma mémoire.

A Fabien, j'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés. Merci pour ta patience surtout ces derniers mois et évidemment pour ton soutien (« et la réa tu crois que c'est pas dur?!! »), qui finalement m'a fait relativiser lol.

SOMMAIRE

Liste des abréviations 8

Introduction 9

Première partie : généralités 10

I. Définition d'une validation/vérification de méthode 10

II. Guides Cofrac nécessaires pour une validation-vérification de méthode 10

1. SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale » (7) et SH REF 02 révision 04 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 » (8) 11

2. SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » (9) et SH INF 50 « Portée type d'accréditation » (10) 12

3. SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) - validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (11) 12

4. SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale » (12) 13

5. SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale » (13) 13

III. Présentation des étapes d'une validation de méthode initiale 14

1. Expression de la portée d'accréditation 14

2. Choix de la portée : A ou B 16

3. Choix d'une portée flexible 16

4. Analyses quantitatives/qualitatives et choix du processus 18

5. Contenu d'un dossier de vérification/validation de méthode 18

6. Vérification expérimentale d'une méthode (portée A) 23

7. Vérification bibliographique d'une validation de méthode (portée A) 30

IV. Confirmation des performances en routine 31

1. Les contrôles de qualité en biologie médicale 32

2. Suivi des performances pour les méthodes de type quantitatif 34

3. Suivi des performances pour les méthodes de type qualitatif 35

Deuxième partie : objectifs 37
Troisième partie : méthodes et résultats 39
I. Validation d'une méthode relative à une formule manuelle 39
1. Méthode qualitative ou quantitative ? 39
2. Portée A ou B ? 39
II. Validations de méthodes initiales : paramètres qualitatifs 40
1. Objectif - domaine d'application 40
2. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire de la méthode 40
3. Vérification bibliographique 46
4. Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier 47
5. Résultats-interprétation 48
6. Conclusion 66
III. Validations de méthodes : paramètres quantitatifs 67
1. Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier 67
2. Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier 67
3. Vérifications bibliographiques 68
4. Plan d'expérience et mise en œuvre au laboratoire 70
5. Résultats, interprétation 70
6. Conclusion 76
IV. Confirmation des performances en pratique quotidienne 77
Quatrième partie : discussion 78
Conclusion 82
Références bibliographiques 83
Table des matières 87
Tables des illustrations 90
Table des annexes 90
Serment de Galien 105

LISTE DES ABREVIATIONS

ABP : association de biologie praticienne
ADICAP : association pour le développement de l'informatique en cytologie et en anatomie pathologique
AFAQAP : association française pour l'assurance qualité en anatomopathologie
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
CBRS : centre de biologie et de recherche en santé
CRDM : cytopénies réfractaires avec dysplasie multilignées
CE : conformité européenne
CEQ : contrôle externe de qualité
CHU : centre hospitalier universitaire
CIL : comparaison inter-laboratoire
CIQ : contrôle interne de qualité
CIQe : contrôle interne de qualité externalisé
CNQ : contrôle national de qualité
Cofrac : comité français d'accréditation
CV : coefficient de variation
DM-DIV : dispositif médical de diagnostic *in vitro*
EEQ : évaluation externe de la qualité
ELN : *european leukemia net*
FAB : franco-américano-britannique
GFHC : groupe francophone d'hématologie cellulaire
GTA : guide technique d'accréditation
HAS : haute autorité de santé
ICSH : *international council for standardization in hematology*
IPSS : *international prognosis scoring system*
IPSS-R : *International prognosis scoring system revised*
ISO : *international organization for standardization*
LA : leucémie aiguë
LAL : leucémie aiguë lymphoïde
LAM : leucémie aiguë myéloïde
LBM : laboratoire de biologie médicale
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMMC : leucémie myélo-monocytaire chronique
MGUS : *monoclonal gammopathy of undetermined significance*
MM : myélome multiple
MRC : matériaux de référence certifiés
NC : non-conformité
NFS : numération formule sanguine
OCIL : organisme de comparaison inter-laboratoire
SMD : syndrome myélodysplasique
SMP : syndrome myéloprolifératif
SMQ : système de management de la qualité
VIM : vocabulaire international de métrologie

INTRODUCTION

L'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale (1) a conduit à une importante restructuration des laboratoires avec une obligation d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 version 2012 qui est le référentiel normatif (2). Tous les laboratoires français, publics et privés, devront être accrédités sur la totalité de leur activité au plus tard le 31 octobre 2020. Créé en 1994, le Cofrac (comité français d'accréditation) a été désigné comme unique instance nationale d'accréditation par le décret 2008-1401 du 19 décembre 2008 reconnaissant ainsi l'accréditation comme une activité de puissance publique (3).

Conformément aux règles internationales, l'accréditation permet une reconnaissance de la compétence du laboratoire de biologie médicale (LBM), fondée sur une évaluation de ses pratiques par les pairs, avec le soutien des qualiticiens. Son objectif est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et la qualité de la prestation médicale offerte par le laboratoire (4). Cet objectif de qualité est établi dans le seul intérêt du patient.

Les examens réalisés dans un laboratoire doivent faire l'objet d'une validation de méthode, il s'agit en effet d'une des exigences de la norme. De plus, la garantie de qualité des résultats d'examens passe par la réalisation de contrôles internes de qualité (CIQ) et la participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ). Les dossiers de validations de méthodes ainsi que la preuve d'abonnements à des programmes d'EEQ font partie des documents à fournir au Cofrac pour justifier l'entrée effective du laboratoire dans la démarche d'accréditation, ou d'extension d'accréditation selon un planning prévisionnel.

Dans le laboratoire du centre hospitalier universitaire (CHU) Dupuytren à Limoges, l'obligation d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 s'applique à tous les services du pôle biologie-cancer concernés. Le service d'hématologie biologique est accrédité depuis 2014 pour les examens d'hémostase de routine (TCA, TP, fibrinogène et facteur V) et en cytologie pour la numération formule sanguine (automates et méthode manuelle).

Cette thèse présente la démarche et les résultats de la validation de méthode initiale et continue relative au myélogramme, du prélèvement de moelle osseuse jusqu'à l'interprétation des résultats de la numération d'un frottis.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I. Définition d'une validation/vérification de méthode

Une **validation** de méthode correspond à la « confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites » (5).
Une **vérification** de méthode correspond à la « confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites » (5).

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

Dans le cas d'une **validation** de méthode, le laboratoire utilise :
- une méthode normalisée ou reconnue mais employée hors de son domaine d'application (méthode adaptée par rapport aux recommandations du fournisseur) ;

ou

- une méthode non reconnue développée ou mise en œuvre par l'équipe du LBM. Les recherches bibliographiques ainsi que les études expérimentales devront être plus approfondies (6).

II. Guides Cofrac nécessaires pour une validation-vérification de méthode

Les documents utiles à l'accréditation sont disponibles sur le site internet du Cofrac[1]dans la section « santé humaine ». Il s'agit :

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

[1]http://www.cofrac.fr

- des documents d'information (INF)

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

Il faut savoir que les GTA sont les principaux documents nécessaires pour la réalisation des vérifications/validations de méthode en biologie médicale. Les recommandations présentées dans ces guides sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Toutefois, l'application des recommandations des GTA n'est pas obligatoire. En effet, le LBM garde la possibilité de répondre d'une autre manière aux exigences du référentiel mais toute autre démarche doit être argumentée et documentée (7). Dans tous les cas, le laboratoire devra démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire les exigences de la norme.

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

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

1. SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale » (7) et SH REF 02 révision 04 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 » (8)

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

Le SH REF 02, révisé en octobre 2013, a pour objet de préciser les exigences organisationnelles et techniques générales nécessaires pour la réalisation des examens de biologie médicale.

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

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

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

2. SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » (9) et SH INF 50 « Portée type d'accréditation » (10)

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

Le document SH REF 08, applicable depuis le 1er mai 2012, a pour objet de présenter le mode d'expression de la portée d'accréditation des LBM et leurs modalités d'évaluation par le Cofrac.

Le document SH INF 50, applicable depuis novembre 2013, présente les portées-types (ou nomenclature) recensant les examens de biologie médicale. Ces examens sont classés selon la thématique de la section santé humaine (domaines - sous-domaines - familles) dans le but de faciliter et d'harmoniser l'expression des portées d'accréditation.
En cas de demande d'accréditation sur un examen non répertorié, le laboratoire doit prendre contact auprès du Cofrac « pour avis et étude, le cas échéant, de sa recevabilité » (10).

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

Les recommandations présentées dans ce guide sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme concernant la vérification sur site/validation des méthodes. L'accréditation d'un LBM passe forcément

par cette étape qui permet d'avoir une bonne connaissance des méthodes d'analyses, de ses performances et de ses limites.
L'objectif est de s'assurer que ses performances sont suffisantes pour assurer la fiabilité des résultats d'analyses et par conséquent des interprétations cliniques du prescripteur.

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

4. SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale » (12)

Le SH GTA 06, applicable depuis le 1er juillet 2012, constitue un guide pratique d'aide à la mise en place des contrôles de qualité. Le contrôle de qualité constitue un moyen de vérification de la maîtrise en continu du processus analytique. L'objectif est d'apporter une confirmation et une preuve permanente de la validité des résultats rendus.
Le guide décrit les critères de performances évaluables grâce aux résultats des contrôles de qualité, ainsi que les modalités de choix des critères d'acceptabilité. On présente ensuite les différents types de contrôles de qualité pour les méthodes quantitatives et qualitatives, avec les modalités de leur mise en place dans le laboratoire.

5. SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale » (13)

Ce guide indique que « le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est pertinent et possible ». Le vocabulaire international de métrologie (VIM) définit l'incertitude de mesure comme un « paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées. » (14).
Applicable depuis octobre 2011, il définit la méthodologie permettant de démontrer que la maîtrise de la qualité des résultats d'analyses quantitatifs passe par l'évaluation de

l'incertitude de mesure (les résultats qualitatifs ne sont pas abordés pour l'instant dans ce document). L'incertitude est donc un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder. Associée à tout résultat de mesure, elle constitue une aide pour le clinicien dans sa prise de décision diagnostique ou thérapeutique. Elle apporte aussi au biologiste médical un élément important pour l'interprétation du résultat.

III. Présentation des étapes d'une validation de méthode initiale

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

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

1. Expression de la portée d'accréditation

Il faut savoir que le laboratoire est accrédité sous la forme d'une portée d'accréditation : celle-ci s'exprime sous la forme d'une **liste de compétences** ou « **champs de possibilités** ». Le Cofrac a mis à la disposition des laboratoires l'ensemble des portées-types d'accréditation dans le SH INF 50. L'expression de la portée d'accréditation demandée par le LBM, dépend des compétences que ce dernier est capable de démontrer et de l'utilisation qu'il compte en faire.
Par exemple pour l'hématocytologie, « **Domaine:** Biologie médicale **- Sous-domaine :** Hématologie – **Famille :** Hématocytologie (HEMATOBM) » (10) :

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

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) (**)	
HB2	Échantillons biologiques d'origine humaine	Recherche, identification et/ou numération de cellules (thrombocytes, cellules hématopoïétiques, cellules anormales, blastes, neuroblastes, histiocytes, ...) Recherche d'anomalies cellulaires (recherche d'hématies fœtales, coloration de Perls, corps de Heinz, ...)	Méthode de type qualitatif et/ou quantitatif Principe général des techniques : Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	(myélogramme, adénogramme, splénogramme) (test de Kleihauer, coloration de Perls, ...)

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

1) Nature de l'échantillon biologique, un astérisque (*) correspond à la possibilité de retirer certains types de nature d'échantillon et/ou de types d'examens proposés, ou d'en mentionner d'autres

2) Nature de l'examen/analyse : il s'agit aussi bien d'un résultat quantitatif que d'un résultat qualitatif. Le laboratoire choisit parmi les mentions proposées entre chaque virgule (« , »), en conservant l'intégralité de la mention proposée

3) Principe de la méthode : il est défini par le type de méthode (quantitatif ou qualitatif), le caractère manuel ou automatisé et les techniques employées

4) Référence de la méthode : portée A ou B

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

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

2. Choix de la portée : A ou B

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

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

En **portée B**, une « **validation** » de la méthode adaptée ou développée sera nécessaire.
Dans ce cas, le laboratoire établit l'ensemble des critères de la qualité de la méthode afin d'en démontrer la maîtrise pour en assurer la validation.
Pour les laboratoires pratiquant des méthodes amenées à évoluer, une accréditation en **portée flexible** s'impose (9).

3. Choix d'une portée flexible

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

Une **portée flexible standard** (A) permet au laboratoire d'utiliser sous accréditation, entre deux évaluations Cofrac, les révisions successives des méthodes normalisées ou

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

Une **portée flexible étendue** (B) permet au laboratoire de rendre sous accréditation, entre 2 visites d 'évaluation Cofrac, des résultats avec une méthode qu'il a lui-même développée ou adaptée. Il est évident que ce type de portée doit correspondre à une réalité d'utilisation pour le laboratoire en fonction de son activité et de son contexte (6).

Si la portée flexible n'est pas choisie, le laboratoire ne pourra pas utiliser une autre méthode que celle pour laquelle il est accrédité et dans ce cas, il n'y a pas de révision possible de la méthode qu'il a validée. Tout changement ne pourra être effectué que suite à une réponse positive lors d'une visite d'évaluation Cofrac.
L'adoption d'une portée flexible permet donc au laboratoire d'appliquer un nombre restreint de modifications sur ses examens, et ce sans à avoir à se soumettre préalablement à une évaluation Cofrac. Le laboratoire doit rédiger une procédure dite de « **gestion de la portée flexible** » listant les opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement de méthode ou de réactif ne faisant pas intervenir de nouvelles compétences (11).
La portée d'accréditation peut présenter une partie de la demande en portée flexible standard (A) et une autre en portée flexible étendue (B), entre familles ou au sein d'une même famille d'examens.

4. Analyses quantitatives/qualitatives et choix du processus

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Contenu d'un dossier de vérification/validation de méthode

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

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

Chaque dossier doit comporter généralement cinq parties :

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

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

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

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

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

- « Validation de méthode d'analyse » (PBH A 0001) ;
- « Gestion de la portée flexible (PBH A 0005) ;
- « Evaluations internes et externes de la qualité - Organisation et gestion des contrôles » (PBH A 0002) ;
- «Estimation des incertitudes de mesure » (PBH A 0003).

5.1. Description de la méthode

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

5.2. Définitions des besoins du laboratoire

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

5.2.1. Recommandations des sociétés savantes

Les limites d'acceptabilité peuvent reposer sur différentes approches :

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

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

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

Les deux principales références sont :

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

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

- *Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation* (17).

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

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

5.2.2. Pour les autres paramètres

Les bases de données élaborées par les sociétés savantes ne contiennent pas la totalité des paramètres de biologie médicale (6). C'est le cas de notre validation de méthode.
Dans ce cas, le laboratoire pourra s'appuyer sur toutes autres publications externes, sur les performances annoncées par le fournisseur ou sur des limites qu'il a lui-même définies.

5.3. Vérification bibliographique et expérimentale

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

Les critères de performances évoqués ci-dessous peuvent être recherchés dans des documents du fournisseur (manuel d'utilisation, fiches techniques, fiches réactifs), dans des ouvrages de référence ou dans des publications scientifiques réalisées par des experts indépendants.
La vérification expérimentale consiste à réaliser les essais nécessaires et en exploiter les résultats afin d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire. Il s'agit de s'assurer que la méthode est apte par rapport aux besoins définis par le laboratoire.

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

	Vérification (portée A)		**Validation (portée B)**	
Critères à évaluer	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire et analyses des discordances	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (limite de quantification et limites de linéarité)	Bibliographie	-	Essai	Essai
Interférences	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	-	Bibliographie	-	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	-	Bibliographie	-	Essai

5.4. Conclusion : déclaration d'aptitude de la méthode

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

6. Vérification expérimentale d'une méthode (portée A)

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

6.1. Fidélité

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

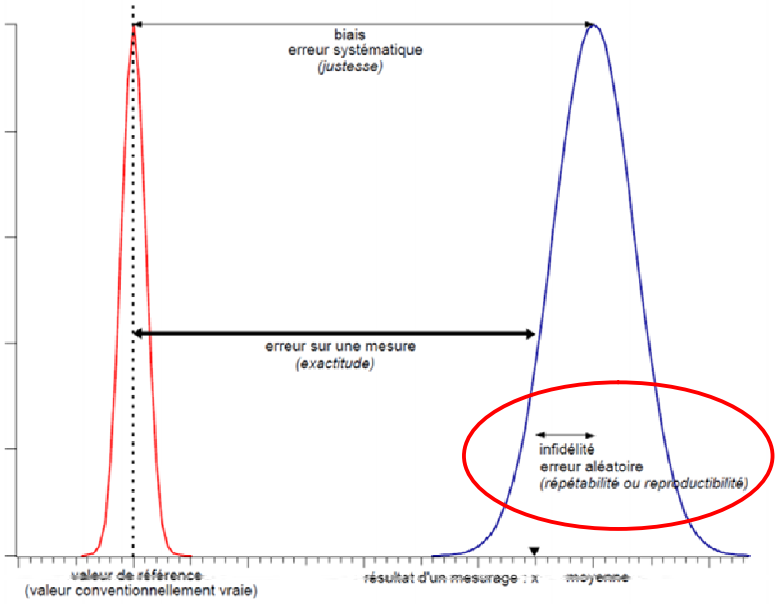


Figure 1. Représentation de la fidélité (d'après le SH GTA 06)

6.1.1. Répétabilité

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

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

Les mesures peuvent être réalisées sur les échantillons de **contrôle interne de la qualité** (CIQ) ou des échantillons patients au préalable anonymisés. La répétabilité est évaluée sur au moins 2 niveaux, ceux-ci doivent être choisis proches des seuils de décision. Le nombre de détermination idéal est de 30 pour chaque niveau afin d'obtenir

une bonne représentativité statistique. Cependant, un nombre d'essais inférieur pourra être réalisé si ce choix est justifié par une argumentation pertinente (coût des analyses, durée).

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

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

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

6.1.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire

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

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

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

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

6.2. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude

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

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

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

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

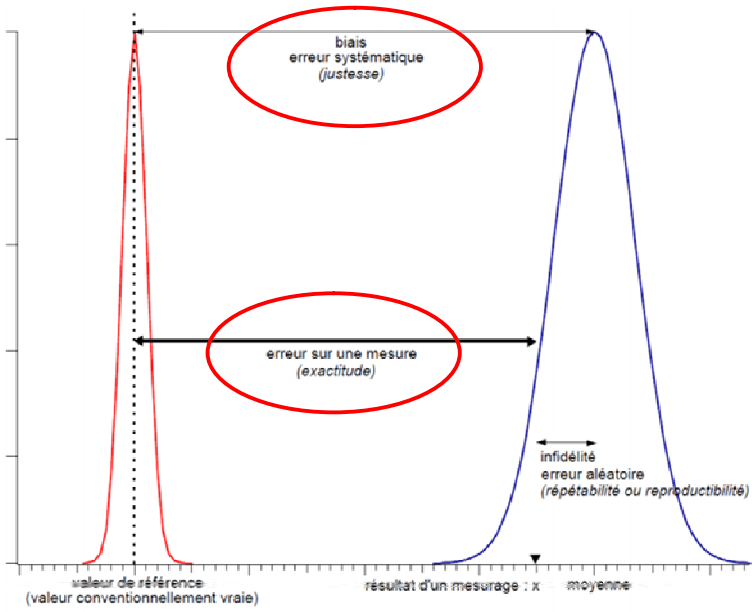


Figure 2. Représentation du biais et de l'inexactitude (d'après le SH GTA 06)

Le biais ne peut être établi qu'à l'aide de l'externalisation des CIQ.
La justesse est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire, établie sur des échantillons de CIQ, à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur vraie (v) de l'échantillon testé.

La valeur cible retenue est :

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

ou

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

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

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

L'exactitude d'une mesure correspond à « l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande » (12). Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle. L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude).
A ce jour, le laboratoire évalue l'inexactitude à partir des données des EEQ selon la formule suivante :

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

x : valeur trouvée pour un échantillon d'EEQ
v : valeur cible

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

6.3. Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure

Pour l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses, le laboratoire peut se reporter au guide SH GTA 14.
Cette étape comprend à la fois l'étude des risques (qui consiste à lister les paramètres d'influence et les moyens de maîtrise associés) et l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses pour au minimum 2 niveaux.

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

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

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

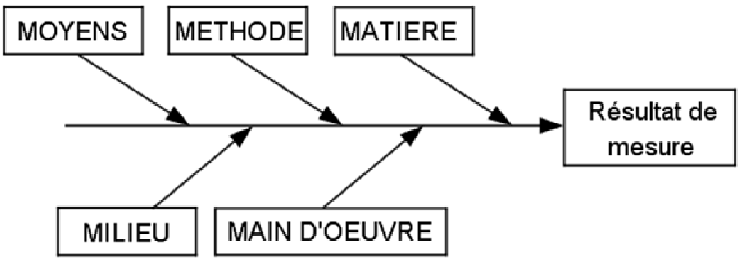


Figure 3. Diagramme des 5M (d'après le SH GTA 14)

Exemples de facteurs d'influence :

- **Préanalytiques** :
  - Moyens : seringue, aiguille épicrânienne ;
  - Milieu : types de tubes, conditions et durée de transport des échantillons prélevés, conditionnement avant analyse (centrifugation, conservation,…) ;
  - Méthode de prélèvement : pli du coude, ordre des tubes, durée de mise en place du garrot ;
  - Main d'œuvre : qualification/habilitation des préleveurs internes et externes ;
  - Matière : préparation du patient/qualité de l'échantillon (lipémique, ictérique, hémolysé, médicaments,…).
- **Analytiques :**
  - Moyens: pipette, automate, informatique,…;
  - Milieu: conditions ambiantes (température, pression atmosphérique…), conditions de stockage des prélèvements, conditions de stockage des réactifs,…;
  - Méthode : mode opératoire de l'analyse,…;
  - Main d'œuvre : qualification/habilitation du personnel ;
  - Matière : lots de réactifs, stabilité des échantillons,…

La norme précise que l'incertitude des résultats doit être déterminée dans les cas où cela est « pertinent et possible ». Ainsi, dans le SH GTA 01, le Cofrac accepte que l'incertitude

des méthodes quantitatives et qualitatives soit évaluée uniquement par une analyse de risque grâce à la méthode des 5M.

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

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

Le calcul s'effectue en quatre temps :

- Calcul de l'incertitude $u^2(\text{CIQ})$ liée à la fidélité intermédiaire, à partir des résultats des CIQ :

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

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

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

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

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

x_{lab}: résultat du laboratoire

x_{ref}: valeur assignée de la comparaison

n: nombre de valeurs d'EEQ

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

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

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

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

$$U(\mathrm{C}) = 2 \times u(\mathrm{C})$$

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

Bien entendu, aucun calcul d'incertitude ne pourra être réalisé dans le cas d'une validation de méthode qualitative, mais il est demandé au laboratoire de procéder à une analyse de risques (6). Le laboratoire devra lister l'ensemble des paramètres d'influence sur les résultats d'analyses pour chacune des trois phases préanalytique, analytique et post-analytique en utilisant la méthode des 5M.
Cette analyse de risques permettra de mettre en évidence les points critiques à maîtriser dans le laboratoire afin d'assurer la fiabilité des résultats. Pour chaque paramètre d'influence jugé significatif, des moyens de maîtrise adaptés devront être mis en place.

6.4. Comparaison de méthodes

Cette comparaison ne peut intervenir qu'après la vérification des critères cités ci-dessus (répétabilité, fidélité intermédiaire, justesse). La comparaison de méthodes va permettre de vérifier la corrélation entre deux méthodes ou deux équipements qui rendent des résultats sur un même paramètre (miroir, back-up, changement d'automate). Cet essai est obligatoire si le laboratoire souhaite garder les antécédents de ces patients quel que soit l'automate avec lequel l'échantillon est analysé (11).

Nous ne rentrerons pas plus dans les détails, ce critère n'étant pas vérifié sur site pour notre méthode.

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

7.1. Evaluation de la contamination

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

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

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

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

7.2. Robustesse

La robustesse d'une méthode est définie comme étant la capacité de la méthode à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées des différents paramètres du processus analytique (6). La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Le laboratoire doit donc prendre en compte l'ensemble des paramètres pouvant varier dans le laboratoire et vérifier que les résultats n'en sont pas affectés (p. ex : température d'incubation, opérateurs, volume de colorant distribué etc.).

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

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

7.3. Vérifications des intervalles de référence biologique (valeurs usuelles)

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

7.4. Sensibilité et spécificité analytique

La sensibilité et la spécificité diagnostique sont les critères de performance les plus importants pour une analyse de type qualitatif (6).

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

IV. Confirmation des performances en routine

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

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

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

1. Les contrôles de qualité en biologie médicale

1.1. Exploitation des CIQ

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

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

Il existe différents types d'échantillons de contrôle interne de qualité (12) :

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

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

Pour notre validation de méthode, il n'existait pas de CIQ. Le laboratoire a donc dû le mettre en place, tout en respectant les modalités suivantes :

- la maîtrise des étapes critiques
- les analyses seront réitérées à l'aide de méthodes identiques (ou équipements identiques) sur des échantillons conservés

1.2. Exploitation des EEQ et des CIQ externalisés

Conformément à la norme NF EN ISO 15189, le laboratoire doit participer à des comparaisons inter-laboratoires (CIL). Il s'agit de « l'organisation, l'exécution et

l'évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées » (12).

Il existe deux types de CIL :

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

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

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

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

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

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

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

Dans le cas particulier des myélogrammes, il n'existe pas pour le moment de CIQ externalisés.

2. Suivi des performances pour les méthodes de type quantitatif

2.1. Exploitation des CIQ

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

2.2. Exploitation des EEQ

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

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

2.3. Incertitude de mesure

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

2.4. Intervalle de référence

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

3. Suivi des performances pour les méthodes de type qualitatif

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

3.1. Exploitation des CIQ

Le passage régulier d'échantillons de CIQ est nécessaire pour anticiper une dérive du processus analytique. La fréquence de passage et le nombre d'échantillons doivent être déterminés en fonction du coût de l'analyse et des risques encourus.
Les indicateurs de performances et les limites d'acceptabilité associées sont choisis préalablement à la mise en place du contrôle de qualité.

3.2. Exploitation des EEQ

Les EEQ sont moins fréquents que pour les examens quantitatifs (12). Les résultats permettent de suivre la sensibilité et la spécificité diagnostique de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire. Ces résultats doivent être exploités et des actions préventives et/ou correctives doivent être mises en place en cas de discordance mineure ou majeure. La formation du personnel réalisée au travers d'évaluation et d'harmonisation des pratiques de lecture peut être considérée comme une évaluation externe de la qualité pour la réalisation manuelle des examens de lecture.
A défaut d'EEQ, les échanges de gré à gré sont nécessaires. Le rythme d'une confrontation trimestrielle semble approprié.

3.3. Maintien des compétences des opérateurs

La maîtrise de la qualité passe obligatoirement par la qualification/habilitation du personnel.
Pour les techniques manuelles ou semi-automatisées et si l'effet opérateur est considéré comme significatif, il est important de réaliser régulièrement des essais inter-opérateurs (6). En hématocytologie, il s'agira de lectures de lames.
Ces tests permettent de vérifier les performances de la méthode dans le temps et de formaliser le maintien des compétences des différents opérateurs habilités du

laboratoire. On parle de formation continue. Cette compétence doit être réévaluée périodiquement selon un planning défini pour chaque laboratoire en fonction de la criticité de l'analyse.

3.4. Maîtrise des conditions environnementales

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

3.5. Maîtrise continue des équipements

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

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

3.6. Maîtrise de l'échantillon primaire

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

3.7. Maîtrise de la méthode et des réactifs

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

DEUXIEME PARTIE : OBJECTIFS

L'examen microscopique des frottis de moelle reste toujours une approche indispensable et réelle dans le diagnostic et le suivi des hémopathies malignes.
Au quotidien, la morphologie est toujours au centre des rapports entre cliniciens et biologistes en particulier au moment de la suspicion diagnostique.
Elle fournit d'indispensables orientations permettant de choisir les investigations complémentaires spécialisées et d'optimiser la prise en charge du patient.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation, le secteur d'hématologie-cytologie souhaite demander l'accréditation sur le myélogramme.
Les difficultés de l'accréditation de ce secteur spécialisé sont liées à des spécificités techniques faisant appel à une méthode manuelle non automatisée et au manque d'outils de contrôle de la qualité (20). Trois techniciens, 4 biologistes et quatre à six internes (selon les semestres) effectuent des formules de moelle au microscope optique. Le biologiste référant accompagné par les deux internes qui ont réalisés les ponctions de moelles, conclut le myélogramme.
Le document SH INF 50 définit dans le domaine « biologie médicale », le sous-domaine « hématologie », et la famille « hématocytologie » la ligne de portée d'accréditation suivante :

- « Recherche, identification et/ou numération de cellules (cellules hématopoïétiques, cellules anormales, blastes, histiocytes...) - Méthode de type qualitatif et/ou quantitatif. Principe général des techniques : identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique (cf tableau 1).

Notre travail présentera donc deux versants : l'un quantitatif représenté par la numération des paramètres les plus signifiants relatifs aux cellules hématopoïétiques, l'autre qualitatif avec la détection et la reconnaissance de cellules hématopoïétiques anormales (21), l'évaluation d'éventuelles dystrophies des lignées myéloïdes et l'interprétation globale de l'examen, aboutissant chaque fois que possible à un diagnostic sous la forme d'un code ADICAP.

Le GTA 04 précise que les résultats d'une méthode assimilée comme semi-quantitative ou semi-qualitative est à considérer comme étant une méthode quantitative. Une méthode de ce type doit faire l'objet d'une vérification de méthode appropriée et pertinente.

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

- la lignée rouge avec une dysérythropoïèse éventuelle
- la lignée granuleuse avec tous les stades de la maturation granuleuse associée une dysgranulopoïèse éventuelle
- la présence de mégacaryocytes avec une dysmégacaryocytopoïèse éventuelle
- la présence éventuelle d'histiocytes
- la présence éventuelle de blastes pathologiques et de cellules anormales

TROISIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. Validation d'une méthode relative à une formule manuelle

1. Méthode qualitative ou quantitative ?

L'identification des cellules en hématocytologie est considérée par le Cofrac comme étant relative à une méthode qualitative (11). A ce titre, la démarche d'accréditation doit se concentrer sur deux points essentiels : la gestion des compétences humaines et la maîtrise des risques aux trois étapes pré, per et post-analytiques.

Nous rappelons cependant que la portée d'accréditation de la formule manuelle comprend aussi une notion quantitative (cf. deuxième partie).

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

- qualitative pour l'ensemble des cellules de la moelle osseuse (cf. II ci-après) ;
- quantitative pour les cellules de la moelle osseuse proches du seuil diagnostique dans le cas des pathologies hématologiques les plus souvent retrouvées au laboratoire (cf. III ci-après) :
    - seuil des blastes à 5% et 10% dans le cas des SMD
    - seuil des blastes à 20% pour un diagnostic de LA
    - seuil des plasmocytes à 10% pour le diagnostic d'un myélome
    - une érythroblastose > à 50%

2. Portée A ou B ?

Pour certains, la seule notion de l'intervention de l'œil humain, sur les objectifs du microscope suffit pour la considérer comme une analyse qualitative en portée B.

D'autres auditeurs, considérant l'automatisation et la standardisation de la coloration de May-Grünwald-Giemsa (22), la classent en portée A. Cette coloration est la méthode de référence en Europe. Les colorants sont des réactifs commerciaux marqués CE, le laboratoire utilise les conditions préconisées par le fabricant. Nous considérons donc notre validation de méthode comme étant « normalisée » et de portée A.

II. Validations de méthodes initiales : paramètres qualitatifs

1. Objectif - domaine d'application

L'objectif est de démontrer la validité des méthodes de réalisation et de lecture d'un frottis de moelle osseuse dans le secteur d'hématocytologie du laboratoire d'hématologie biologique du CHU de Limoges.
Le point crucial est de garantir la meilleure sensibilité possible dans l'identification des cellules hématopoïétiques (normales ou pas) et la meilleure homogénéité possible au sein de l'équipe technique et biologique, dans le dépistage et dans l'identification des pathologies hématologiques. Le suivi des contrôles de qualité et des confrontations internes sont également indispensables.

2. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire de la méthode

Les informations relatives à la ponction de moelle osseuse, à la réalisation et à la lecture des frottis sont contenues dans les modes opératoires « prélèvement de moelle osseuse », « tubes à prélever pour analyses spécialisées complémentaires lors d'un prélèvement médullaire », « enregistrement et traitement des échantillons médullaires » et « lecture d'un frottis de moelle osseuse » créés selon la procédure de gestion documentaire du pôle pour répondre aux exigences de la norme et des validations de méthodes. Ces documents sont disponibles dans le laboratoire d'hématologie, le personnel concerné en a pris connaissance (attesté par la signature électronique sur le logiciel de qualité du pôle « Qualims »). Ils font partie des conditions d'habilitation à la réalisation des prélèvements médullaires.

2.1. Prélèvement de moelle osseuse

Il consiste à aspirer une petite quantité de moelle avec laquelle on réalise des étalements sur lame. Les frottis sont ensuite colorés et décomptés au microscope.
La moelle osseuse est un tissu liquide que l'on peut prélever par ponction au niveau du sternum ou d'une épine iliaque antéro-supérieure ou postéro-supérieure.

Le laboratoire prélève sans rendez-vous le matin, du lundi au vendredi, de 9h à 12h30 au centre de prélèvement du CHU.

Seuls les patients mobilisables, pouvant être acheminés au centre de prélèvement, sont concernés. Les prélèvements dans les services sont réalisés par les médecins eux-mêmes, auquel cas le laboratoire reçoit les frottis et éventuellement les tubes joints à la prescription.

Le prélèvement de moelle osseuse s'effectue, dans la mesure du possible, avec deux personnes :

- Le préleveur : il s'agit d'un biologiste ou d'un interne habilité aux prélèvements de moelle osseuse
- Un assistant : un interne ou un externe en pharmacie

- **Technique du myélogramme simple**

Lorsque plusieurs patients attendent pour un prélèvement, la priorité est donnée à l'état clinique des patients puis à leur ordre d'arrivée. Si les bons de demande sont recueillis avant de faire entrer les patients, ils sont pliés face cachée de manière à respecter l'anonymat.

Les préleveurs étudient la demande, et si nécessaire téléphonent pour récupérer les informations manquantes (prescripteur, renseignements cliniques). Une adaptation de la prescription (analyses spécialisées) peut alors être réalisée le cas échéant. Ils accueillent le patient et vérifient son identité. Le geste est expliqué au patient, qui doit être rassuré et en confiance avant le début de l'examen.

Deux sites de prélèvements sont possibles (23) : sternal et iliaque (antérieur ou postérieur). On privilégie le secteur sternal car celui-ci est plus simple d'accès et mieux représentatif. Il est contre-indiqué en cas d'antécédents d'irradiation antérieure dans ce territoire, de tumeur à cet endroit ou de sternotomie. Les contre-indications relatives sont à évaluer dans le cas d'un contexte de premier prélèvement dilué, de myélome ou de gammapathie monoclonale (os souvent de dureté diminuée).

On repère le site de ponction : l'axe médian du sternum deux travers de doigts en dessous du bord supérieur.

Un patch EMLA® doit avoir été posé au moins 30 min avant le début du geste (soit par le service demandeur soit par les préleveurs eux-mêmes).

En plusieurs étapes successives, le préleveur doit:

- Retirer le patch EMLA afin de réaliser une désinfection locale avec une compresse imbibée de Bétadine® alcoolique au niveau du site de ponction
- Vérifier que l'ensemble du matériel à usage unique (compresses, aiguilles et seringue) est ouvert stérilement et déposé sur le chariot de prélèvement.
- Enfiler des gants stériles.
- Saisir la partie jaune en plastique de l'aiguille entre le pouce et l'index et piquer franchement la peau. En arrivant sur le périoste, on arrête la pression. Puis on place le pouce en opposition de l'index et du majeur et on exerce une pression d'intensité croissante, tout en exerçant une rotation de l'aiguille, jusqu'à sentir le franchissement de la table externe.
- Stopper la pression et lâcher l'aiguille. Elle doit tenir en place sans bouger.
- Adapter la seringue et aspirer pour remplir seulement l'extrémité de l'aiguille, puis retrait de la seringue.
- Rejeter la moelle osseuse en haut d'une lame préalablement inclinée sur une boite. On laisse le liquide biologique s'écouler sur la lame (présence de grains qui attestent de la qualité du prélèvement).
- Ré-adapter la seringue et aspirer environ 1 mL de moelle à transférer dans un tube d'héparinate de sodium (bouchon vert foncé). On homogénéise le prélèvement par 6 à 8 retournements lents puis on l'identifie (nom et prénom).
- Retirer l'aiguille et comprimer le point de ponction avec une compresse.
- Nettoyer le site de ponction avec une compresse imbibée d'alcool modifié et pose d'un pansement Tegaderm® (sinon, en cas d'allergie, une compresse propre avec un sparadrap).
- Apprécier l'état clinique du patient après l'examen (conduite à tenir en cas de malaise dans l'instruction CDP PREA 0025).
- Enfin, on téléphone dans le service ou au brancardier pour que l'on vienne chercher le patient, sauf pour les consultations externes auquel cas on s'assure que le patient puisse repartir dans de bonne conditions.

En l'absence d'assistant, le préleveur confectionne les frottis après la première aspiration. Pour réaliser les frottis, il faut tremper une lame au niveau des grains de moelle osseuse et frotter. Il faut réaliser entre 5 et 10 frottis et les laisser sécher à l'air.

A savoir qu'il existe 2 techniques de préparation des lames :

- le frottis médullaire : procédure similaire à celle des frottis sanguins
- le grumeau : on dépose un grain de moelle sur une lame et on l'écrase avec une seconde lame tout en l'étalant (l'ICSH recommande de préparer les lames en réalisant les deux techniques simultanément (24)).

Puis à la fin de la matinée, le biologiste/interne transportel'ensemble des frottis et des tubes dans une glacière au CBRS.

- **Myélogramme avec prélèvement pour analyses spécialisées**

On effectue les mêmes étapes que pour un myélogramme simple. Après avoir rejeté de la moelle sur une lame inclinée pour la réalisation des frottis, le préleveur réadapte une seringue et entreprend l'aspiration pour obtenir environ 1 mL de moelle à destination:

- d'un tube hépariné pour la cytométrie en flux et la culture de progéniteurs
- d'un milieu cytogénétique pour la cytogénétique et la FISH
- d'un milieu myéloculture pour la bactériologie
- d'un tube EDTA pour la biologie moléculaire, la virologie et l'immunologie (chimérisme)
- d'un tube citraté pour la culture de leishmanies (parasitologie) et culture de cryptocoques

L'échantillon doit être aspiré et délivré rapidement dans les tubes et homogénéisé par 6 à 8 retournements. Les tubes sont identifiés avec les noms et prénoms du patient.
Ils sont distribués dans la journée aux secteurs spécialisés avec une photocopie du bon de demande.
Si certains examens prescrits sur l'ordonnance ne peuvent pas être réalisés en cas d'aspiration médullaire insuffisante, il faut préciser sur le bon de demande « échec de prélèvement » pour telle analyse et éventuellement téléphoner au service.

2.2. Enregistrement et traitement des échantillons médullaires

On choisit deux frottis médullaires, les plus riches et les mieux étalés (1/3 de lame, franges fines, grains en bout de franges). Le préleveur ou son assistant les déposent à colorer dans la pièce de cytologie automates (poser sur la paillasse des lames en face des Advia).

Les frottis non colorés sont rangés dans des papiers bristol cartonnés, liés et agrafés de façon à confectionner une pochette. On colle une étiquette indiquant le nom, prénom, date de naissance du patient, la date du jour et l'UF du service demandeur.
Pour l'enregistrement sur le logiciel Glims, le bon de demande sera traité comme un bon de cytologie.

2.3. Utilisation du colorateur pour une coloration au May-Grünwald-Giemsa

Cette coloration est réalisée à l'aide du colorateur de lames ACL6.
La machine doit toujours rester propre. Une fois par jour, les techniciens nettoient :

- l'extérieur à l'eau savonneuse
- l'intérieur avec le trempage des bacs à l'eau de javel puis rinçage à l'eau du robinet et nettoyage à l'alcool
- pour finir, on rince à l'eau du robinet et on essuie avec un torchon propre

On remplit la fiche de maintenance pour le nettoyage du colorateur. Les colorants sont refaits le matin, le midi, le soir et éventuellement pendant la garde de nuit au besoin. A chaque nouvelle coloration, la fiche de traçabilité doit être remplie ainsi que la fiche de relevé des températures du colorateur (annexe 1).
Toutes les informations concernant la coloration au MGG sont contenues dans le mode opératoire « Utilisation du colorateur pour coloration May-Grünwald-Giemsa » créé selon la procédure de gestion documentaire du pôle pour répondre aux exigences de la norme et des validations de méthodes (Qualims).

2.4. Analyse des frottis colorés au microscope

Le myélogramme correspond à l'analyse cytomorphologique des cellules de la moelle osseuse et donne en pourcentage les proportions relatives des diverses cellules médullaires. Mais contrairement à l'hémogramme, il ne fournit pas de numérations par unité de volume (25).

Son analyse comporte trois étapes :

1) au faible grossissement : appréciation de la richesse du frottis et recherche de cellules rares normales (ostéoblastes, ostéoclastes et histiocytes) et pathologiques (métastases, macrophages activés...) en insistant sur l'étude de l'extrémité (franges) et des bords du frottis. On apprécie la richesse en mégacaryocytes facile à repérer et

l'aspect des cellules étalées (l'hétérogénéité est l'aspect habituel d'une MO normale).La discrimination entre une moelle diluée par du sang lors du prélèvement et une moelle pauvre d'aplasie médullaire n'est pas toujours aisée (la comparaison avec la formule leucocytaire du sang est utile).

2) au fort grossissement : l'étude cytomorphologique qualitative : elle définit les anomalies morphologiques des cellules d'une ou plusieurs lignées, qui orientent plus précisément vers une pathologie définie (26). On recherche en premier lieu les cellules matures (polynucléaires neutrophiles) puis les éléments immatures de la lignée granulocytaire. On regarde ensuite la lignée érythroblastique en comparant la couleur du cytoplasme à celle des globules rouges de l'étalement. Puis on regarde les cellules les moins fréquentes (blastes, monocytes).

3) au fort grossissement : la détermination des pourcentages respectifs des diverses cellules observées sur l'étalement médullaire. Il s'agit du « myélogramme » à proprement dit. Cette étape définit l'existence d'un excès ou d'un défaut quantitatif d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Elle permet également de définir une éventuelle anomalie de la maturation au sein d'une lignée, en montrant un excès ou un défaut des cellules les moins ou au contraire les plus matures au sein d'une lignée. Enfin, elle quantifiera un type cellulaire anormal. On compte dans des régions bien étalées, repérées au faible grossissement, souvent à proximité des grains de moelle. On s'arrête sur un champ microscopique qui semble adéquat (nombreuses cellules, bien étalées et bien colorées) et on réalise le décompte de toutes les cellules présentes dans ce champ ; puis on déplace la platine pour retrouver un autre champ qui semble adéquat, on en compte les cellules, et ainsi de suite (27).

Certains éléments ne sont pas inclus dans le décompte, car trop peu nombreux : histiocytes, mastocytes, cellules du microenvironnement (ostéoblastes, adipocytes…). Ces diverses cellules ne sont signalées en commentaire que quand leur nombre apparaît augmenté. Les cellules malignes hématopoïétiques sont intégrées dans les pourcentages, à l'inverse des cellules métastatiques non hématopoïétiques dont on signale uniquement la présence.

L'interprétation sous forme de texte libre est structurée en deux parties :

- Un commentaire reportant les éventuelles anomalies morphologiques constatées
- Une conclusion visant à répondre à la question posée par le prescripteur et dans la mesure du possible un diagnostic

3. Vérification bibliographique

Cette vérification vise à valider les critères ne faisant pas l'objet d'essais dans le laboratoire.

3.1. Spécificité et sensibilité de la coloration MGG standardisée (22) et (28)

Cette coloration repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

- le May-Grünwald, contenant de l'éosine (colorant acide) et du bleu de méthylène (colorant basique)
- le Giemsa, contenant de l'éosine et des dérivés du bleu de méthylène dont l'azur de méthylène.

Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive. C'est l'ajout d'eau qui donne leur pouvoir colorant, les sels précipitent et se fixent électivement sur les constituants cellulaires :

- Les constituants cellulaires acides fixeront électivement les colorants basiques (constituants basophiles) : ADN, ARN
- Les constituants cellulaires basiques fixeront électivement les colorants acides (constituants acidophiles ou éosinophiles)
- Les constituants fixant les deux types de colorants sont dits neutrophiles

Les affinités tinctoriales des différents constituants cellulaires après la coloration sont les suivantes :

- Noyau : violet
- Nucléole : bleu
- Corps d'Auer : violet-pourpre
- Cytoplasme acidophile : rose
- Cytoplasme basophile : bleu
- Cytoplasme polychromatophile : gris
- Granulations primaires : pourpre
- Granulations neutrophiles : violet lilas
- Granulations éosinophiles : orange
- Granulations basophiles : violet foncé
- Hématies : beige rosé

3.2. Stabilité des réactifs

- Colorant de May-Grünwald (Biolyon, ref : FR09766) et le colorant de Giemsa (Biolyon, ref : FR09265) : à conserver dans le flacon d'origine à une température comprise entre 15 et 25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette des flacons.
- Les solutions colorantes en cours d'utilisation doivent être renouvelées au moins quotidiennement du fait de l'instabilité des colorants qui précipitent dans le temps et provoquent des dépôts sur les frottis.

3.3. Robustesse

La robustesse de cette technique est principalement assurée par l'utilisation de solutions tamponnées permettant de contrôler le principal facteur influençant la qualité de la coloration : le pH (qui doit être voisin de 7).
Le renouvellement fréquent des colorants (22) complète la standardisation de cette coloration, permettant aux cellules de la moelle osseuse de présenter les mêmes colorations.

3.4. Comparaison avec la méthode de référence

Cet essai est non applicable. En effet, la microscopie manuelle est actuellement la méthode de référence pour l'identification et la numération des cellules de la moelle osseuse.

3.5. Autres critères à évaluer selon le GTA 04

Les interférences et la contamination sont non applicables du fait du principe de la méthode.

4. Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier

Nous sommes dans le cas d'une validation de méthode semi-quantitative, en portée A.
Le versant qualitatif de cette validation de méthode initiale est axé sur trois points essentiels : la gestion des compétences du personnel, la maîtrise des risques aux trois étapes pré, per et post-analytique et l'étude des performances aux EEQ et aux confrontations internes (21).

L'objectif est de garantir la meilleure sensibilité possible dans la reconnaissance des cellules hématopoïétiques au sein de l'équipe technique et biologique et le cas échéant dans l'identification de pathologies hématologiques sous-jacentes.

5. Résultats-interprétation

Selon le SH GTA 01, « dans le cas d'examen dont le résultat repose sur une lecture réalisée par un opérateur (identification fondée sur la morphologie), il appartient au laboratoire d'évaluer régulièrement la qualification des opérateurs réalisant cette tâche. Un moyen alternatif de contrôle peut être le recours à des doubles lectures par différents opérateurs. Les risques doivent être maîtrisés au minimum pour les étapes critiques, qui sont identifiés » (29).

5.1. Analyse de risques

Il est important de pouvoir évaluer les étapes critiques. Le diagramme des 5M peut être utilisé pour identifier les principaux facteurs d'incertitude susceptible d'influencer significativement le résultat (0).

5.1.1. Étape préanalytique

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

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

Ces données doivent pouvoir suivre le processus métier du LBM (phase préanalytique, analytique et post-analytique) jusqu'au rendu d'un résultat validé et interprété par le biologiste (30).

- Il existe une exigence vraiment critique : la « **qualité » de l'étalement**.

Plusieurs critères macroscopiques et microscopiques définissent un étalement correct : le frottis obtenu doit être mince avec des bords sensiblement rectilignes et distants de ceux de la lame. Les franges du frottis doivent être riches en grains. Au microscope, la zone de lecture se situe juste en amont des grains.

Les points critiques à maîtriser sont multiples, par ordre chronologique :

- Lors du prélèvement, on aspire dans un premier temps, un volume très faible (limité au seul embout de seringue). On désadapte la seringue et on rejette le liquide biologique en haut d'une lame préalablement inclinée sur une boîte. Les frottis doivent être réalisés immédiatement (la moelle coagulant très vite) et les grains éventuellement visibles doivent être récupérés. On dispose au mieux d'un assistant qui réalise les frottis.

Un risque majeur de la phase préanalytique est **l'identification erronée** du frottis ou une discordance entre l'identité de l'échantillon et celle du frottis.

Le risque d'identification incorrecte du frottis est maîtrisé par:

- la vérification de l'identité du patient à son entrée dans la salle de prélèvement (entretien avec le patient ou via le bracelet hospitalier d'identité)
- l'utilisation d'étiquettes informatiques (nom, prénom, date du jour et numéro de dossier) générées lors de la saisie du dossier réalisée en temps réel et qui doit être complètement terminé avant d'accueillir un nouveau patient.

Après la confection des frottis, on les laisse sécher quelques minutes à l'air libre, ou plus si les frottis sont d'aspect graisseux. Les instructions pour la réalisation d'un frottis médullaire sont décrites dans le mode opératoire « Prélèvement de moelle osseuse ». Le personnel d'hématocytologie (biologistes, internes) est qualifié et habilité à réaliser les ponctions de moelle et les frottis.

- **Les frottis les plus riches** et les mieux étalés sont signalés par une croix. Le risque **de ne pas sélectionner les frottis les plus représentatifs**, est de rendre un résultat non contributif.
- Les frottis sont ensuite placés dans des boîtes de lames. Les tubes sont laissés à température ambiante (respect de l'intégrité des cellules), seuls les tubes de cytogénétique doivent être placés tout de suite après prélèvement dans l'étuve à 37°C.
- L'identité du préleveur, le territoire prélevé, la dureté de l'os, la facilité d'aspiration, la présence d'un patch Emla®, l'heure de pose (30 min à 2h avant le geste) et la conformité de l'emplacement doivent être indiqués sur l'ordonnance.

- Pour les frottis réalisés dans les services par les prescripteurs, le risque est maîtrisé par la diffusion du catalogue d'analyses et du manuel de prélèvement qui définissent le type de tube à utiliser pour les analyses spécialisées ainsi que les conditions et durées de transport. Au niveau du laboratoire, le personnel habilité applique l'instruction sur les critères d'acceptation des échantillons primaires comportant les conditions et la conduite à tenir en cas de non-conformité.

- **L'étape de coloration** des frottis conditionne totalement la qualité de l'analyse morphologique ultérieure (22).

Il est évident que si les cellules sont altérées, mal étalées et/ou mal colorées, même un cytologiste très expérimenté se trouvera probablement en difficulté. A l'œil nu, un frottis correctement coloré apparaît bleu pâle légèrement teinté de chamois. Au niveau microscopique, il ne faut pas observer de coloration de la zone intercellulaire, celle-ci doit être claire et transparente. Les hématies doivent apparaître beiges rosés, non réfringentes et les autres éléments sont colorés selon leurs constituants cellulaires.

Le colorateur doit faire l'objet d'un suivi dans un livre de bord, avec l'enregistrement de la température. De plus, la qualité des colorations est maitrisée par l'utilisation de fiches de suivi des colorants et des suivis de colorations. Ces fiches tracent l'heure de renouvellement des colorants (avec validation de la qualité de la première lame de la série par simple examen visuel), le rinçage des bacs, le pH de la solution tamponnée et le suivi des numéros de lots des réactifs. La température dans le colorateur est également suivie (sonde raccordée).

5.1.2. Étape analytique

- Reconnaissance cellulaire qualitative

Elle nécessite une formation et un contrôle régulier des compétences.

La reconnaissance des cellules de la moelle demande une formation et une habilitation du personnel au poste de travail (reconnaissance cellulaire par analyse de forme/taille/couleur). Le maintien des compétences est réalisé grâce à des confrontations internes cytomorphologiques et aux EEQ (voir ci-dessous 5.2 et 5.3).

Le diagnostic cytologique est complexe, il demande des années de formation et encore il y aura toujours des diagnostics difficiles. D'où la nécessité des **échanges et des doubles lectures** pour vérifier la concordance des % des types cellulaires et leurs

interprétations dans les cas à problèmes avec plusieurs niveaux :1) collègue(s) en interne, 2) experts extérieurs (par demande de relectures de lames ou d'images, formalisées et facilitées aujourd'hui par le réseau Andral), 3) « super » expert spécialisé dans un sous-domaine particulier (pédiatrie, leucémies aigues, lymphomes). Le recours à ces relectures est du ressort du biologiste ayant lu la lame initialement. Le biologiste veille à maintenir ses connaissances. Il doit participer à des évaluations externes de la qualité sur des envois de lames de moelle avec un contexte clinique. La conclusion du myélogramme doit aller jusqu'à proposer des hypothèses et/ou poser un diagnostic chaque fois que possible. Le biologiste participe à des réunions de confrontations clinico-biologiques (RCP, hebdomadaires) pour maintenir à jour ses connaissances sur le traitement des hémopathies, des protocoles de recherche, et pour maintenir un dialogue privilégié avec ses confrères cliniciens.

- Quantification au microscope

Les instructions pour la lecture d'un frottis médullaire sont disponibles sur Qualims dans le mode opératoire « Lecture d'un frottis de moelle osseuse ». **Le risque est de sous-estimer ou surestimer une population cellulaire d'intérêt** (ex : blastes, plasmocytes), induite par un comptage insuffisant.

Au microscope, on réalise une formule sur 200 à 300 éléments, en plusieurs régions de la lame et si possible sur 2 lames. Lorsqu'une augmentation du pourcentage d'une catégorie de cellules est constatée et qui pourrait entrainer des conséquences diagnostiques, on doit compter beaucoup plus d'éléments (500 idéalement) et répéter les comptes (plusieurs régions, plusieurs frottis, plusieurs observateurs).

- Les locaux

Le travail au microscope, ou devant une station d'images numérisées, nécessite un minimum de calme et de concentration. Il faut donc veiller à des conditions de travail satisfaisantes, en niveau de bruit, de température et de lumière (31).

La pièce où se trouve le colorateur est climatisée et un relevé des températures est effectué (température de la pièce et température interne du colorateur). De plus, les conditions de stockage des réactifs non ouverts sont maîtrisées : armoires à toxiques à l'épreuve du feu, où les produits sont stockés à température ambiante.

- Le matériel

Le choix et l'entretien du parc de microscopes sont cruciaux. Il est nécessaire de vérifier ou de reprendre régulièrement le réglage de Köhler (32) sur les microscopes afin d'assurer la maîtrise de la qualité des microscopes. Une étiquette apposée sur chaque microscope rappelle la date de la dernière maintenance réalisée par le biomédical.

5.1.3. Etape post-analytique

- Saisie des résultats :

Pour le décompte, il n'y a pas de risque d'erreur de saisie car le compteur est relié au SGL **mais il existe pour le commentaire final car il s'agit d'une saisie manuelle**. Ce risque doit être maitrisé par une vérification par un tiers, celle-ci étant tracée par un code informatique.

- Formulation des commentaires et conclusion :

Les exigences de la norme NF EN ISO 15189 sont élevées. Dans le domaine de la cytologie hématologique, nous constatons une **carence aigue de standardisation dans la formulation des commentaires, des hypothèses diagnostiques et voire même dans le nom des cellules**. Le biologiste utilise la terminologie de classifications internationales reconnues : classification OMS des hémopathies (33, 34, 35), classification ADICAP, classification et recommandations proposées par *l'European Leukemia Net* (ELN). L'ELN propose au sein de son groupe de travail des actions de standardisation et de morphologie cellulaire ainsi que d'optimisation de classification des cellules difficiles (blastes, monocytes). Le GFHC étudie la question pour mettre en place des propositions harmonieuses qui seraient disponibles à priori fin 2015/courant 2016. La communication de diagnostics urgents (leucémies aigues) passe par un appel téléphonique au prescripteur.

5.2. Qualification/habilitation du personnel

5.2.1. Habilitation initiale

L'habilitation est la reconnaissance de la compétence d'une personne à travailler à un poste. Pour le personnel nouvellement affecté à un poste, l'habilitation initiale est prononcée après une période de formation/tutorat au poste.

La difficulté évidente ici est représentée par l'amplitude des connaissances à maîtriser pour être capable de faire face à toutes les situations, ou presque, de morphologie hématologique (31). De l'aveu même de cytologistes expérimentés, il leur est habituel de rencontrer des cellules pathologiques qu'ils ont du mal à identifier.
Il est donc utile de découper ces connaissances à acquérir en niveaux, de façon adaptée à l'organigramme du laboratoire et aux fiches de postes effectives.
Au laboratoire du CHU, nous avons distingué trois principaux niveaux de compétence en cytologie hématologique sanguine et médullaire confondues:
-Le premier dit « de garde » ou niveau 1, doit permettre de tenir le poste « automate NFS » et de détecter la présence d'une anomalie. Il comprend l'identification des amas plaquettaires, le dépistage et la numération des schizocytes, le décompte d'une formule normale, le dépistage sans identification ni comptage d'éléments « anormaux » au sens large (toute cellule hors polynucléaires, lymphocytes ou monocyte normal).
-Le second niveau, dit « de routine » ou niveau 2 assure la maîtrise de la formule sanguine normale et pathologique, dans la majorité des situations, et la capacité, en cas de non reconnaissance d'éléments, à transmettre la lame ou les images à un senior, technicien ou biologiste, de façon adaptée à l'urgence.
-Le niveau 3 ou « niveau spécialisé » est représenté par la maîtrise du myélogramme ou plus précisément la capacité à établir un décompte, sans ou avec un seul début d'interprétation, et à signaler au biologiste les situations urgentes.
-Le niveau 4 correspond à l'interprétation en intégrant d'éventuels autres résultats biologiques issus d'analyses spécialisées (cytométrie, biologie moléculaire), la formulation éventuelle d'une hypothèse diagnostique, le dialogue avec le prescripteur et la prestation de conseil. Il est réservé à un biologiste habilité et rentre dans le cadre de la « validation biologique spécialisée en cytologie ».

Pour chaque niveau, on définit une fiche de poste, une fiche d'habilitation et une grille de tutorat.
Une fois ces niveaux définis, il reste à procéder à l'habilitation du personnel.
Il ne faut pas tomber dans le piège de la « surqualité », c'est-à-dire passer du temps à habiliter un personnel compétent qui réalise des décomptes de moelle osseuse depuis des années. Pour ce dernier, une validation des acquis sur l'ancienneté suffit mais la norme exige de tracer cette habilitation.

Il est bien plus pertinent de se consacrer à la formation initiale des nouveaux venus.
Dans tous les cas, une notion importante à transmettre au personnel est la capacité à cerner ses limites et l'excellent réflexe qu'est la demande d'avis, d'un égal ou d'un senior, en intra ou en extra-laboratoire, au moindre doute.

5.2.2. Maintien des compétences

S'il est essentiel d'habiliter le personnel, il l'est tout autant de maintenir ses compétences. Une attestation de pratique régulière (nombre de journées passées au poste, nombre de lames lues) est l'élément le plus important.
Le maintien des compétences est aussi assuré par une formation continue avec des programmes de confrontations internes cytomorphologiques (cf ci-dessous) et externes. Le contrôle inter-laboratoire constitue un excellent outil car il apporte une réponse à l'un des défauts majeurs de la cytologie hématologique : la subjectivité.

Les demandes ponctuelles de doubles lectures pour avis dans le cas des diagnostics difficiles rentrent parfaitement dans ce cadre et doivent être utilisées comme telles, au delà de leur intérêt immédiat pour le patient. La télé-expertise en hématologie, prend une place croissante et constitue une réponse adaptée face aux exigences en termes de qualité des résultats. L'intérêt est de plus évident pour le partage des connaissances, l'éducation et le diagnostic.
La loi n°2009-879 du 21 juillet 2009 ainsi que le décret du 19 octobre 2010 (36) ont donné une définition précise de la télémédecine « la télémédecine est une forme de pratique médicale à distance utilisant les technologies de l'information et la communication. Elle met en rapport, entre eux ou avec un patient, un ou plusieurs professionnels de santé, parmi lesquels figure nécessairement un professionnel médical et, le cas échéant, d'autres professionnels apportant leurs soins au patient. Elle permet d'établir un diagnostic, d'assurer, pour un patient à risque, un suivi à visée préventive ou un suivi post-thérapeutique, de prescrire des produits, de prescrire ou de réaliser des prestations ou des actes, ou d'effectuer une surveillance de l'état des patients. La télémédecine est donc d'abord une pratique médicale, et non pas un système technologique ». La télé-expertise est un acte de la télémédecine, elle permet à un professionnel médical de solliciter à distance l'avis d'un ou plusieurs professionnels

médicaux en raison de leurs formations ou de leurs compétences particulières, sur la base des informations médicales liées à la prise en charge d'un patient.

La création du réseau national de télédiagnostic en cytologie, nommé Andral, porté par le GFHC (Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire) et le Collège d'hématologie des Hôpitaux Généraux constitue une réelle opportunité.

En 2015, Andral regroupe 300 biologistes (libéraux et hospitaliers) inscrits, dont 40 relecteurs travaillant en binôme. Le réseau propose à chaque utilisateur (hématologistes biologistes privés et publics) d'obtenir dans un délai court (<24h) un minimum de deux avis d'experts sur un dossier image de cytologie hématologique. L'inscription à ce réseau est libre, la seule condition étant de mettre en ligne un dossier image lisible. Le réseau garantit la relecture par deux référents d'astreinte selon un planning hebdomadaire géré par un administrateur, les avis étant donné dans les 24h. Ce réseau est officiellement ouvert et fonctionnel depuis le 11 octobre 2012. L'accès au réseau Andral s'effectue par un portail GFHC dédié : https://www.gfhc-reseau-andral.fr.

Ce réseau de télé-expertise utilise essentiellement des images statiques et pour le moment pas de lames virtuelles étant donné le peu de laboratoire équipé de matériel performant pour la numérisation au 100x.

Les demandes d'avis et les relectures sur Andral sont tracées dans un classeur dédié au laboratoire.

5.2.3. Non-conformités (NC)

Toute mise en évidence d'action non conforme, de résultat non conforme, de risque susceptible d'empêcher la garantie de la qualité des résultats, doit faire l'objet d'une fiche de NC pour permettre la mise en place d'actions correctrices pertinentes et d'éviter ainsi le renouvellement de ce risque (29).

5.3. Suivi des confrontations internes cytomorphologiques et des EEQ

Une instruction a été créée spécifiquement pour la gestion des contrôles de qualité des formules médullaires manuelles. Elle comprend les détails de la mise en œuvre de ces contrôles avec les modalités d'enregistrement et de traitement statistique des données ainsi que la conduite à tenir en cas de dépassement des limites acceptables.

5.3.1. Présentation des confrontations internes

La mise en place d'un tel programme est un avantage indéniable pour la qualité dans un laboratoire. Il est de plus bien perçu s'il s'accompagne d'un minimum d'humanité et de respect des participants.

Des confrontations internes de cytomorphologie ont été formalisées au cours de l'année 2015. Ces contrôles de qualité sont composés de frottis de moelles lutés choisis parmi les échantillons de patients. L'objectif est de couvrir les pathologies hématologiques les plus courantes au laboratoire avec si possible des formules où le pourcentage est proche du seuil décisionnel pour établir le diagnostic.

7 lames ont été choisies. Un paramétrage du système informatique de gestion conduit chaque participant à enregistrer son frottis de contrôle à la manière d'un échantillon de patient, permettant de se rapprocher au maximum des conditions usuelles de travail.

Le participant précise les paramètres quantitatifs et qualitatifs du frottis, ainsi que les commentaires éventuels sur le frottis : morphologiques, caractère d'urgence, hypothèse diagnostique.

Les résultats sont ensuite enregistrés dans un programme Excel « maison » pour le traitement statistique. On a choisi de d'élaborer un tableur Excel (annexe 3) similaire à celui mis en place pour les formules manuelles des frottis sanguins. Ce fichier est composé de différents onglets :

- un onglet de présentation facilitant l'utilisation du tableur
- 4 onglets consacrés aux techniciens participant aux contrôles de qualité avec pour chaque type cellulaire :
  - le résultat du technicien
  - la moyenne des résultats des techniciens
  - la valeur cible (moyenne des résultats des biologistes) et un intervalle cible calculé depuis la table de Rümke extrapolée (annexe 4) pour être applicable au laboratoire.
  - l'écart par rapport à la moyenne des techniciens, exprimé en nombre d'écart type (idéalement entre -2 et +2)
  - l'écart par rapport à la valeur cible, exprimé en nombre d'écart types (idéalement entre -2 et +2)

- un onglet « recap tec » récapitulant les résultats de l'ensemble des techniciens et permettant une analyse statistique
- un onglet « internes » ou sont recueillis les résultats des internes
- un onglet « biologistes » avec les résultats des biologistes

De plus, une cotation est automatiquement associée à chaque résultat de l'opérateur (technicien et interne) afin de faciliter son évaluation :

- a : valeur du technicien comprise dans la fourchette « moyenne de l'ensemble des techniciens +/- 2 écarts types »
- b : valeur du technicien à l'extérieur de la fourchette « moyenne de l'ensemble des techniciens +/- 2 écarts types » mais à l'intérieur de la fourchette cible établie selon la table de Rümke (37)
- c : résultat hors limite. La demande de relecture de la lame avec le biologiste est recommandée

Les personnes le souhaitant et celles ayant eu des résultats non conformes (cotation « c ») peuvent revoir les frottis avec le biologiste référent sur le microscope multi-têtes. Eventuellement, des actions complémentaires sont mises en place (formation complémentaire). Ces relectures doivent être tracées, elles permettent la formation continue.

Il s'agit de connaître les performances du laboratoire, paramètre par paramètre, ainsi que la vérification continue des performances du laboratoire.

Cette analyse permet également d'ajuster le choix des lames pour les futures confrontations internes et d'évaluer la progression du personnel entre deux contrôles présentant des caractéristiques similaires.

5.3.2. Résultats

C'est la première année que le laboratoire organise un programme de confrontations internes. La participation a été excellente de la part des biologistes et des internes (sept participants), moins bonne pour les techniciens pour des raisons pratiques et temporaires d'organisation (effectif réduit pendant la période de la validation de méthode).

L'objectif est de couvrir la diversité des pathologies rencontrées au CHU. Nous avons sélectionné un ensemble de lames couvrant les diagnostics les plus « fréquent » sur l'année 2014 au laboratoire. Les frottis proposés ont comporté, une moelle normale, un myélome, des SMD/SMP avec une LMMC, une AREB 2, une LAM2 et une leucémie myéloïde chronique.

Pour le diagnostic d'un SMD/SMP, la difficulté repose sur les seuils diagnostiques à 5%, 10% et < 20% de blastes et sur l'appréciation des dysplasies éventuelles des lignées médullaires. On a choisi une LAM et une AREB 2 avec un pourcentage de blastes à la limite du seuil décisionnel. De même, pour le diagnostic d'un myélome, avec un seuil théorique de plasmocytes à 10% (à nuancer par les plasmocytes dystrophiques). On note aussi l'importance du diagnostic sous la forme d'un code ADICAP (standardisation des résultats), qui a été, dans cette confrontation cytomorphologique, assez peu utilisé.

L'analyse des résultats montre:

- Pour la moelle normale, 100% de bonnes réponses, tous les participants ont trouvés les lignées équilibrées sans anomalie morphologique. Une moelle normale est bien évidemment la base, en hématocytologie, pour reconnaître et décompter les cellules hématopoïétiques normales avant de passer aux moelles pathologiques.
- Pour le myélome, le seuil >10% de plasmocytes et le caractère dystrophique associé ont été notés par tous les participants.
- Pour la LMC, la richesse augmentée, l'hyperplasie granuleuse et l'hyperéosinophilie médullaire ont été correctement établies.
- Pour la LAM2, 100% de bonnes réponses avec la détection et le décompte de plus de 20% de myéloblastes avec pour certains des corps d'Auer associés à une dysgranulopoïèse.
- Pour la LMMC, il s'agit d'une lame difficile. La composante monocytaire, qui est excédentaire dans ces pathologies, est compliquée à apprécier très précisément, car il est difficile de discriminer les promyélocytes/myélocytes dysplasiques et les monocytes. La dysgranulopoïèse a été notée, ainsi que la dysmégacaryopoïèse par tous les participants. Au niveau des résultats, on note une majorité d'AREB 1 et un CRDM sous réserve car il n'y a pas d'informations clinico-biologiques associées. La monocytose était >1G/L. Aucun participant n'a détecté d'excès de

monocytes médullaires. Il ressort de ce cas la nécessité absolue de connaître une éventuelle monocytose circulante lors de la lecture du myélogramme d'un SMD.

- Pour l'AREB 2, un participant a hésité entre l'AREB 1 et l'AREB 2, le seuil de blastes est proche de 10%.
- Pour la dernière lame, l'hyperplasie érythroblastique a été détectée par tous les participants. Pour les autres lignées, tous les participants ne sont pas d'accord : certains n'ont pas notés d'anomalies qualitatives et d'autres ont détectés une dysmégacaryopoïèse et une dysgranulopoïèse.

C'est la première fois que le laboratoire met en place ce programme de confrontations inter-laboratoires. Plusieurs difficultés, pour établir le diagnostic, ont été retenues :

- L'absence d'informations cliniques
- L'absence de lames de sang associées ou de renseignements sur le bilan biologique (NFS, etc.)

Pour les paramètres qualitatifs, on note bien sur la subjectivité du morphologiste pour la richesse, le nombre et/ou anomalies éventuelles des mégacaryocytes, la dysérythropoïèse ou la dysgranulopoïèse. Certains biologistes et internes n'ont d'ailleurs pas posé de diagnostic mais ont uniquement mis des commentaires sur le frottis médullaire sous réserve des résultats de l'hémogramme et des informations cliniques associées.

En résumé, l'essentiel dans un myélogramme, c'est évidemment la conclusion, soit « moelle normale », soit « un commentaire répondant aux questions posées » et le cas échéant orientant vers une situation pathologique.

Les biologistes et les internes ayant participé aux confrontations cytomorphologiques ont globalement tous des résultats satisfaisants : aucun cas de discordance nécessitant l'adaptation des valeurs cibles n'a été relevé.

Pour la formation continue, on a choisi d'utiliser les lames d'EEQ des enquêtes passées de notre CIL. Des renseignements cliniques et biologiques sont fournis et orientent déjà le diagnostic. Ce programme sera mis en place début janvier 2016.

5.3.3. Présentation de l'EEQ

- Généralités

Il faut rappeler que l'adhésion du laboratoire à un programme d'EEQ est une exigence incontournable pour toute accréditation d'une analyse (6). La participation à des EEQ est un élément constitutif de tout système d'assurance qualité : c'est une preuve de la maîtrise de la fiabilité des résultats. De plus, il s'agit d'un instrument irremplaçable pour l'amélioration continue de la qualité des résultats, notamment par sa fonction éducative. Les contrôles organisés par l'ANSM sont obligatoires et la participation aux EEQ organisées par des associations régionales de Contrôles de la Qualité est vivement recommandée. Ces programmes sont organisés par des :

- Associations professionnelles
- Agences gouvernementales
- Sociétés commerciales

La participation est le plus souvent volontaire. Les résultats individuels des laboratoires ne sont connus que par les organisateurs.

L'une des difficultés de notre validation de méthode à son initiation en juin 2014, était l'absence de programme d'EEQ pour les frottis médullaires. En effet, la moelle osseuse est un prélèvement précieux obtenu en petite quantité et il est difficile d'avoir suffisamment de matériel pour développer une EEQ myélogramme (frottis de moelle jamais identiques entre eux).

En l'absence de programme existant, la norme impose la mise en place de contrôles inter-laboratoires et des échanges d'avis sur des cas. Nous avons donc décidé de mettre en place une comparaison inter-laboratoire en nous basant sur le modèle des outils développés pour le réseau Andral. On sait que dans la mesure du possible, le laboratoire doit utiliser des matériaux provenant de sources externes telles que des échanges d'échantillons (ici de moelle osseuse) avec d'autres laboratoires. Compte tenu de la nature du prélèvement biologique et de la difficulté d'en obtenir des quantités suffisantes, nous avons donc décidé d'expérimenter des EEQ myélogrammes sur le concept d'images statiques.

Selon la norme NF EN ISO 17043, la comparaison inter-laboratoire repose sur «l'organisation, l'exécution et l'évaluation d'essais en utilisant des échantillons identiques ou similaires par au moins deux laboratoires dans des conditions

préétablies » (38). Il s'agit donc d'une procédure utilisant les résultats de plusieurs laboratoires qui analysent le même échantillon. Cette évaluation permet de comparer les résultats d'un laboratoire à ceux obtenus par d'autres laboratoires et, le cas échéant, de motiver des actions correctives. C'est un test de compétence du laboratoire (39).

Pour la mise en place de la comparaison interlaboratoires (et en vue d'une accréditation) (40), il y a plusieurs points-clés à maîtriser :

- L'organisateur (le laboratoire d'hématologie de Limoges) doit avoir réalisé au moins une prestation de comparaison inter-laboratoire dans le champ de la demande d'accréditation.
- L'organisateur doit s'assurer que le personnel est compétent et qu'il dispose de l'expérience nécessaire.
- La conception d'un programme de comparaison inter-laboratoire comprend plusieurs étapes :
    - on identifie les sources potentielles d'erreur (risque d'incident dans les différentes étapes : sélection, préparation, stockage, manipulation, envoi…) ;
    - on donne à l'ensemble des participants les grandes lignes de l'analyse statistique à utiliser y compris la détermination des valeurs assignées avec leur incertitude, ainsi que toute technique de détection des valeurs et observations aberrantes ;
    - la préparation d'instructions détaillées pour les participants (feuilles de résultats à utiliser, etc.) ;
    - la fréquence des contrôles doit être adaptée à la situation (maîtrise de la préparation des échantillons, résultats des CIL antérieures.) ;
- Le calcul statistique doit être connu des participants pour l'interprétation de leur performance.
- L'identité des participants ne doit pas être communiquée.
- Un audit interne est conseillé tous les ans.

Une comparaison inter-laboratoire a ainsi été mise en place en juin 2014 entre le laboratoire d'hématologie du CHU, des centres hospitaliers et laboratoires privés de la région (annexe 5). Chaque laboratoire a signé l'accord de comparaison inter-laboratoires sous la forme d'une signature électronique.

Chaque participant est au préalable inscrit au programme d'EEQ myélogrammes. Il possède un lien et un mot de passe pour accéder en ligne à l'EEQ sous forme d'images numérisées. S'agissant d'un programme pilote, l'EEQ est gratuit à ce stade.
Sur le forum *Téléslide*, le gérant du site met en ligne deux cas. Ces deux dossiers sont proposés en alternance par le site de Limoges, ou par l'un des autres laboratoires participants qui nous a envoyés les lames. Le laboratoire d'hématologie de Limoges, pour des raisons pratiques (mise à disposition d'un microscope équipé d'un appareil photo), réalise la numérisation du dossier.

Au départ, plusieurs biais ont été évoqués : une seule personne contrôle le microscope, elle n'examine qu'une partie du champ, et transmet ensuite les images aux autres observateurs qui ne peuvent donc analyser en pratique que ce que la première personne a choisi de regarder. C'est pourquoi une cinquantaine d'images, représentatives de la lame (« champs »), doivent être prises afin de se rapprocher au plus près des conditions pratiques de travail de l'opérateur au microscope. La représentativité des données numériques est validée par la concordance des réponses entre elles et avec le laboratoire initial.
Pour chaque cas, à l'aide d'un microscope équipé d'un appareil photo, le biologiste référent/interne habilité a photographié plusieurs images numérisées au format jpg au grossissement x10, x60, x100 :
- 1 image minimum au grossissement x10, pour apprécier la richesse et la présence ou non de mégacaryocytes.
Au grossissement x60 et x100 :
- la lignée mégacaryocytaire : 5 à 10 mégacaryocytes si possible pour apprécier la morphologie
- la lignée érythroblastique et la lignée granuleuse :>200 éléments pour être le plus représentatif possible de la lame.
- autre(s) population(s) +/- augmentée(s) ou présente(s) en faibles quantités à l'état normal (blastes, plasmocytes,…)
De plus, des renseignements cliniques pertinents et des données biologiques (NFS notamment) sont fournis aux participants.

Chaque opérateur vote de façon anonyme sur une grille de réponse (annexe 6). Le cumul du décompte cellulaire doit être de 100%. La feuille de vote anonyme se rapproche au plus près de l'analyse d'un myélogramme en situation réelle. Il y a quatre parties :

1) une partie ou le participant s'identifie (nom, prénom et CH/laboratoires privés correspondant).

2) une partie« paramètres quantitatifs » avec le détail de chaque type cellulaire :

- érythroblastes
- blastes
- maturation granuleuse
- éosinophiles
- basophiles
- monocytes
- lymphocytes
- plasmocytes
- cellules anormales

Une case à côté de chaque type cellulaire permet d'y inscrire le pourcentage des cellules.

3) Une partie « paramètres qualitatifs » où l'on note la richesse du frottis, la présence ou l'absence des mégacaryocytes et des histiocytes, une éventuelle dysplasie sur l'une des 3 lignées. On a choisi une cotation simplifiée :

-pour la richesse, 0 si diminuée, 1 si normale et 2 si augmentée

-pour les mégacaryocytes, 0 si absents, 1si présents et 2 si augmentés

-pour les histiocytes, 0 si absents, 1 si présents et 2 si hémophagocytants

-pour une dysplasie éventuelle, 0 si absents, 1 si entre 10%-50% (significative) et 2 si >50% (majeure)

4) Une partie code ADICAP (41) comportant une case à menu déroulant et une case de commentaire libre.

Seul le référent du site a accès aux résultats de l'ensemble des participants. Il récupère l'ensemble des données sur le site informatique qui sont ensuite traitées dans un tableur Excel. On doit assurer les qualités de sûreté et de confidentialité, tout en préservant l'identité des participants. Les rapports de comparaison sont transmis par courrier électronique.

Le LBM doit documenter, enregistrer et, le cas échéant, agir rapidement sur les résultats de ces comparaisons. De plus, le laboratoire doit pallier les problèmes ou les défauts identifiés et conserver les enregistrements des actions menées.

- Résultats

Pour la détermination des valeurs cibles, le laboratoire a choisi d'utiliser la moyenne obtenue par le groupe de laboratoires (nos pairs) utilisant la même technique.
La moyenne est donc calculée à partir de l'ensemble des résultats des participants. Les limites acceptables établis selon la table de Rümke, dépendent de cette valeur-cible, elles seront arrondies au chiffre entier supérieur, il n'y aura pas de décimales puisque l'on compte des cellules. Les limites acceptables sont indiquées lignée par lignée.
Pour chaque cas, un système de notation est mis en place (annexe 7) :

- pour les paramètres quantitatifs, on donne 1 point si au moins 4 items sont conformes
- pour les paramètres qualitatifs, on donne 1 point si au moins 3 items sont conformes
- pour le diagnostic, on donne 2 points si le code ADICAP est satisfaisant (code consensus ou proche), 1 point si le code ADICAP est discutable et 0 point si le code est insatisfaisant.

Pour la note finale on attribue, soit un A=3 ou 4 points, un B=2 points ou un C<2 points.
Chaque participant reçoit par mail deux tableurs Excel, c'est-à-dire son rapport personnalisé de l'exploitation statistique des résultats et un tableur récapitulatif où apparaissent :

- Les résultats anonymisés des participants
- Les notes obtenues à chaque partie et la note finale pour chaque cas
- Le nombre total de participants
- Les limites acceptables
- Eventuellement le z-score qui permet d'évaluer la performance individuelle des laboratoires (justesse de leurs résultats).

Le z-score est défini selon la norme NF ISO 13528 comme la différence entre la valeur mesurée x et la valeur cible (biais), rapportée à l'écart type. Le z- score n'est pas utilisé pour le moment.

Nous avons dans un premier temps évalué la faisabilité du projet en réalisant une enquête préliminaire suivie d'une évaluation, en juin 2014, avec les deux premiers dossiers « tests ». Il s'agissait d'une LAM5 pour le dossier 1 et d'une moelle normale pour le dossier 2. Les frottis étaient originaire du CHU et colorés selon la coloration May-Grünwald-Giemsa du service d'hématologie biologique du CHU. Les images de chaque dossier ont été enregistrées sur le forum *Téléslide* accessible aux 14 participants. Ils bénéficiaient d'un temps limité à un mois et demi pour le rendu de leurs résultats.
Au final, la participation a été moyenne : 4 biologistes sur3 laboratoires parmi les sept laboratoires inscrits. L'évaluation a fait ressortir les difficultés de connections sur le forum (internet explorer obligatoire pour se connecter au site), les images au fort grossissement qui ne sont pas assez nombreuses et également des soucis informatiques au niveau de la validation des grilles de réponses. Pour les points positifs, on notait la qualité des frottis et par conséquent des images, la présence des renseignements cliniques et biologiques qui donne une orientation diagnostique. De plus, les notes des participants étaient correctes, ce qui nous a encouragés à la poursuite du projet.
Après avoir réglé ces problèmes techniques, nous avons proposé deux nouveaux cas en octobre 2014 : une LAM3 et une thrombopénie périphérique. La participation a été excellente, l'ensemble des biologistes participants a répondu (les 14 participants). Toutes les notes obtenues sont des A.

En janvier 2015, le laboratoire Biosanté19 à Brive a proposé deux cas : un myélome IgA (annexe 8 et annexe 9) et une LMC. La participation a été une nouvelle fois excellente, l'ensemble des biologistes participants a répondu. Toutes les notes obtenues sont des A.
En avril 2015, le laboratoire de Guéret a proposé deux cas : une localisation médullaire métastatique et une AREB 1. Le cas de l'AREB 1 a souligné un point important, certains comptent le pourcentage de blastes hors érythroblastes (même pour des valeurs inférieures à 20%) et ont conclu à une AREB 2. Il n'existe pas de consensus national sur ce point. Dans ce cas précis, il n'y avait pas de conséquence pronostique puisqu'il s'agissait d'un sujet âgé. Toutes les notes obtenues sont des A.

5.3.4. Perspectives

Des points d'amélioration sont importants et à prendre en compte. Pour les confrontations internes cytomorphologiques, il s'agit d'une part de l'amélioration de

l'organisation de la relecture des lames avec le biologiste responsable du secteur (difficulté d'organisation permettant la libération de temps commun), et d'autre part la participation systématique des biologistes, des internes et des techniciens à ces contrôles.

Pour la mise en place de la formation continue, notre objectif est de proposer un travail peu contraignant pour les opérateurs car celui-ci doit s'ajouter à l'activité de routine. On a donc décidé d'utiliser les EEQ myélogrammes de la CIL mis en place par le laboratoire. Il s'agit d'une part, d'un gain de temps pour l'équipe et d'autre part, cela favorise une meilleure participation des opérateurs du secteur. Le recueil des données se fait sur le tableur Excel ou l'ensemble des calculs sont pré-créés. La seule intervention est l'enregistrement des résultats des participants.

Pour assurer la pérennité du système, un technicien s'est porté volontaire pour être référent sur les EEQ myélogrammes. Il va être formé à l'utilisation du tableur Excel et aux modalités de préparations des dossiers « images » sur le forum *Téléslide*. Les frottis sont choisis en accord avec le biologiste responsable du secteur en fonction des besoins de formation des participants.

5.3.5. EEQ national

Depuis début 2015, un programme national accrédité d'EEQ est proposé par l'Association de Biologie Prospective, auquel le laboratoire a adhéré. Les deux premières participations ont été notées A pour le diagnostic et le décompte :

- l'EEQ 2015 A : il s'agissait d'une localisation médullaire métastatique lors de la rechute d'un neuroblastome. Le diagnostic et le décompte proposés par le laboratoire étaient corrects.
- L'EEQ 2015 B : il s'agissait d'une leucémie aigue myéloblastique avec anomalie cytogénétique récurrente t(8 ; 21) (q11 ; q22) RUNX1/RUNXT1. Le diagnostic et le décompte proposés par le laboratoire étaient corrects.

6. Conclusion

Les résultats obtenus avec les confrontations cytomorphologiques et les EEQ sont conformes à nos exigences.

Le laboratoire d'hématologie biologique du CHU valide la méthode de réalisation et de lecture d'un frottis médullaire sur le plan qualitatif.

III. Validations de méthodes : paramètres quantitatifs

Ces validations de méthode concernent : la maturation granuleuse, les érythroblastes, les plasmocytes et les blastes.

Comme nous l'avons dit en début de chapitre, il nous semble important de valider ces paramètres de manière quantitative étant donné l'importance de l'aspect quantitatif du myélogramme dans le rendu d'un résultat.

1. Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier

Nous sommes dans le cas d'une validation de méthode semi-quantitative et en portée A.

Conformément aux recommandations présentées dans la partie « Généralités », les paramètres à vérifier sont :

- la répétabilité
- la fidélité intermédiaire
- la justesse
- l'incertitude de mesure

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

La stabilité des réactifs après ouverture est contrôlée en continu (annexe 1), elle ne sera pas étudiée dans cette validation de méthode car une coloration impropre à la lecture d'un frottis est un critère de rejet de cette session de coloration.

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

2. Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier

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

Le laboratoire a donc décidé de fixer la limite de répétabilité grâce à l'équation $f(x) = \frac{1}{\sqrt{x}} \times 100$ (annexe 10). Ce modèle statistique prend en compte les variations de CV en fonction du pourcentage cellulaire : plus le pourcentage cellulaire cible est bas, plus le CV attendu est grand.

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

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

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

Comme recommandé dans le GTA 04 version 2015, on a décidé d'estimer la variabilité inter-opérateurs puisque nous disposons de sept séries de résultats (sept opérateurs). On vérifie l'homogénéité des séries via le test de variance Bartlett. Si les séries sont homogènes (p value>0,05), on peut calculer la variabilité inter-séries avec le test d'Anova. Si les variances sont non homogènes (p-value <0,05), on recherche la présence éventuelle de valeurs aberrantes (test de Grubbs) et on calcule la variabilité inter-séries avec le test de Kruskal-Wallis. Quelque soit le test réalisé par la suite (Anova ou Kruskal-Wallis), si le p-value est supérieur au seuil de signification 0,05 alors il n'y a pas de différence significative entre les séries.

3. Vérifications bibliographiques

Les vérifications bibliographiques ont été effectuées sur les paramètres qualitatifs de la formule manuelle.

L'intervalle de référence (valeurs normales de la moelle osseuse) a été établi à partir des données bibliographiques d'après le site Hématocell de la Faculté de Médecine d'Angers(27).

Les valeurs pour un myélogramme normal sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3. Valeurs normales de la moelle osseuse du nouveau-né jusqu'à l'âge adulte

	Nouveau-né (<2 jours)	**Enfant (1 mois-2 ans[2])**	**Adulte**
Cellules indifférenciées (hémoblastes)	1-2%	2 – 4%[3]	1-2%
Lignée neutrophile			
Myéloblastes	0,5-1%	0,5-1%	2-3%
Promyélocytes	1-2%	1-2%	4-8%
Myélocytes	5-10%	3-6%	5-15%
Métamyélocytes	15-20%	5-15%	15-20%
Polynucléaires	30-50%	15-20%	20-30%
Lignée éosinophile	1-4%	1-4%	1-4%
Lignée basophile	0,5-1%	0,5-1%	0,5-1%
Lignée érythroblastique			
Proérythroblastes	0,5-2%	0,5-2%	1-2%
Erythroblastes basophiles	1-4%	1-3%	4-8%
Erythroblastes polychromatophiles	5-10%	5-8%	6-10%
Erythroblastes acidophiles	6-10%	6-10%	4-10%
Lymphocytes	10-18%	30-50%	5 – 15%[4]
Plasmocytes	0%	0-0,5%	1-3%
Monocytes	0,5-2%	0,5-2%	2-3%

[2]Après l'âge de 2 ans, les valeurs chez l'enfant rejoignent peu à peu celles observées chez l'adulte
[3] Si les hématogonies sont incluses, leur nombre peut atteindre 10 à 15% (selon les pays les hématogonies sont comptées comme cellules indifférenciées ou comme lymphocytes (un commentaire est nécessaire)
[4] Pathologique si > 20 %

4. Plan d'expérience et mise en œuvre au laboratoire

Trois techniciens sont habilités pour compter les moelles.

Quatre biologistes sont habilités pour compter les moelles et rendre les conclusions.

Les internes sont formés au cours de leur stage pour compter les moelles, ils peuvent être habilités.

Devant l'impossibilité d'effectuer les tests par tous, nous avons testé la répétabilité sur un volontaire. On réalise une répétabilité intra-frottis (3 mesures à partir du même frottis) et inter-frottis (3 frottis du même échantillon analysés une fois), chacune sur un niveau bas et un niveau haut. Dans la validation quantitative des formules sanguines manuelles, une répétabilité sur 10 frottis a été réalisée. Nous avons choisi de réaliser une répétabilité sur seulement 3 frottis car la moelle est un liquide précieux recueilli en petite quantité et la qualité des lames s'altère rapidement au bout de 2 ou 3 frottis réalisés.

La fidélité intermédiaire est calculée à partir des résultats des CIQ auxquels l'ensemble du personnel habilité doit participer. Elle est donc calculée en faisant varier le facteur opérateur sur l'analyse d'un même frottis.

L'inexactitude est calculée à partir des résultats des biologistes qui ont participé à l'ensemble du programme de l'évaluation externe de la qualité (EEQ) de la CIL. La valeur cible est la moyenne de l'ensemble des participants de cet EEQ.

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

La variabilité inter-opérateurs est quantifiée via le test de Bartlett et le Test d'Anova grâce à un site de calcul statistique proposé par la faculté de Jussieu (lien suivant : http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests).

5. Résultats, interprétation

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

5.1. Blastes

5.1.1. Tableau récapitulatif

On tient compte de leur nombre dès qu'il dépasse 2%. Le pourcentage de blastes est réalisé au microscope si possible sur 500 cellules dans la moelle osseuse.

Pour les SMD, le décompte des blastes inclut : myéloblastes, monoblastes et blastes indifférenciés (31). Les proérythroblastes et mégacaryoblastes ne sont pas inclus dans le décompte des blastes pour le classement (FAB ou OMS) sauf pour les LAM. Les classifications OMS et le système de score IPSS définissent 3 groupes en fonction du % de blastes médullaires. Depuis l'apparition du score IPSS-R, il faut définir plus précisément le pourcentage de blastes médullaires, selon 4 catégories : ≤ 2%, 2-4,9%, 5-10%, 11-30%.

Pour une LA, il faut définir un pourcentage de blastes entre 20 et 100% : dans la LAM, on cherche les myéloblastes, les monoblastes, les mégacaryoblastes et les proérythroblastes. Pour les LAL, on recherche les lymphoblastes.

Tableau 4. Résultats de la validation des blastes (formule manuelle)

		Répétabilité	**Fidélité intermédiaire**	**Inexactitude**	**Incertitude de mesure élargie U**
Niveau normal	Valeur moyenne	0,33%	1,07%	8 résultats d'EEQ disponibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible	/
	Limites d'acceptabilité	Non pertinent	Non pertinent		
	Résultats	Non pertinent	Non pertinent		**U=2,5 %**
Niveau haut 5-9%	Valeur moyenne	5,83%	6,57%		/
	Limites d'acceptabilité	CV<41,5%	CV<55%		
	Résultats	**CV=36,63%**	**CV=79,49%**		**Non applicable**
Niveau haut 10-19%	Valeur moyenne	15%	11,83%		/
	Limites d'acceptabilité	CV<25,8%	CV<34%		
	Résultats	**CV=16,87%**	**CV=20,28%**		**Non applicable**
Niveau haut >20%	Valeur moyenne	21,00%	26,29%		/
	Limites d'acceptabilité	CV<21,83%	CV<29%		
	Résultats	**CV=8,52%**	**CV=22,45%**		**U=16,3%**

5.1.2. Conclusion

Si on raisonne en terme de fourchettes et de seuils signifiants (<5%, 5-10%,>10%, >20%), les résultats sont conformes aux attentes à l'exception du seuil 5-10% ou on observe une discordance avec deux opérateurs (une valeur inférieure à 5% et une supérieure à 10%). Cette lame a été revue et un consensus a été obtenu a posteriori pour une valeur entre 5 et 10%.

Les incertitudes pour les blastes niveau (5 à 10%) et (10 à 20%) n'ont pas pu être calculées par manque de données de CIL. Cependant, celles-ci sont compatibles avec l'interprétation et la portée diagnostique de l'examen.

Au total, le résultat quantitatif sur les blastes est accepté, sachant que le recours en pratique au recompte par un tiers doit être un réflexe fréquent voir systématique selon la pertinence clinique.

5.2. Erythroblastes

5.2.1. Tableau récapitulatif

Tableau 5. Résultats de la validation des érythroblastes (formule manuelle)

		Répétabilité	**Fidélité intermédiaire**	**Inexactitude**	**Incertitude de mesure élargie U**
Niveau normal	Valeur moyenne	22%	26%	8 résultats d'EEQ disponibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible	/
	Limites d'acceptabilité	CV<21,3%	CV<28%		
	Résultats	**CV=10,76%**	**CV=22,75%**		**U=16,0%**
Niveau haut	Valeur moyenne	48,5%	35%		/
	Limites d'acceptabilité	CV<14,3%	CV<19%		
	Résultats	**CV=7,23%**	**CV=14,96%**		**U=10,9%**

5.2.2. Conclusion

Les résultats de répétabilité, fidélité intermédiaire et justesse sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées. L'incertitude de mesure calculée est relativement haute mais compatible avec la pratique clinique.

5.3. Maturation granuleuse

5.3.1. Tableau récapitulatif

Tableau 6. Résultats de la validation de la maturation granuleuse (formule manuelle)

		Répétabilité	Fidélité intermédiaire	Inexactitude	Incertitude de mesure élargie U
Niveau normal	Valeur moyenne	65,83%	61,86%	8 résultats d'EEQ disponibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible	/
	Limites d'acceptabilité	CV<12,3%	CV<16,3%		
	Résultats	**CV=3,52%**	**CV=12,56%**		**U=16,6%**
Niveau haut	Valeur moyenne	74,17%	85,11%		/
	Limites d'acceptabilité	CV<11,6%	CV<15,4%		
	Résultats	**CV=5,22%**	**CV=5,71%**		**U=15,4%**

5.3.2. Conclusion

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

5.4. Plasmocytes

5.4.1. Tableau récapitulatif

Tableau 7. Résultats de la validation des plasmocytes (formule manuelle)

		Répétabilité	Fidélité intermédiaire	Inexactitude	Incertitude de mesure élargie U
Niveau normal	Valeur moyenne	0,67%	1,43%	8 résultats d'EEQ disponibles : toutes les valeurs sont comprises dans la fourchette cible.	/
	Limites d'acceptabilité	Non pertinent	Non pertinent		
	Résultats	**CV=77,46%**	**CV=79,37%**		**U=2,5%**
Niveau haut	Valeur moyenne	12,50%	15,71%		/
	Limites d'acceptabilité	CV<28,3%	CV<37,6%		
	Résultats	**CV=19,43%**	**CV=24,70%**		**Non applicable**

5.4.2. Conclusion

Les résultats de répétabilité, fidélité intermédiaire et justesse sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées. Si on raisonne en fourchettes et en seuils signifiants (<10% ; >10%), les résultats sont conformes.

5.5. Estimation de la variation inter-opérateurs

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. On utilise le test statistique d'Anova pour l'analyse des variances.

Tableau 8. Résultats de la variation inter-opérateurs

nºCIQ	Paramètres	Unité	Opérateurs						
			1	2	3	4	5	6	7
CIQ 1	Erythroblastes	%	34	17,5	28	26,5	19	30,5	36,5
	Maturation granuleuse	%	55	72	61	61	71,5	61,5	51
	Plasmocytes	%	3	1	1,5	0,5	3	0,5	0,5
	Blastes	%	0	1	0,5	2,5	0	0,5	3
CIQ 2	Erythroblastes	%	27	24,5	30	17	18	30,5	28
	Maturation granuleuse	%	48	50	49	52,5	49	51,5	44,5
	Plasmocytes	%	16,5	13,5	14	15,5	24	12,5	14
	Blastes	%	0	0,5	0	1	0	0,5	1,5
CIQ 3	Erythroblastes	%	7	10,5	5	8	6,5	18,5	5
	Maturation granuleuse	%	91	82,5	86,5	78,5	63	75	77
	Plasmocytes	%	0	1	0,5	0,5	0	0,5	1
	Blastes	%	6	5,5	2,5	7	17,5	1	6
CIQ 4	Erythroblastes	%	9	5,5	6	4	11	17	11
	Maturation granuleuse	%	87	85,5	56	59,7	76	60	52
	Plasmocytes	%	1	0,5	1	0	0,5	0	0
	Blastes	%	37	27	30	26,5	20,5	21	22
CIQ 5	Erythroblastes	%	33	39	50,5	40	31,5	36,5	31,5
	Maturation granuleuse	%	23	26,3	27	26,5	33,5	40	25
	Plasmocytes	%	0	1,7	2	0,5	1	0	0,5
	Blastes	%	16	11	8	12	11,5	13	11,5
CIQ 6	Erythroblastes	%	30	33,5	36	31	30,5	41	53
	Maturation granuleuse	%	58	59,5	50,5	63,5	61,5	54	38
	Plasmocytes	%	3	0,5	1	2	3	0	3
	Blastes	%	0	0	1,5	0	0	1	0
CIQ 7	Erythroblastes	%	9	11,5	10	8,5	22	15	17,5
	Maturation granuleuse	%	90	85,5	88,5	90	77,5	84	80,5
	Plasmocytes	%	0	0	0	0	0	0	0
	Blastes	%	0	0	0	1	0	0,5	0

A l'aide du tableur statistique, on vérifie l'homogénéité de la distribution via le test de variance Bartlett : p-value=0,9469 donc p-value>0,05. On peut alors utiliser le test d'Anova pour calculer la variabilité inter-séries. On a calculé un p-value= 0,9996 donc p-value >0,05, la valeur de p étant largement supérieure au seuil de signification 0,05.
On peut donc conclure qu'il n'y a pas de variation significative entre chaque opérateur.

6. Conclusion

Les résultats sont conformes aux limites d'acceptabilité fixées. Ces résultats confirment par ailleurs la forte incertitude inhérente aux formules manuelles, mais de façon variable selon l'abondance du type cellulaire et de façon compatible avec la pratique clinique et l'intérêt diagnostique du myélogramme.
Pour les seuils décisionnels (blastes notamment), cette validation de méthodes met en évidence la nécessité absolue de recourir à des relectures par un ou plusieurs décomptes.

IV. Confirmation des performances en pratique quotidienne

Pour une méthode manuelle à composantes qualitative et quantitative, la confirmation des performances du laboratoire est complexe.

Comme il s'agit d'une méthode manuelle, le point essentiel est le maintien des performances et la formation continue du personnel de cytomorphologie. Ceci est réalisé grâce à la participation aux confrontations internes cytomorphologiques et aux EEQ par le personnel concerné. Pour notre comparaison inter-laboratoire, nous avons choisi de réaliser un contrôle de 2 lames tous les 3 mois. Ces lames serviront aussi pour les prochains CIQ à partir de fin 2015. Les résultats des biologistes responsables du secteur sont suivis par une note prenant en compte à la fois le diagnostic biologique et les critères quantitatifs/qualitatifs notés.

Les autres points de maîtrise de la qualité des méthodes qualitatives décrits dans le SH GTA 06 sont pris en compte dans l'analyse de risques et maitrisés : conditions environnementales, équipements, qualité de l'étalement du frottis et de la coloration.
Lors du déménagement des laboratoires dans le centre de biologie et de recherche en santé (CBRS), on s'est assuré que les colorations issues de l'automate sont bien standardisées (31), du respect des conditions d'utilisations indiquées par le fournisseur et d'un suivi métrologique correct (via des sondes de températures).

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

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

Les validations de méthodes permettent d'apporter des preuves tangibles sur la qualité des analyses réalisées, la fiabilité des résultats et la compétence du personnel. Il s'agit par ailleurs d'un moyen efficace de maîtrise en continu des performances des méthodes en cours d'utilisation. L'ensemble du processus analytique relatif au myélogramme a été réévalué à cette occasion, ainsi qu'une partie du processus préanalytique lors de l'analyse de risques.

Le myélogramme est un examen cytologique permettant l'analyse qualitative et quantitative des cellules médullaires. Il est le premier élément indispensable permettant le diagnostic et le suivi des hémopathies malignes. La validation de la formule manuelle selon les recommandations du Cofrac est complexe, ne serait-ce que pour la définition du type de méthode, quantitatif ou qualitatif.
Même s'il est surtout important pour une formule médullaire de détecter les cellules anormales de la moelle, il est inconcevable de ne pas tester les performances quantitatives de la méthode. Les paramètres quantitatifs sont indispensables pour établir le diagnostic. Concernant le versant quantitatif, il est nécessaire de prouver que le résultat d'une formule médullaire est similaire quelque soit l'opérateur ayant effectué le décompte (au moins dans sa pertinence clinique). Les résultats de fidélité intermédiaire obtenus à partir des confrontations cytomorphologiques nous permettent de conclure positivement. Cette validation de méthode quantitative de la formule médullaire nous a permis de connaître les performances et les limites de cette méthode, et de confirmer qu'elle participe à la qualité des résultats rendus aux patients. Elle a souligné la nécessité d'un recours à une analyse en double (deux opérateurs) dans certaines situations diagnostiques.

Pour le versant qualitatif, le point crucial est de garantir la meilleure sensibilité possible dans l'identification des cellules hématopoïétiques, le dépistage de cellules anormales et la meilleure homogénéité au sein de l'équipe du service. Nous avons l'antériorité d'un programme de CIQ pour les formules manuelles sanguines, géré en partie par une technicienne référente, en partie par un biologiste. En se basant sur ce principe, la mise en place d'un système de confrontation interne pour les formules médullaires est un

outil puissant et novateur. Il permet de confirmer les performances du laboratoire dans le cadre de la validation initiale et du suivi en continu de ses performances. De plus, il participe à la formation continue et au maintien des compétences du personnel.
De plus, comme nous l'avons précisé précédemment, le Cofrac exige une participation à un programme d'EEQ. Or, jusqu'en début 2015, il n'existait pas d'EEQ myélogrammes à l'échelle nationale, la principale raison étant qu'il est impossible de réaliser suffisamment de frottis médullaires pour développer une EEQ à grande échelle. En effet, la moelle osseuse est un prélèvement précieux obtenu en petite quantité et donc insuffisant pour en faire des échantillons diffusables en de nombreux exemplaires. De plus, les frottis obtenus à partir d'un même échantillon ne sont jamais identiques entre eux. La mise en place de notre programme de comparaison inter-laboratoires est l'un des points les plus novateurs de ce travail. L'excellente participation des biologistes depuis un an est encourageante pour la poursuite de ce projet.
Il existe à présent un programme d'EEQ myélogramme accrédité (ABP) auquel le laboratoire participe mais celui-ci débute et ne contient que 4 lames par an. Donc notre CIL garde tout son intérêt pour le maintien des compétences, en plus de celui de sa dimension régionale : elle nous permet de créer une « banque d'images régionales ». De plus, les perspectives pour la validation continue de la méthode, sont d'utiliser les prochains dossiers de la CIL comme de CIQ pour les opérateurs du laboratoire.
Le relais après mon stage d'internat pour la programmation et l'enregistrement des résultats est en cours de reprise. L'antériorité sur la NFS nous encourage à solliciter le personnel technique. Cependant, le myélogramme est un examen spécialisé réalisé en routine par les biologistes. Ce travail reviendrait alors à un biologiste qui ne pourrait plus y participer ou à un interne.

A l'heure où l'*e-médecine* constitue une part importante de la médecine moderne pour l'informatisation généralisée des données des patients et la mise en réseau de ces informations, la technologie des lames virtuelles en hématocytologie (42), pourrait constituer une avancée majeure. Une lame virtuelle est une reproduction numérique du contenu visuel d'une lame entière « réelle » observée à l'aide d'un microscope motorisé munie d'une caméra relié à une unité informatique. La lecture de la lame se fait sur un écran grâce à un logiciel de visionnage conçu pour reproduire toutes les fonctions d'un microscope optique traditionnel. De cette façon, elle se distingue des photographies

numériques de champs microscopiques qui ne sont que des images statiques et ponctuelles, sélectionnées par un observateur. La microscopie virtuelle offre des avantages considérables à côté de la microscopie traditionnelle dans l'enseignement médical. Une banque de lames virtuelles permet aux utilisateurs de revoir les lames n' importe où et n'importe quand. L'objectif est de reproduire au plus près ce que l'on peut observer au microscope optique. Une bonne qualité de l'image transmise est une condition essentielle à un diagnostic adéquat (42).

En anatomo-pathologie, l'utilisation des lames virtuelles s'est largement développée car les systèmes de numérisation actuels sont parfaitement adaptés à la numérisation aux petits et moyens grossissements (43). L'AFAQAP (association française pour l'assurance qualité en anatomopathologie) a ainsi organisé plusieurs contrôles de qualité. L'utilisation des lames virtuelles en cyto-hématologie est plus problématique puisque l'analyse cytologique nécessite l'utilisation d'un fort grossissement (x60 ou x100 à immersion). De plus, l'un des défis actuels est de mettre à profit les lames virtuelles pour en faire des contrôles de qualité en hématocytologie.

Les avantages de la lame virtuelle sont nombreux :

- l'absence de détérioration au cours du temps
- de multiples utilisateurs à différents endroits peuvent voir la même image simultanément
- les images peuvent être facilement mises en ligne sur internet ou en accès rapide sur un réseau local.
- toutes les fonctions d'un microscope traditionnel sont reproduites grâce au logiciel de visionnage
- l'obtention de champs larges voire de lames entières numérisées surtout intéressant dans des situations particulières comme les moelles pauvres, les moelles d'aplasie ou dans les infiltrations médullaires métastatiques minimes ou l'observation des lames entières est indispensable.

Les limites de la lame virtuelle sont :

- la vitesse de numérisation
- le coût
- la difficulté possible de connexion des utilisateurs

- le manque de standardisation des conditions de numérisations et d'échantillonnage. La qualité des images obtenues dépend du choix de la caméra, vitesse de numérisation, compression du fichier et du système de visualisation.
- la taille des fichiers (problème de stockage) et la lenteur d'ouverture de ceux-ci. La compression des fichiers permettrait de réduire la taille, mais le risque est d'engendrer une perte de la qualité de l'image et d'entrainer des artefacts.

Le laboratoire du CHU de Nancy a travaillé en collaboration avec Biologie Prospective afin de développer une EEQ myélogramme en mettant à profit tous les avantages de la technologie des lames virtuelles (24). Plusieurs étapes ont été nécessaires. Tout d'abord, à partir d'un frottis test numérisé d'une moelle normale, des discordances de l'ordre de 10% entre deux observateurs ont été identifiées et sont liées à un défaut de la qualité de la numérisation. La deuxième étape a été d'optimiser les réglages de façon à obtenir une meilleure qualité de numérisation. Pour la troisième étape, un essai pilote d'une EEQ de myélogramme a été proposé à 6 biologistes. Les z-scores obtenus étaient satisfaisants pour tous les participants. La quatrième étape fut de développer une EEQ totalement automatisée de façon à faciliter l'exploitation des résultats.
L'étude pilote a démarré fin 2014 à l'échelle nationale. L'objectif à terme sera d'étendre le programme à l'international.

L'ABP a mis en place pour la première fois en 2015 une EEQ myélogramme avec 4 dossiers biocliniques par an. Des informations clinico-biologiques orientent le dossier. Les critères de notation se basent sur l'hypothèse diagnostique et le décompte. Les limites acceptables sont différentes de notre EEQ myélogrammes. On se base sur le z-score et on compare nos résultats avec la médiane/moyenne et l'écart type de l'ensemble des réponses et aux résultats attendus.
Les premiers résultats nationaux montrent une participation autour de 120 réponses et globalement de très bons résultats sur le diagnostic et le décompte avec une nette prépondérance de notes A, comme dans notre expérience locale.

CONCLUSION

Le service d'hématologie du CHU de Limoges va demander l'accréditation du myélogramme selon la norme NF EN ISO 15189 pour 2016. Il devra déposer en novembre 2015, un dossier de demande d'accréditation comprenant le dossier de validation de méthode semi-quantitative de la formule médullaire.

C'est dans cet objectif que nous avons mené notre travail au sein du service. Nous nous sommes concentrés sur les deux versants de cette vérification de méthode : l'aspect quantitatif avec le décompte et l'aspect qualitatif de la formule médullaire.

Nous avons validé la formule médullaire. Même s'il s'agit d'une vérification des performances (portée A), la difficulté de cette thèse a reposé sur l'absence initiale de contrôles internes et externes de la qualité pour les myélogrammes. De plus, il s'agit d'une méthode manuelle faisant intervenir un certain nombre d'opérateurs. La mise en place d'un programme de confrontation cytomorphologique et d'une comparaison inter-laboratoire a été l'outil majeur des validations initiales des performances du laboratoire. Pour des raisons pratiques et temporaires d'organisation, les techniciens n'ont pas pu participer à la validation initiale de la méthode. Nous pourrons compter sur eux pour le suivi des performances en continu.
Ces contrôles sont le reflet des pathologies rencontrées en routine au laboratoire. Ils sont aussi efficaces pour la formation continue et le maintien des compétences des biologistes et des internes nouvellement arrivés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
Disponible sur :
http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=id

(2) AFNOR. Norme NF EN ISO 15189 –Laboratoires de biologie médicale-Exigences concernant la qualité et la compétence. Décembre 2012

(3) Décret n°2008-1401 du 19 décembre 2008 relatif à l'accréditation et à l'évaluation de conformité pris en application de l'article 137 de la loi n°2008-776 du 4 août 2008 de modernisation de l'économie.
Disponible sur :
http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000019992087

(4) Loi n°2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale.
Disponible sur :
http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027478077&categorieLien=id

(5) AFNOR. NF EN ISO 9000- Systèmes de management de la qualité-Principes essentiels et vocabulaire. Octobre 2005

(6) Bio Qualité-Vérification et validation des méthodes en biologie médicale.

(7) Cofrac. SH GTA 01-Guide technique d'accréditation en biologie médicale (révision 01). Avril 2015.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63

8) Cofrac. SH REF 02 (révision 04) -Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Septembre 2013.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=60

(9) Cofrac. SH REF 08-Expression et évaluation des portées d'accréditation (révision 00). Mars 2012.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=60

(10) Cofrac. SH INF 50-Portées types d'accréditation (révision 00). Novembre 2013.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=62

(11) Cofrac. SH GTA 04-Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (révision 01). Avril 2015.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63

(12) Cofrac. SH GTA 06-Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale (révision 00). Juin 2012.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63

(13) Cofrac. SH GTA14-Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale (révision 00). Septembre 2011.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63

(14) Vocabulaire international de métrologie-Concepts fondamentaux et généraux et termes associés. JCGM 200 :2012.
Disponible sur : http://www.bipm.org/fr/publications/guides/vim.html

(15) Cofrac. SH FORM 43- Fiche quantitatif - Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale (révision 00). Avril 2015.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=64

(16) Vassault A., Grafmeyer D., De Graeve J. *et al*. Spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. Annales de Biologie Clinique, 1999, 57(6) :685-95.

(17) Ricos C., Alvarez V., Cava F. *et al.* Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 1999,59 :491-500.

(18) Dumontet M. Mise en œuvre, utilisation et exploitation du contrôle de qualité afin d'assurer la validation analytique, la maîtrise métrologique des instruments d'analyses et la détermination de l'incertitude de mesure. Spectra Biologie 2007,157 : 27-36.

(19) Cofrac. LAB INF 19- Liste des organisateurs de comparaison interlaboratoires (révision02). Septembre2014.
Disponible sur : http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=62

(20) Klein JP., Gorsy T. L'accréditation en hématocytologie (de la théorie à la pratique). Revue Francophone des Laboratoires, 2012,441 : 75-89.

(21) Arnoux I. Accréditation en Hématologie cellulaire : Techniques non automatisées. Février 2012.
Disponible sur: http://www.gfhc.fr/upload/activites/pdf_ppt/080212_arnoux.pdf

(22) Imbert M., El Khouri M. La coloration de May-Grünwald-Giemsa. EMC- Biologie médicale, 2006 ; 1-6 (Article 90-15-0035)

(23) LeeI S-H., Porwit A., *et al*. CSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. International journal of laboratory hematology, 2008, 30:349-364.

(24) Zalmai L., Lesesve JF. Applications des lames virtuelles en cyto-hématologie : création d'une banque de cas cytologiques atypiques et mise en place d'une évaluation externe de la qualité du myélogramme sous forme de frottis numérisés. Mémoire du DE de biologie médicale. Nancy: Université de Nancy, 2014.

(25) Binet C., Zandecki M., Dreyfus F. *et al.* Abrégés connaissances et pratiques en Hématologie. Paris : Elsevier-Masson, 2011,3-100p.

(26) Zini G., Bain B., Cortez J. *et al.* A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European Leukemia Net network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. *British Journal of Hematology*, 2010,151: 359-364.

(27) Zandecki M. Principes généraux de lecture du frottis médullaire. Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers.
Disponible sur:
http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/les-cellules-du-sang/apprendre-a-observer-un-frottis-medullaire-et-realiser-un-myelogramme/12-enseignements/134-principes-generaux-de-lecture-du-frottis-medullaire

(28) Benattar L., Flandrin G. Analyse morphométrique, coloration panoptique de May-Grünwald Giemsa et contrôle de qualité. Introduction des méthodes objectives dans l'observation microscopique. John Libbey Eurotext. Volume 4, numéro 3 :233-8, 1998.

(29)Arnoux I., Loosveld M. Accréditation d'un laboratoire d'Hématologie Cytologie. Feuillets de biologie, 2012,307 : 49-59.

(30) Couaillac JP. Expertise du biologiste médical et myélogrammes. Collège d'Hématologie des Hôpitaux. Juin 2012 (Avignon).

(31) Martin C.et al. Contraintes et opportunités pour l'accréditation de la Formule Sanguine au microscope. Spectra biologie, 2013,202 :28-36.

(32) Sauers H., Surrel J. Réglage du microscope pour une observation visuelle (cours : Optique instrumentale Microscopie : Fondamentaux, Institut d'Optique Graduate School-IUT St Etienne).
Disponible sur :
http://www.optique-ingenieur.org/fr/cours/OPI_fr_M03_C03/co/Contenu_09.html

(33) Vardiman JW *et al.* The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009, 114:937-951.

(34) Mufti GJ., Bennett JM., Goasguen J. *et al*. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. Haematologica. 2008, 93:1712–1717

(35) Swerdlow SH., Campo E., Harris NL. *et al*. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC: 2008,439p.

(36) Loi n°2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires. Chapitre VI « Télémédecine ».
Disponible sur :
http://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2009/7/21/2009-879/jo/article_78

(37) Foucard Y. Intégration de l'hématoflow dans le laboratoire d'hématologie. Beckman Coulter.

(38) AFNOR. NF EN ISO/CEI 17043-Evaluation de la conformité-Exigences générales concernant les essais d'aptitude. Avril 2010.

(39) Vassault A. Bioqualité- Accréditation des LBM : Exigences techniques (NF EN ISO 15189) Maîtrise de la phase analytique. Comparaison inter-laboratoire/Evaluation externe de la qualité. Octobre 2011

(40) Cofrac. Document LAB CIL REF 02-Exigences pour l'accréditation des organisateurs de comparaisons interlaboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17043 (révision 03). Mars 2011.
Disponible sur: http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=41

(41) Classification ADICAP
Disponible sur : http://medphar.univ-poitiers.fr/registre-cancers-poitou-charentes/documents_registre/adicap_version5_4_1_2009.pdf

(42) Burthem J., Brereton M., Ardern J. et al. The use of digital 'virtual slides' in the quality assessment of haematological morphology: results of a pilot exercise involving UK NEQAS (H) participants. 2005: 293-296

(43) Ameisen D., Vergier B., Hauchecorne O. et al. Lames virtuelles en ligne 2007 : une technologie au service de nombreuses applications en pathologie. Annales de pathologie, 2008,28 :17-26.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations 8
Introduction 9
Première partie : généralités 10
I. Définition d'une validation/vérification de méthode 10
II. Guides Cofrac nécessaires pour une validation-vérification de méthode 10
1. SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale » (7) et SH REF 02 révision 04 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 » (8) 11
2. SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » (9) et SH INF 50 « Portée type d'accréditation » (10) 12
3. SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) - validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (11) 12
4. SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale » (12) 13
5. SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale » (13) 13
III. Présentation des étapes d'une validation de méthode initiale 14
1. Expression de la portée d'accréditation 14
2. Choix de la portée : A ou B 16
3. Choix d'une portée flexible 16
4. Analyses quantitatives/qualitatives et choix du processus 18
5. Contenu d'un dossier de vérification/validation de méthode 18
5.1. Description de la méthode 19
5.2. Définitions des besoins du laboratoire 20
5.2.1. Recommandations des sociétés savantes 20
5.2.2. Pour les autres paramètres 21
5.3. Vérification bibliographique et expérimentale 21
5.4. Conclusion : déclaration d'aptitude de la méthode 22
6. Vérification expérimentale d'une méthode (portée A) 23
6.1. Fidélité 23
6.1.1. Répétabilité 23
6.1.2. Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire 24
6.2. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude 24
6.3. Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure 26
6.4. Comparaison de méthodes 29
7. Vérification bibliographique d'une validation de méthode (portée A) 30
7.1. Evaluation de la contamination 30
7.2. Robustesse 30
7.3. Vérifications des intervalles de référence biologique (valeurs usuelles) 31

7.4. Sensibilité et spécificité analytique 31
IV. Confirmation des performances en routine 31
1. Les contrôles de qualité en biologie médicale 32
1.1. Exploitation des CIQ 32
1.2. Exploitation des EEQ et des CIQ externalisés 32
2. Suivi des performances pour les méthodes de type quantitatif 34
2.1. Exploitation des CIQ 34
2.2. Exploitation des EEQ 34
2.3. Incertitude de mesure 34
2.4. Intervalle de référence 34
3. Suivi des performances pour les méthodes de type qualitatif 35
3.1. Exploitation des CIQ 35
3.2. Exploitation des EEQ 35
3.3. Maintien des compétences des opérateurs 35
3.4. Maîtrise des conditions environnementales 36
3.5. Maîtrise continue des équipements 36
3.6. Maîtrise de l'échantillon primaire 36
3.7. Maîtrise de la méthode et des réactifs 36
Deuxième partie : objectifs 37
Troisième partie : méthodes et résultats 39
I. Validation d'une méthode relative à une formule manuelle 39
1. Méthode qualitative ou quantitative ? 39
2. Portée A ou B ? 39
II. Validations de méthodes initiales : paramètres qualitatifs 40
1. Objectif - domaine d'application 40
2. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire de la méthode 40
2.1. Prélèvement de moelle osseuse 40
2.2. Enregistrement et traitement des échantillons médullaires 43
2.3. Utilisation du colorateur pour une coloration au May-Grünwald-Giemsa 44
2.4. Analyse des frottis colorés au microscope 44
3. Vérification bibliographique 46
3.1. Spécificité et sensibilité de la coloration MGG standardisée (22) et (28) 46
3.2. Stabilité des réactifs 47
3.3. Robustesse 47
3.4. Comparaison avec la méthode de référence 47
3.5. Autres critères à évaluer selon le GTA 04 47
4. Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier 47
5. Résultats-interprétation 48
5.1. Analyse de risques 48
5.1.1. Étape préanalytique 48

5.1.2. Étape analytique 50
5.1.3. Etape post-analytique 52
5.2. Qualification/habilitation du personnel 52
5.2.1. Habilitation initiale 52
5.2.2. Maintien des compétences 54
5.2.3. Non-conformités (NC) 55
5.3. Suivi des confrontations internes cytomorphologiques et des EEQ 55
5.3.1. Présentation des confrontations internes 56
5.3.2. Résultats 57
5.3.3. Présentation de l'EEQ 60
5.3.4. Perspectives 65
5.3.5. EEQ national 66
6. Conclusion 66
III. Validations de méthodes : paramètres quantitatifs 67
1. Détermination des critères de performance (paramètres) à vérifier 67
2. Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier 67
3. Vérifications bibliographiques 68
4. Plan d'expérience et mise en œuvre au laboratoire 70
5. Résultats, interprétation 70
5.1. Blastes 70
5.1.1. Tableau récapitulatif 70
5.1.2. Conclusion 72
5.2. Erythroblastes 72
5.2.1. Tableau récapitulatif 72
5.2.2. Conclusion 72
5.3. Maturation granuleuse 73
5.3.1. Tableau récapitulatif 73
5.3.2. Conclusion 73
5.4. Plasmocytes 74
5.4.1. Tableau récapitulatif 74
5.4.2. Conclusion 74
5.5. Estimation de la variation inter-opérateurs 75
6. Conclusion 76
IV. Confirmation des performances en pratique quotidienne 77
Quatrième partie : discussion 78
Conclusion 82
Références bibliographiques 83
Table des matières 87
Tables des illustrations 90
Table des annexes 90
Serment de Galien 105

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Table des figures

Figure 1. Représentation de la fidélité (d'après le SH GTA 06) 23
Figure 2. Représentation du biais et de l'inexactitude (d'après le SH GTA 06) 25
Figure 3. Diagramme des 5M (d'après le SH GTA 14) 27

Table des tableaux

Tableau 1. Portées-types d'accréditation en hématocytologie (d'après le SH INF 50) 15
Tableau 2. Paramètres à valider/vérifier pour les méthodes quantitatives et qualitatives (d'après le SH GTA 04) 22
Tableau 3. Valeurs normales de la moelle osseuse du nouveau-né jusqu'à l'âge adulte .. 69
Tableau 4. Résultats de la validation des blastes (formule manuelle) 71
Tableau 5. Résultats de la validation des érythrocytes (formule manuelle) 72
Tableau 6. Résultats de la validation de la maturation granuleuse (formule manuelle) . 73
Tableau 7. Résultats de la validation des plasmocytes (formule manuelle) 74
Tableau 8. Résultats de la variation inter-opérateurs 75

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1. Feuille de suivi de la coloration de May-Grünwald-Giemsa standardisée 91
Annexe 2. Analyse de risques de la formule manuelle médullaire (5 pages) 92
Annexe 3. Tableur Excel pour les confrontations internes cytomorphologiques 97
Annexe 4. Table de Rümke et table de Rümke extrapolée 98
Annexe 5. Accord de CIL pour les EEQ 99
Annexe 6. Feuille de vote sur le forum *Téléslide* 100
Annexe 7. Tableur Excel pour les EEQ de la CIL 101
Annexe 8. Exemple d'un cas de myélome numérisé x10 (dossier du 5 janvier 2015) ... 102
Annexe 9. Exemple d'un cas de myélome numérisé x50 (dossier du 5 janvier 2015) ... 103
Annexe 10. Établissement des limites d'acceptabilité de la répétabilité pour les formules manuelles 104

Annexe 1. Feuille de suivi de la coloration de May-Grünwald-Giemsa standardisée

Technicien (Initiales)	N° lot Giemsa	N° lot May Grunwald	PH de l'eau tamponnée (entre 6-8)	Date	Heure	Validation de la coloration (Initiales)

Annexe 2. Analyse de risques de la formule manuelle médullaire (5 pages)

MAÎTRISE DES RISQUES *(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)*						
Phase	**5M**	**Points critiques**	**Echelle de criticité**		**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire**
Préanalytique	**Matière (échantillons)**	Prescription incluant notamment : - identification univoque du patient - identification du prescripteur - nature des examens prescrits - renseignements cliniques pertinents	D=2 G=3 O=4	Critique	Information des prescripteurs Information des préleveurs externes avec contrôle à réception Vérification systématique de l'identité du patient dans la salle de prélèvement Identification des échantillons par code à barres (lames)	PBH INST 0022 - Charte d'identification du patient ou du résident au CHU de Limoges (PE QRU GRV 001) PBH INST 0024 - Vérification de l'identité du patient à toutes les étapes de sa prise en charge (P QRU GRV 005) PBH ORG 0027 - Convention relative à la réalisation des examens de biologie médicale entre le Laboratoire et les services de soins du CHU de Limoges PBH ORG 0032 - Convention relative à la réalisation d'examens de biologie médicale par le CHU de Limoges PBH PREA 0005 - Manuel de prélèvement Catalogue général des examens de Laboratoire accessibles sur Intranet du CHU et sur Internet RCL PREA 0001 - Réception, tri et vérification de la conformité des échantillons biologiques LHEM PREA 0009 - Critères d'acceptation et de rejet des échantillons primaires
		Prélèvement des échantillons primaires et notamment : - identification du patient - préparation du patient - nature, site anatomique d'origine et volume d'échantillons à prélever - type de contenants - conditionnement dans des boîtes de transport - date de prélèvement	D=2 G=3 O=4	Critique	Information des préleveurs externes avec contrôle à réception Formation des préleveurs internes Vérification systématique de l'identité du patient dans la salle de prélèvement Identification des échantillons par code à barres (lames)	PBH INST 0022 - Charte d'identification du patient ou du résident au CHU de Limoges (PE QRU GRV 001) PBH INST 0024 - Vérification de l'identité du patient à toutes les étapes de sa prise en charge (P QRU GRV 005) PBH ORG 0027 - Convention relative à la réalisation des examens de biologie médicale entre le Laboratoire et les services de soins du CHU de Limoges PBH ORG 0032 - Convention relative à la réalisation d'examens de biologie médicale par le CHU de Limoges PBH PREA 0032 - Conditionnement et acheminement des échantillons primaires au laboratoire PBH PREA 0005 - Manuel de prélèvement Catalogue général des examens de Laboratoire accessibles sur Intranet du CHU et sur Internet CDP PREA 0024 - Instruction Prélèvement de moëlle osseuse CDP PREA 0027 - Myélogramme - Enregistrement des échantillons médullaires PBH PREA 0001 - Procédure Réception et enregistrement des échantillons primaires RCL PREA 0001 - Réception, tri et vérification de la conformité des échantillons biologiques LHEM ACYTO 0016 - Instruction Enregistrement et traitement des échantillons médullaires LHEM PREA 0009 - Critères d'acceptation et de rejet des échantillons primaires
		Prétraitement : coloration des frottis	D=2 G=3 O=1	Peu critique	Utilisation du colorateur	LHEM A CYTO 0021 - Utilisation du colorateur pour coloration de May-Grünwald-Giemsa

MAÎTRISE DES RISQUES *(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)*						
Phase	**5M**	**Points critiques**	**Echelle de criticité**		**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire**
Préanalytique	**Méthode**	Enregistrement du dossier dans le SIL	D=2 G=3 O=1	Peu critique	Enregistrement des échantillons au Centre de prélèvement ou à réception au Laboratoire Formation du personnel à la réception	CDP PREA 0024 - Instruction Prélèvement de moelle osseuse PBH PREA 0001 - Procédure de réception et d'enregistrement des échantillons au Laboratoire RCL PREA 0014 - Instruction incluant la vérification de la saisie manuelle informatique LHEM ACYTO 0016 - Instruction Enregistrement et traitement des échantillons médullaires Mise en place d'une saisie automatisée par scan RCL PREA 0009 - Scan bac : saisie d'une demande d'analyse
	Main d'œuvre (personnel)	Compétences et maintien des compétences du personnel	D=3 G=3 O=1	Peu critique	Formation et habilitation du personnel interne en charge du prélèvement, de l'aide au prélèvement de moelle osseuse, de l'enregistrement et de la coloration des frottis	PBH GRH 0002 - Procédure d'habilitation et de maintien des compétences du personnel PBH GRH 0034 - 111 - Fiche de poste Aide technique pour le réalisation de prélèvements de moelle osseuse PBH GRH 0034 - 142 - Fiche de poste Réalisation de prélèvements de moelle osseuse LHEM GRH 0027 Fiche de poste Cytologie garde incluant la réalisation de la coloration au May-Grünwald-Giemsa PBH GRH 0003 - 169 Fiche de poste Saisie des prélèvements biologiques (routine, urgence)
	Milieu	Conditions de conservation des réactifs (température,...)	D=2 G=3 O=1	Peu critique	Suivi de la température de stockage des colorants	Fiches fournisseurs et instructions de conservation des réactifs Manuel d'utilisation de l'automate PBH MAT 0008 - Procédure Métrologie - Surveillance des équipements de mesure critiques Logiciel Sirius ®

MAÎTRISE DES RISQUES *(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)*						
Phase	**5M**	**Points critiques**	**Echelle de criticité**		**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire**
Préanalytique	**Matériel (équipements)**	Fonctionnement du colorateur	D=2 G=3 O=1	Peu critique	Maîtrise de l'équipement (planification des maintenances préventives,...)	Suivi des maintenances préventives et correctives sur fiche de suivi LHEM MAT 0010 PBH A 0002 - Procédure d'évaluation interne et externe de la qualité - Organisation des contrôles LHEM ACYTO 0021 Utilisation du colorateur pour coloration MGG LHEM ACYTO 0022 Formulaire de suivi des colorations MGG
		Qualité de l'eau tamponnée	D=2 G=3 O=2	Peu critique	pH entre 6 et 8 pour la coloration MGG standardisée	LHEM ACYTO 0021 Utilisation du colorateur pour coloration MGG LHEM ACYTO 0022 Suivi coloration May-Grünwald-Giemsa
	Matériel (réactifs)	Conditions de reconstitution et d'utilisation des colorants utilisés dans le cadre du prétraitement de l'échantillon	D=2 G=3 O=2	Peu critique	Suivi de la température interne du colorateur Respect du mode opératoire de reconstitution et d'utilisation des colorants Absence de dépôts ou de cristallisation des colorants au niveau des bacs Renouvellement fréquent des colorants avant utilisation	Fiches fournisseurs et instructions de reconstitution et de d'utilisation des colorants PBH MAT 0008 - Procédure Métrologie - Surveillance des équipements de mesure critiques Logiciel Sirius ® PBH A 0002 - Procédure d'évaluation interne et externe de la qualité - Organisation des contrôles LHEM ACYTO 0021 Utilisation du colorateur pour coloration May-Grünwald-Giemsa LHEM ACYTO 0022 Suivi coloration May-Grünwald-Giemsa
		Gestion des stocks des réactifs et consommables utilisés dans le cadre du prétraitement de l'échantillon	D=2 G=3 O=1	Peu critique	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	PBH SEA 0001 - Procédure d'approvisionnement PBH SEA 0002 - Procédure de sélection et d'évaluation des fournisseurs critiques LHEM SEA 0011 - Approvisionnement en réactifs et consommables LHEM ACYTO 0022 - Suivi coloration May-Grünwald-Giemsa LHEM SEA 0012 - Fiche réactif

MAÎTRISE DES RISQUES *(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)*						
Phase	**5M**	**Points critiques**	**Echelle de criticité**		**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire**
Analytique	**Milieu**	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	D=2 G=3 O=2	Peu critique	Travail au calme	Pièce dédiée à la lecture au microscope
	Matériel (équipements)	Fonctionnement du microscope	D=2 G=3 O=1	Peu critique	Maîtrise des microscopes (planification des maintenances préventives...)	PBH ORG 0028 - Convention de collaboration Laboratoire - Département Technique Biomédical Organisation et suivi des maintenances préventives et correctives LHEM MAT 0037 - Maintenance microscopes
	Méthode	Saisie des résultats dans le SIL	D=2 G=3 O=3	Critique	Décompte et transmission de la formule et des commentaires / conclusion	PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques LHEM ACYTO 0031 Validation biologique secteur cytologie spécialisée incluant la vérification des saisies manuelles des commentaires et interprétations Décompte sur compteur SIL, identification des frottis par lecture code à barres
		Causes d'incertitude de mesure: - étalement des frottis - coloration - lecture au microscope	D=2 G=3 O=4	Critique	Formation et habilitation des préleveurs internes Maîtrise du colorateur et des réactifs Formation et habilitation des lecteurs avec vérification de la variabilité inter-lecteurs	Voir chapitre "Evaluation des performances de la méthode" : - Encadré "Incertitudes de mesure" : Bibliographie et/ou essai sur site PBH GRH 0034 - 111 - Fiche de poste Aide technique pour le réalisation de prélèvements de moëlle osseuse PBH GRH 0034 - 142 - Fiche de poste Réalisation de prélèvements de moëlle osseuse LHEM GRH 0027 Fiche de poste Cytologie garde incluant la réalisation de la coloration au May-Grünwald-Giemsa PBH A 0002 - Procédure d'évaluation interne et externe de la qualité - Organisation des contrôles Programme de confrontations internes cytomorphologiques : CIQ et EEQ organisé via CIL régionale (LHEM ACYTO 0038) Lecture en double des cas difficiles
	Main d'œuvre (personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel en charge de la lecture microscopique	D=3 G=3 O=1	Peu critique	Formation, habilitation et maintien des compétences du personnel en charge de la lecture microscopique	PBH GRH 0002 - Procédure d'habilitation et de maintien des compétences du personnel LHEM GRH 0026 Fiche de poste Cytologie spécialisée microscope PBH A 0002 - Procédure d'évaluation interne et externe de la qualité - Organisation des contrôles Programme de confrontations internes cytomorphologiques : CIQ et EEQ organisé via CIL régionale (LHEM ACYTO 0038)

MAÎTRISE DES RISQUES *(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)*						
Phase	**5M**	**Points critiques**	**Echelle de criticité**		**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maîtrise / Documents avec les références du SMQ du laboratoire**
Post-analytique	**Milieu**	Conservation des lames	D=4 G=2 O=1	Peu critique	Classement en lamothèque	LHEM ACYTO 0029 - Instruction Lecture d'un frottis de moëlle osseuse incluant la conservation des lames
	Main d'œuvre (personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel en charge de l'interprétation et de la validation biologique du résultat	D=3 G=3 O=1	Peu critique	Formation, habilitation et maintien des compétences du personnel en charge de l'interprétation et de la validation biologique du résultat	PBH GRH 0002 - Procédure d'habilitation et de maintien des compétences du personnel LHEM GRH 0085 Fiche de poste Cytologie Biologiste 1 (Validation cytologie spécialisée) Programme de confrontations internes cytomorphologiques : CIQ et EEQ organisé via CIL régionale (LHEM ACYTO 0038)
	Matériel (équipements)	Serveur de diffusion informatique des résultats d'examens: interface	D=3 G=3 O=1	Peu critique	Paramétrage et vérification des connexions informatiques Transferts de données informatiques entre: Glims, Cyberlab	PBH INF 0001 - Procédure Utilisation et maintenance des systèmes informatiques incluant les modalités de vérification des connexions informatiques PBH INF 0005 - Procédure de sécurité des systèmes informatiques PBH INF 0019 - Instruction Conventions de preuves LHEM INF 0010 Instruction décrivant les tests réalisés
		Conservation des résultats d'examens sans détérioration permettant le suivi du patient	D=4 G=3 O=1	Peu critique	Sauvegardes des résultats d'examens permettant d'assurer le suivi des patients	PBH INF 0005 - Procédure de sécurité des systèmes informatiques LHEM QUA 0012 - Instruction Classement et archivage des documents et enregistrements incluant les modalités d'archivage des résultats bruts

Annexe 3. Tableur Excel pour les confrontations internes cytomorphologiques

	FT	EG	JC	moyenne biologistes	écart type	CV (%)	fourchettes acceptées		valeurs de référence	biais biologiste (%)
nom du contrôle CQ1										
Paramètres quantitatifs										
Pro-érythroblastes	2	0,5	0	1,00	1,41	141,42	0,0	5,3	1,00	
Erythroblastes basophiles	2,5	0,5	1	1,75	1,06	60,61	0,2	6,7	1,75	
Erythroblastes polychromatophiles	12	8	1,5	6,75	7,42	109,99	2,6	13,6	6,75	
Erythroblastes acidophiles	17,5	19	15	16,25	1,77	10,88	9,4	24,7	16,25	
Erythroblastes totaux	34	28	17,5	25,75	11,67	45,31	17,4	35,1	25,75	
Myeloblastes	2,5	1,5	2	2,25	0,35	15,71	0,4	7,5	2,25	
Promyélocytes	16	2,5	18	17,00	1,41	8,32	10,0	25,5	17,00	
Myélocytes neutrophiles	9	21	11,5	10,25	1,77	17,25	4,9	17,8	10,25	
Métamyélocytes neutrophiles	8	11	14	11,00	4,24	38,57	5,4	18,7	11,00	
PNN	19	22,5	25,5	22,25	4,60	20,66	14,3	31,3	22,25	
Myélocytes éosinophiles	0	2	1	0,50	0,71	141,42	-0,1	5,0	0,50	
Métamyélocytes eosinophiles	0	0	0	0,00	0,00	#DIV/0!	0,0	5,0	0,00	
PN eosinophiles	0	0	0	0,00	0,00	#DIV/0!	0,0	5,0	0,00	
PN basophiles	0,5	0,5	0	0,25	0,35	141,42	-0,1	5,0	0,25	
Granuleux totaux	55	61	72	63,50	12,02	18,93	54,9	75,1	63,50	
Lymphocytes	5	6,5	7,5	6,25	1,77	28,28	2,3	13,0	6,25	
Plasmocytes	3	1,5	1	2,00	1,41	70,71	0,3	7,1	2,00	
Monocytes	3	2,5	1,5	2,25	1,06	47,14	0,4	7,5	2,25	
Blastes	0	0,5	1	0,50	0,71	141,42	-0,1	5,0	0,50	
cellules anormales	0	0		0,00	#DIV/0!	#DIV/0!	0,0	5,0	0,00	
Paramètres qualitatifs										
Richesse (0 diminuée 1 Normale 2 augmentée)	1	1	1							
Mégacarycoytes (0 absents , 1 présents et 2 augmentée)	1	1	1							
Histiocytes(0 abs, 1 présents et 2 hémagophagocytants)	0	0	0							
Dyérythropoiese(0 abs, 1 significative et 2 majeure)	0	0	0							
Dysgranulopoiese(0 abs,1 significative et 2 majeure)	0	0	0							
Dysmégacaryocytopoiese(0 abs, 1 significative et 2 majeure	0	0	0							
Commentaires éventuels	excès de promyélocytes	Moelle N	Méga hypolobés parfois Discrète dysG							
Conclusion	H869									

Annexe 4. Table de Rümke et table de Rümke extrapolée

- Table de Rümke

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

Tableau statistique présentant, en fonction du nombre de cellules comptées et du pourcentage cellulaire réel, un intervalle de valeurs dans lequel le décompte est juste.
Par exemple pour un pourcentage cellulaire réel à 20%, il est possible de dénombrer sans commettre d'erreur entre 12,7% et 29,2% de ces cellules si la formule est effectuée sur 100 éléments, ou entre 14,7% et 26,2% si 200 éléments sont comptés.

- Table de Rümke extrapolée, adaptée à tous les pourcentages cellulaires pour une formule effectuée sur 100 éléments :

% vrai	cellules comptées (%)	
	limite basse	limite haute
0	0	5,3
1	0	5,3
2	0,3	7,1
3	0,7	8,6
4	1,1	10
5	1,6	11,4
6	2,2	12,6
7	2,8	13,9
8	3,4	15,1
9	4,1	16,3
10	4,7	17,5
11	5,4	1837
12	6,1	19,8
13	6,9	21
14	7,6	22,1
15	8,4	23,2
16	9,2	24,4
17	10	25,5
18	10,8	26,6
19	11,6	27,7
20	12,4	28,8
21	13,2	29,9
22	14,1	31
23	14,9	32,1
24	15,8	33,2
25	16,7	34,3

% vrai	cellules comptées	
	limite basse	limite haute
26	17,6	35,4
27	18,5	36,5
28	19,4	37,6
29	20,3	38,6
30	21,2	39,7
31	22,1	40,8
32	23	41,9
33	24	42,9
34	24,9	44
35	25,9	45,1
36	26,8	46,1
37	27,8	47,2
38	28,7	48,3
39	29,7	49,3
40	30,7	50,4
41	31,7	51,5
42	32,6	52,5
43	33,6	53,6
44	34,6	54,6
45	35,6	55,7
46	36,6	56,8
47	37,7	57,8
48	38,7	58,9
49	39,7	59,9
50	40,7	61

% vrai	cellules comptées	
	limite basse	limite haute
51	41,7	62
52	42,8	63,1
53	43,8	64,1
54	44,8	65,2
55	45,9	66,2
56	46,9	67,3
57	48	68,3
58	49	69,4
59	50,1	70,4
60	51,2	71,5
61	52,2	72,5
62	53,3	73,5
63	54,4	74,6
64	55,5	75,6
65	56,5	76,7
66	57,6	77,7
67	58,7	78,8
68	59,8	79,8
69	60,9	80,8
70	62	81,9
71	63,1	82,9
72	64,2	84
73	65,3	85
74	66,4	86
75	67,5	87,4

% vrai	cellules comptées	
	limite basse	limite haute
76	68,6	88,1
77	69,7	89,1
78	70,8	90,2
79	72	91,2
80	73,1	92,3
81	72,2	93,3
82	75,3	94,3
83	76,5	95,4
84	77,6	96,4
85	78,7	97,4
86	79,9	98,5
87	81	99,5
88	82,2	100
89	8,3	100
90	84,5	100
91	85,6	100
92	86,8	100
93	87,9	100
94	89,1	100
95	90,2	100
96	91,4	100
97	92,6	100
98	93,7	100
99	94,9	100
100	96,1	100

Annexe 5. Accord de CIL pour les EEQ

	EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE - Accord de collaboration pour COMPARAISON INTER-LABORATOIRES Enregistrement	PBH A 0012 B Date application : 18/04/2014 **PBH A 0012 - 000** Page 1/6

Le présent document établit et précise le rôle de chaque partie dans le cadre de la mise en place de comparaisons interlaboratoires, entre le Laboratoire du CHU de Limoges et un ou plusieurs laboratoires extérieurs.

I. DOCUMENTS DE REFERENCE *(choisir en fonction des besoins)*

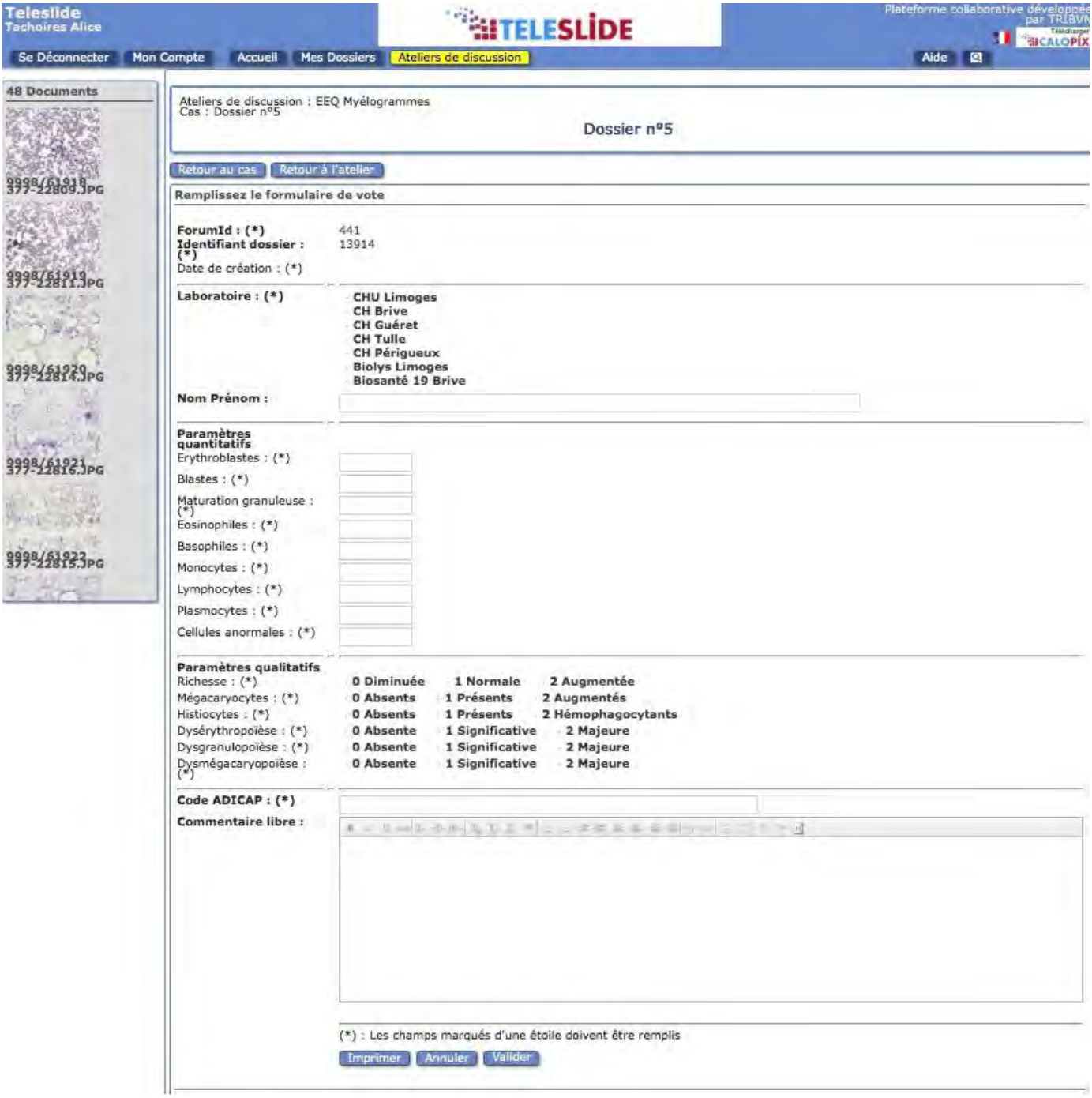
- **Norme NF EN ISO 15189** - *version en vigueur*
- **Document COFRAC SH REF 02** - *version en vigueur*
- **Document COFRAC SH GTA 06** - *version en vigueur*
- **Document COFRAC SH REF 08** - *version en vigueur*

Partie 1	Partie 2	Partie 3	Partie 4	Partie 5	Partie 6	Partie 7

1- COORDONNEES

Organisme	CHU Dupuytren	CH Guéret	CH Brive	Biosanté 19	Biolyss	CH Périgeux	CH Tulle
Laboratoire	Laboratoire hospitalier **Organisateur et participant**	Laboratoire hospitalier **Participant**	Laboratoire hospitalier **Participant**	Laboratoires privés **Participants**		Laboratoire hospitalier **Participant**	Laboratoire hospitalier **Participant**
Service	Hématologie	Polyvalent	Polyvalent	Polyvalent	Polyvalent	Polyvalent	Polyvalent
Secteur technique	Cytologie	Cytologie	Cytologie	Cytologie	Cytologie	Cytologie	Cytologie
Adresse	2 avenue Martin Luther King 87000 Limoges	39 avenue de la Sénatorerie 23000 Guéret	1 boulevard du docteur Verlhac 19312 Brive La Gaillarde	13 avenue Pierre Semard 19100 Brive	Multisites (9)	80 avenue Georges Pompidou 24019 Périgueux	3 place Maschat 19012 Tulle
Interlocuteurs	F.Trimoreau A.Tachoires	ML.Destain P.Perroud	C.Renoir A. Sommabere L. Guindre	V.Leymarie P.Chambon B.Chassain	JM Filloux I.Lenoir C.Aupetit	R. Sanchez	MC. Petit
Téléphone	0555056180	0555517025	0555926016	0555875063	0555454500	0553452610	0555297948

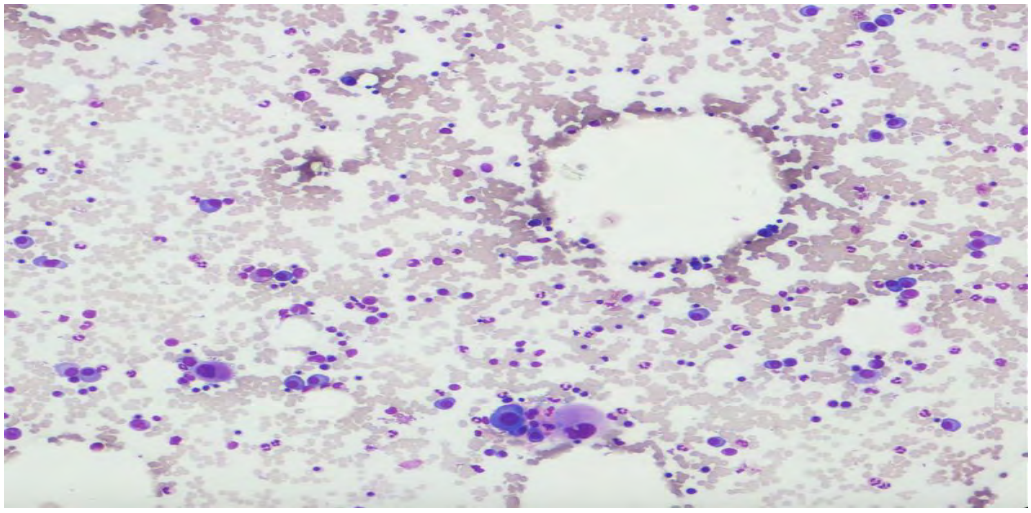
Annexe 6. Feuille de vote sur le forum *Téléslide*

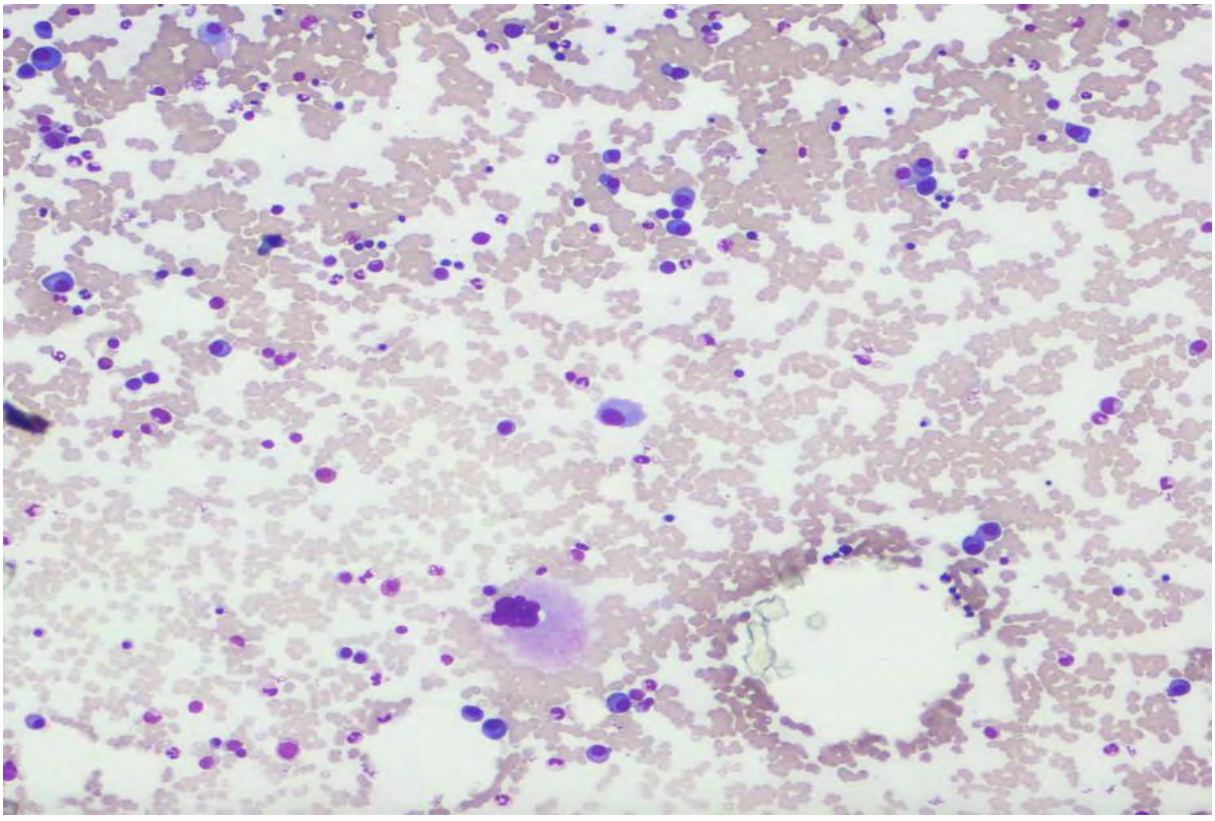


Annexe 7. Tableur Excel pour les EEQ de la CIL

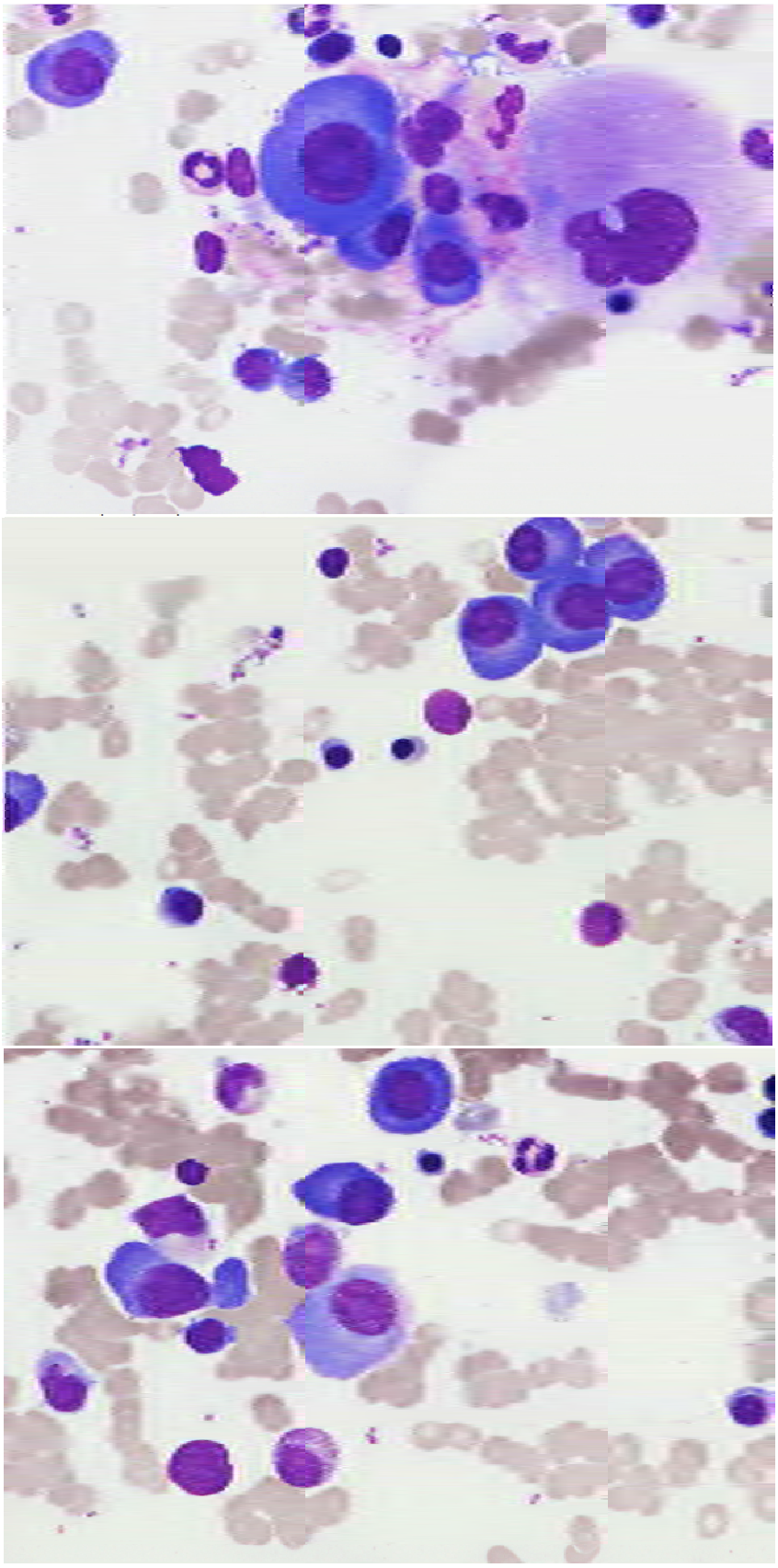
CIL MYELOGRAMMES REGION LIMOUSIN																	
Dossier n°6																	
Paramètres quantitatifs (%)	**CH1**	**CH2**	**CH3**	**CH4**	**CH5**	**CH6**	**CH7**	**CH8**	**CH9**	**CH10**	**CH11**	**CH12**	**CH13**	**CH14**	**Moyenne**	**Fourchettes acceptées (valeurs basses)**	**Fourchettes acceptées (valeurs hautes)**
Conformité pour chaque item : résultat dans l'intervalle donné par la table de Rümke à partir de la moyenne du groupe de pairs																	
Erythroblastes (%)	6,5	12	7,5	11	16	10	15	14	8	9	12	8	8	7	10,29	5	18
Blastes (%)	4	3	3,5	2,5	0	3	2	2	5	5	0	2	3	3	2,71	1	8
Maturation granuleuse (%)	87	80	85,5	84	80	82	78	81	83	82	85	86,5	83,5	86	83,11	78	95
Eosinophiles (%)	0,5	1	0,5	0,5	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1,18	0	6
Basophiles (%)	0,5	0	0,5	0,5	1	1	1	0	1	0,5	0	0,5	0	1	0,54	0	5
Monocytes (%)	0,5	2	1	0,5	0	1	2	1	1	2	1	1	1,5	1	1,11	0	6
Lymphocytes (%)	0,5	2	1,5	1	1	1	0	1	1	0,5	1	0	3	1	1,04	0	5
Plasmocytes (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0	5
Cellules anormales (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0	5
Note 1 (1 point si > 4 items conformes)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
Paramètres qualitatifs (0, 1, 2)																	
Conformité pour chaque item : moyenne du groupe de pairs																	
Richesse 0 diminuée 1 normale 2 augmentée	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Mégacaryocytes 0 absents 1 présents 2 augmentés	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Histiocytes 0 abs 1 présents 2 hémophagocytants	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
Dysérythropoïèse 0 abs 1 significat 2 majeure	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Dysgranulopoïèse 0 abs 1 significat 2 majeure	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0		
Dysmégacaryopoïèse 0 abs 1 significat 2 majeure	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Note 2 (1 point si > ou = 3 items conformes)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
															Code consensus	**Autres codes possibles**	
Code Adicap	H300	H290	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H300	H290	
Conformité : code consensus ou autre code possible																	
Note 3 (2 points si satisfaisant, 1 point si diagnostic discutable,0 points si insatisfaisant,)	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
Note finale (A = 4 ou 3, B = 2; C <2)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			

Annexe 8. Exemple d'un cas de myélome numérisé x10 (dossier du 5 janvier 2015)





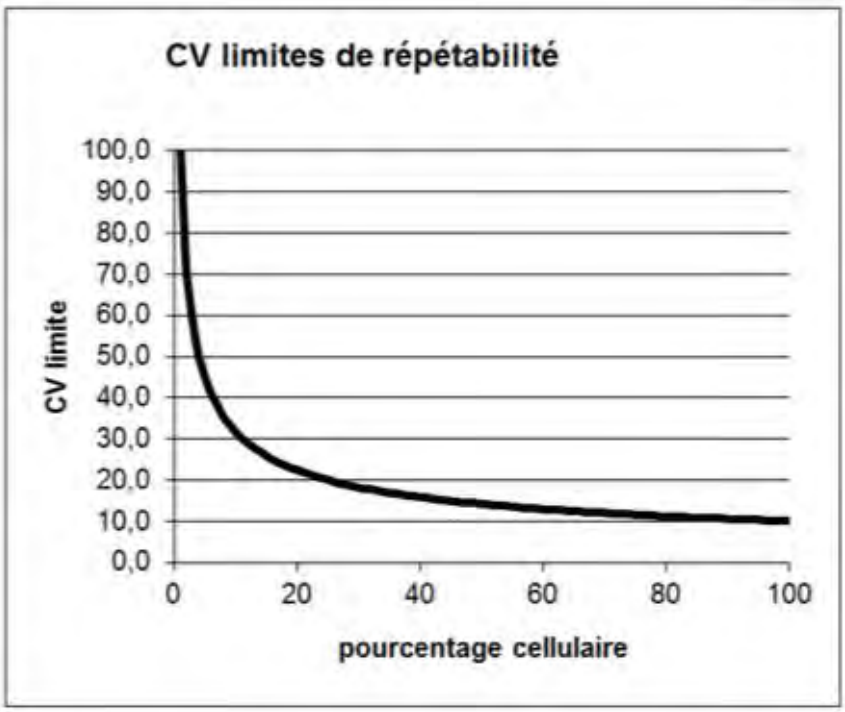
Annexe 9. Exemple d'un cas de myélome numérisé x50 (dossier du 5 janvier 2015)



Annexe 10. Établissement des limites d'acceptabilité de la répétabilité pour les formules manuelles

Graphique représentant la droite d'équation :

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{x}} \times 100$$



SERMENT DE GALIEN

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

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

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

Alice Tachoires 2015 TOU3 2069

INITIAL VALIDATION AND CONTINUOUS VERIFICATION OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE METHODS RELATED TO BONE MARROW CELLS

Abstract

Ordinance No. 2010-49 of 13 January 2010 concerning medical biology requires the accreditation of all French laboratories according to DIN EN ISO 15189.

This thesis presents the approach and results of method validations performed for the manual bone marrow cells counts. The bone marrow examination is an essential investigation for the diagnosis and management of many disorders of the blood and bone marrow.

These method validations allow us to determine the performance and limitations of manual bone marrow cells counts in the laboratory hematology. Validation includes an initial phase and a phase of continuous verification of performance thanks to quality controls management. Participation in external and internal quality assurance schemes for both technical and interpretative elements of BM examination, are encouraged and recommended to ensure accuracy, reproducibility and standardization.

Alice Tachoires 2015 TOU3 2069

Date et lieu de soutenance : 12 octobre 2015 à Limoges

VALIDATION INITIALE ET SUIVI CONTINU DES PERFORMANCES DES MÉTHODES QUANTITATIVES ET QUALITATIVES RELATIVES AU MYÉLOGRAMME

Résumé

Dans le cadre de la démarche d'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO 15189, le secteur d'hématocytologie du CHU de Limoges souhaite accréditer le myélogramme.

Il s'agit d'une méthode manuelle, notre travail présente deux versants : l'un qualitatif avec la détection et la reconnaissance des cellules anormales de la moelle dans les échantillons pathologiques, l'autre quantitatif représenté par la numération des paramètres relatifs aux cellules hématopoïétiques normales. Pour la validation initiale et le suivi en continu des performances, l'aspect novateur de ce travail a été la création d'une confrontation interne cytomorphologique et la mise en place d'une comparaison inter-laboratoire au niveau régional. Les contrôles internes et externes de la qualité qui en découlent, permettent d'assurer le maintien des performances et la formation continue du personnel.

Discipline administrative : pharmacie - biologie médicale

Mots-clés : myélogramme, validation, vérification, quantitatif, qualitatif, confrontations internes, comparaison inter-laboratoire

Intitulé et adresse du laboratoire :

Service d'hématologie biologique

Centre de biologie et de recherche en santé (CBRS)

2, avenue Martin Luther King

87042 Limoges Cedex

Directeur de thèse : M. le Dr Franck Trimoreau