

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTÉ DE MÉDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMÇEN



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة أبو بكر بلقايد
كلية الطب
د. ب. بن زرجب - تلمسان

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

THÈME :

***AUTOMATISATION ET CONTRÔLE DE QUALITE EN
HEMOSTASE***
EXPERIENCE DU LABORATOIRE D'HEMOBIOLOGIE CHU TLEMÇEN

Présenté par :

AZZI Zeyneb

SADOK Soumya

Encadré par :

Pr. K. ALLAL TAOULI

Soutenu le 7 Juillet 2013

Président de jury : **Pr. A. GHAF FOUR**

Les membres de jury :

**Pr. Y. HAREK
Dr. N. MERAD
Dr. F. ADDA**

Année Universitaire : 2012 / 2013

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Pr. A.GHAFFOUR, Pr. N.MERAD, Pr.Y.HAREK et Dr.F.ADDA d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous souhaitons remercier tout particulièrement le Pr.K.ALLAL TAOULI, notre encadreur.

Nous exprimons notre gratitude à tout le personnel du service d'hémodiagnostic CHU Tlemcen qui a accepté de répondre à nos questions avec gentillesse et cœur ouvert.

Nous adressons nos chaleureux remerciements à tous les étudiants de pharmacie et tous les professeurs qui nous ont formés dès le premier jour jusqu'à la fin de notre cursus plus particulièrement à Dr.N.ABOUREJAL.

Un énorme merci à toutes les personnes dont l'aide a permis l'avancement de ce travail en particulier Hassen Aicha et Amara Asma.

Ce travail est dédié à nos parents ; nos frères Abdellah, Djamel, Zakaria et Abdelmalek ; nos sœurs Safia, Hadjer, Kawtar, Meriem, Khadidja et Oum-elkeir et à chaque membre de nos immenses familles.

LISTE DES FIGURES

Fig.1: Principe électromécanique.

Fig.2: Un automate d'Hémostase parfaitement adapté à la routine et aux tests spécialisés.

Fig.3: Analyseur semi automatique de paillasse.

Fig.4: STA Compact[®], vue globale.

Fig.5: Cycle analytique sur STA Compact[®].

Fig.6: Tiroir échantillons.

Fig.7: Tiroir produits.

Fig.8: Platine mesure.

Fig.9: STA Compact[®] vue de droite.

Fig.10: Schéma mouvement de la bille.

Fig.11: Principe physique du système de mesure.

Fig.12: Principe de mesure d'absorbance.

Fig.13: Courbe de Thyvolle.

Fig.14: Pourcentage des anomalies les plus fréquentes pour prélèvement d'hémostase.

Fig.15: Diagramme de Levey-Jennigs pour 22 résultats de contrôle de dosage du TP en seconde.

Fig.16: Diagramme de Levey-Jennigs pour 22 résultats de contrôle de dosage du TCA en seconde.

Fig.17: STA-CQE du TP (sec) et TP (%) en 2004.

Fig.18: STA-CQE du TCA silice (sec) en 2008.

Fig.19: STA-CQE du TP (sec) et TP (INR) en 2008.

Fig.20: Diagramme logique d'application d'une série de contrôle dans le procédé multi-règles de Westgard.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
OBJECTIFS DU TRAVAIL	3
BIBLIOGRAPHIE	4
I.HISTORIQUE	4
II.DIFFERENTES TECHNIQUES DE MESURE EN HEMOSTASE	5
II.1. Techniques manuelles	6
II.2. Techniques électromécaniques	6
II.3. Techniques optiques	7
II.3.1. Principe néphélométrique	7
II.3.2. Principe chromogène	8
II.3.3. Principe immunologique	8
II.4. Techniques fondées sur la viscoélasticité	9
III. AUTOMATISATION EN HEMOSTASE	9
III.1. Critères de choix d'un automate en hémostase	9
III.2. Avantages des automates en hémostase	10
III.3. Différents automates en hémostase	11
III.3.1. L'agrégamètre	11
III.3.2. Le STA compact	11
III.3.3. Le ST art	12
IV. CONTRÔLE QUALITE EN HEMOSTASE	14
IV.1. Définition	14
IV.2. Les moyens de contrôle qualité dans le laboratoire d'hémostase	14
IV.2.1. Organisation du laboratoire	14
IV.2.1.1. Guide de Bonne Exécution des Analyses GBEA	14
IV.2.1.2. Normes ISO	15
IV.2.2. Outils biologiques	16
IV.2.2.1. Echantillons biologiques plasmatiques	16
IV.2.2.2. Etalons	17
IV.2.2.3. Réactifs	17
IV.2.2.4. Les tests d'hémostase analysés en contrôle de qualité	17

IV.2.3. Outils statistiques	18
IV.2.3.1. Étalonnage (ou calibration)	18
IV.2.3.2. Erreurs de mesure	18
IV.2.3.3. Exactitude ou justesse	19
IV.2.3.4. Précision et dispersion	19
IV.2.3.5. Répétabilité (intra série)	20
IV.2.3.6. Reproductibilité (inter série)	20
IV.2.3.7. Quelques notions à vérifier au cours de l'étude des automates	20
IV.3. Démarches du contrôle qualité en hémostase	22
IV.3.1. Phase préanalytique	22
IV.3.2. Phase analytique	30
IV.3.3. Phase postanalytique	34
IV.4. Contrôle de qualité	34
IV.4.1. Contrôle de qualité interne	34
IV.4.2. Contrôle de qualité externe	35
MATERIELS ET METHODES	37
I. MATERIELS	37
I.1. Population témoin	37
I.2. Prélèvement	37
I.3. STA Compact®	37
I.3.1. Définition	37
I.3.2. Procédure d'installation	37
I.3.3. Description du système STA Compact®	38
I.3.3.1. STA Compact® vue globale	38
I.3.3.2. Cycle analytique sur STA Compact®	39
I.3.3.3. Principe de mesure	42
I.3.3.3.1. En chronométrie	42
I.3.3.3.2. En colorimétrie	44
II. METHODES	45
II.1. Préparation du STA Compact	45
II.2. Chargement des produits et échantillons	46
II.3. Déchargement des échantillons ou des produits	47
II.4. Maintenance	47
II.5. Lancement des analyses (fermeture du tiroir échantillons ou produits)	48

II.6. Calibration	48
II.7. Contrôle de qualité	49
II.7.1. Contrôle de qualité interne	49
II.7.2. Contrôle de qualité externe	50
II.8. Lancement des tests d'hémostase	51
II.1.1. Temps de Quick (TQ)	51
II.1.2. Temps de céphaline activée (TCA)	53
II.1.3. Dosage du Fibrinogène	54
RESULTATS	56
I. CALCUL DES VALEURS DE REFERENCE	56
II. ANALYSE DES RESULTATS DE CONTROLE DE QUALITE	56
II.1. Distribution des prélèvements non conformes en hémostase	56
II.2. Interprétation des résultats de contrôle de qualité interne	57
II.3. Interprétation des résultats de contrôle de qualité externe	58
DISCUSSION GENERALE	64
CONCLUSION	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69
ANNEXES 1	71
ANNEXES 2	75
ANNEXES 3	90
ANNEXES 4	92
ANNEXES 5	94

INTRODUCTION

L'hémostase est une fonction physiologique normale fréquemment mise en œuvre dans le système cardiovasculaire afin d'en garantir son intégrité. D'une manière générale, c'est l'ensemble des mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies lors de la rupture d'une paroi vasculaire par la formation d'un caillot puis sa dissolution. Les différents éléments, protagonistes sont présents dans le sang circulant mais cet équilibre est précaire et peut laisser place à des désordres hémorragiques ou thrombolytiques.

L'étude de l'hémostase fait appel à des techniques très variables en fonction de l'étape du processus hémostatique que l'on souhaite explorer : hémostase primaire, coagulation ou fibrinolyse.

Pendant très longtemps, les tests d'hémostase ont été réalisés au bain-marie à 37°C en se basant sur la détection visuelle d'un trouble lié à l'apparition du caillot et le changement de consistance obtenu après agitation en tube de verre du mélange plasma réactif.

Dans un but d'améliorer la standardisation des tests qui exigent une formation et des conditions de travail spécifiques, de nouveaux appareils semi-automatiques sont arrivés dans les années 1970 qui utilisaient des principes photométriques ou mécaniques pour détecter la fibrine.

La distribution des réactifs et la détection du caillot ont été progressivement automatisées mais plusieurs facteurs ont participé à la lenteur de cette évolution par rapport aux autres domaines de la biologie médicale à la fois pour des raisons techniques et des raisons économiques.

Un premier facteur non technique, mais important à prendre en compte, est que l'hémostase représente pour les industriels impliqués en diagnostic clinique un petit marché. De plus, les réactifs traditionnels sont relativement peu chers. Issus d'une industrie d'extraction (cerveau de lapin, placenta humain, plasmas bovins et humains, etc.), ils génèrent des marges bénéficiaires relativement modestes du fait de la faible part de l'hémostase dans le marché du diagnostic (3 à 4%) et du support humain très spécifique que suppose la commercialisation d'une gamme de produits d'hémostase.

Les facteurs techniques qui expliquent les retards pris par l'automatisation de l'hémostase tiennent à la complexité de la procédure d'analyse résultant du fait qu'il s'agit d'une exploration par étapes, partant d'un dépistage très global puis procédant par arbres de décision successifs. En ce qui concerne les troubles hémorragiques, l'enquête peut être longue mais tous les indices sont à peu près connus. Pour les maladies thrombotiques, l'enquête est beaucoup plus difficile et ne peut pas se limiter à des tests fonctionnels.

C'est au début des années 1990 que sont apparus les premiers vrais automates d'hémostase capables de travailler à partir du tube primaire jusqu'au rendu de résultat sans intervention humaine.

Avant leur utilisation pour les analyses, et après chaque déménagement, ces automates doivent subir des maintenances régulières (quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle) par le personnel qualifié du laboratoire, communément par les technologues médicaux, technologues ou techniciens de laboratoire ainsi que des maintenances plus poussées (changement de pièces importantes) par le SAV (service après vente) du constructeur. Les résultats de ces automates doivent être contrôlés avec des contrôles de qualité (externes ou internes) et, à chaque nouveau lot de réactif, ils doivent être calibrés.

Le biologiste doit donc être conscient de l'évolution actuelle des réglementations dans le domaine des contrôles de la qualité des résultats rendus et de la mise en place de toute une structure qualité. La raison pour laquelle on se pose la question : est ce que le service d'hémobiologie au niveau de CHU de Tlemcen, l'unité d'hémostase, répond aux normes de ces réglementations ? autrement dit on doit assurer d'une part une meilleure démarche des analyses et d'autre part le bon fonctionnement des automates disponibles au laboratoire « STA compact » en décrivant la fiabilité analytique.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre travail est basé sur trois objectifs principaux :

1- Faire la qualité, autrement dit confirmation des performances en routine via l'utilisation, la gestion et le suivi de contrôle de qualité interne et externe.

2- Rechercher de référentiels qui aident le responsable qualité du laboratoire à la diffusion des documents et valident la prise de connaissance de ceux-ci par leur collègues.

3- Répondre aux besoins des patients \Rightarrow recherche permanente d'outils d'amélioration pour susciter la confiance des patients sur la façon dont travaille le laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

I.HISTORIQUE

La connaissance d'un processus aboutissant à la coagulation du sang remonte à l'antiquité : Aristote en effet rapportait que le sang prélevé se solidifiait avant de laisser exsuder un liquide (le sérum) et un caillot qui après lavage révélait une substance blanchâtre (qui sera plus tard nommée fibrine). Il faut néanmoins attendre le XVIIIe et le XIXe siècle pour que soit découverte l'existence des principaux protagonistes : le fibrinogène et la thrombine. Et ce n'est qu'au début du XXe siècle que furent jetées les bases de la vision actuelle de la coagulation, grâce en particulier aux travaux de Morawitz (1905) : la thrombine, générée après activation d'un précurseur inactif, la prothrombine, agissait sur le fibrinogène pour le transformer en fibrine (stade ultime de la coagulation).

La nécessité d'explorer ce processus s'est alors imposée. Une des premières expériences remonte à 1878 quand Vierodt provoqua la coagulation de sang total par agitation de crin de cheval. L'apparition de filaments de fibrine était considérée comme le point final. Utilisant des techniques microscopiques, Milian en 1901 remarqua que la forme des gouttes de sang changeait quand le sang coagulait. Ces méthodes étaient très grossières et non standardisées en particulier en ce qui concerne la température.

Le premier appareil capable de détecter la formation du caillot fut le coaguloviscosimètre conçu par Koltman en 1910. L'appréciation de la formation du caillot était réalisée en mesurant la viscosité sanguine et en rapportant le voltage en fonction du temps. En 1922, Kugelmass mit au point un appareil, le néphélémètre, qui utilisait le principe de la dispersion de la lumière par des particules colloïdales. Il fallut attendre 1936 pour que la détection du caillot soit fondée sur une technique photo-optique. Baldes et Nygaard, ayant remarqué que la densité optique d'un plasma augmentait lors de la coagulation, en mesurèrent les variations grâce à des techniques photoélectriques. Des améliorations de cet appareil appelé Photoelgraph permirent d'évaluer les modifications de la lumière transmise grâce à une cellule photoélectrique.

Les développements ultérieurs concernèrent le système de détection du caillot et firent appel à des techniques électromécaniques. La détection du caillot était assurée par la formation de

filaments de fibrine réalisant un petit circuit électrique : le premier de ces appareils fut le Fibromètre (Becton-Dickinson). Parallèlement, furent mis au point des appareils fondés sur l'analyse de la variation de densité optique associée à la conversion du fibrinogène en fibrine. Les premiers modèles évaluaient les variations absolues de la DO (par exemple le Photocell), les suivants, la dérivée première des signaux ou la vitesse de changement de la densité optique.

En 1950, furent construits les premiers semi-automates permettant un gain en temps, de précision et d'efficacité dans la détection des caillots. Schématiquement, le spécimen et le réactif étaient mélangés manuellement et l'appareil enregistrait l'apparition du caillot. Les fabricants de matériel apportèrent des améliorations très importantes dès les années 70. Cette tendance, qui se poursuit actuellement, aboutit au développement des automates intégraux actuels capables à la fois de mélanger réactifs et spécimen et de détecter le point final de la réaction. Dans les années 80, la connexion de ces automates à un système informatique (central ou spécifique à l'automate) se généralisa. L'évaluation spécifique de la plupart des protéines de la coagulation fut également possible grâce au développement des substrats chromogènes synthétiques utilisés avec des spectrophotomètres.

La tendance actuelle est à la conception d'automates capables de réaliser aussi bien les tests de coagulation que les tests colorimétriques, voire immunologiques.

II. DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE MESURE EN HEMOSTASE

La technique manuelle fondée sur l'agitation de tubes en verre a progressivement disparu au profit de méthodes de détection sophistiquées dont le but est d'éliminer ou de diminuer au maximum les causes d'erreurs liées à l'opérateur. Les techniques utilisables pour détecter la formation du caillot sont fondées sur sa détection visuelle, électromécanique, viscoélastique, ou optique. Un nombre toujours croissant d'appareils met en œuvre un ou plusieurs de ces principes. Il est important d'avoir à l'esprit que si le point final est le plus souvent la formation d'un caillot, les appareils diffèrent quant au moment où ce point est déterminé. Il est donc important de connaître le principe de chaque appareil avant de comparer les résultats obtenus sur plusieurs appareils. Aussi, chaque laboratoire doit-il impérativement déterminer les zones normales pour son propre système « instrument-réactif ».

II.1. Techniques manuelles

Il est nécessaire de disposer d'un bain-marie thermostaté, de tubes, d'un système de pipetage et d'un chronomètre. Le point final de la réaction (la formation du caillot) est déterminé visuellement en agitant délicatement le tube, ou en utilisant un crochet pour enlever les filaments de fibrine. De nombreux paramètres sont difficiles à contrôler, en particulier l'appréciation du moment correspondant à la formation du caillot.

II.2. Techniques électromécaniques :

Ces techniques sont fondées sur la détection d'une augmentation de la viscosité du plasma lors de la formation de filaments de fibrine qui réalisent un petit circuit électrique entre deux électrodes et arrêtent le chronomètre.

Le mélange des réactifs et du spécimen ainsi que l'agitation du mélange sont assurés par des sondes, des barreaux aimantés, des billes, ou tous autres moyens. La détection du caillot est généralement plus précoce et plus précise qu'avec les techniques manuelles. Tous les tests de coagulation sont ainsi réalisables sur plasma ou sang total.

La détection du caillot peut reposer sur trois principes différents :

- La modification d'impédance dont le prototype est le Fibromètre (bioMérieux) : la tête de détection comprend deux électrodes une fixe et une mobile ; l'apparition de filaments de fibrine arrête le chronomètre qui avait été mis en marche par l'addition du réactif déclenchant ;
- La lame vibrante en matière plastique soumise à des vibrations qui cessent quand le caillot se forme ;
- Les billes métalliques dont le mouvement est modifié par la formation du caillot ; il existe plusieurs variantes selon que la bille est soit animée d'un mouvement rotatoire régulier grâce à un champ magnétique (exemple : série des KC, Amelung), soit animée d'un mouvement pendulaire régulier dû à un champ magnétique variable (série des STA, Stago), soit immobile grâce à la simple gravité (série des Coagtester).

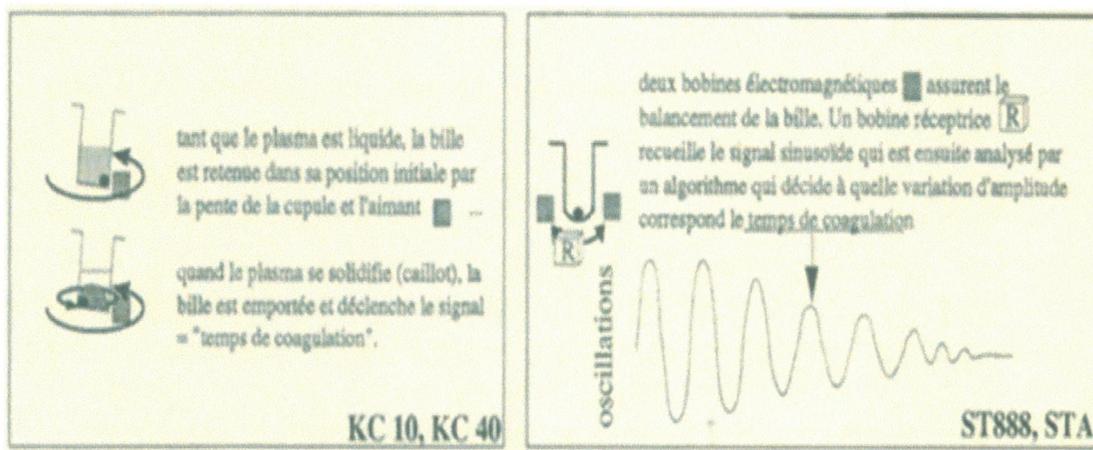


Fig.1: Principe électromécanique

II.3. Techniques optiques :

Ces techniques ont pour principe la dispersion de la lumière, sa réflexion ou son absorption après la conversion du fibrinogène en fibrine. La lumière, produite par une source monochromatique, traverse le mélange réactionnel et est captée par un détecteur optique. La lumière transmise diminue quand le caillot se forme, réduisant donc la quantité de lumière arrivé au détecteur. Le photodétecteur génère un signal qui est analysé grâce à des algorithmes spécifiques déterminant le point final de la réaction de coagulation. Un chronomètre, déclenché par l'addition du dernier réactif, détermine le temps entre le début et la fin de la coagulation ainsi détectée.

II.3.1. Principe néphélométrique :

Le principe néphélométrique est utilisé par certains systèmes. Dans des tests de coagulation, une source de lumière laser monochromatique est transmise, par exemple, au moyen de fibres optiques. La lecture de la dispersion de la lumière est rendue possible par un capteur qui peut être installé à 90 ou à 180 degrés du trajet de la lumière, selon le système employé, qui mesure par la suite la lumière diffusée à un certain angle ou qui enregistre les changements de la transmission de la lumière. Lorsque la lumière atteint des complexes insolubles comme les fibres de fibrine, elle se disperse vers l'avant à des angles diffus (180 degrés) et à des angles diffus latéraux (90 degrés). Le chronomètre s'arrête lorsque la quantité de lumière diffuse ou de lumière transmise atteint un certain niveau prédéterminé. La différence entre la lumière diffuse ou transmise avant et après la formation du caillot est habituellement proportionnelle à la quantité de fibrine formée.

II.3.2. Principe chromogène :

Ces techniques, bien qu'applicables aux tests globaux de la coagulation (TP ou TCA), sont surtout utilisés pour le dosage spécifique de facteurs ou d'inhibiteurs. Elles s'appliquent également à la détermination de « l'héparinémie » (mesure de l'activité anti-IIa ou surtout de l'activité anti-Xa). Elles sont fondées sur l'utilisation de substrats chromogène synthétiques polypeptidiques qui sont constituées de l'enchaînement d'un petit nombre d'acides aminés ($n= 3$ à 4 AA le plus souvent) terminés par un noyau para-nitroaniline (pNA). Le clivage de la liaison AA-pNA aboutit à la libération d'un noyau pNA qui colore le milieu réactionnel en jaune (la solution de départ étant incolore). L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité de pNA libérée. Celle-ci est mesurée par photo détection à une longueur d'onde de 405 nm.

Plus la pNA est coupée et libérée, plus la capacité d'absorbance de l'échantillon augmente, ce qui entraîne des changements plus importants dans la densité optique de la solution. Dans le cas de dosage d'inhibiteurs de protéases, cette variation de DO est inversement proportionnelle à leur activité plasmatique. Il est à noter que la spécificité du substrat chromogène est assurée par la nature de l'acide aminé terminal substitué par le noyau pNA, il est choisi pour correspondre à l'AA du site clivé par l'enzyme à doser.

II.3.3. Principe immunologique :

Des microparticules de latex enrobées d'un anticorps spécifique contre l'analyte (l'antigène) à mesurer sont habituellement utilisées. Un faisceau de lumière monochromatique traverse une suspension de microparticules de latex. Lorsque la longueur d'onde est plus grande que le diamètre des particules en suspension, les particules absorbent une petite quantité de lumière. Cependant, lorsque les microparticules de latex enduites d'anticorps spécifique entrent en contact avec l'antigène présent dans la solution, elles adhèrent à l'anticorps en créant des liens entre les particules, ce qui produit leur agglutination. Lorsque le diamètre des particules agglutinées s'approche de la longueur d'onde du faisceau de lumière monochromatique, une plus grande quantité de lumière est absorbée. Cette augmentation de l'absorption de la lumière est proportionnelle à l'agglutination, qui, à son tour, est proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. Ce type de technologie est présent dans les analyseurs de coagulations plus sophistiqués introduits sur le marché dans les années 1990. Des tests immunologiques classiques, qui exigent habituellement beaucoup

de temps, peuvent être effectués en quelques minutes lorsque l'un de ces outils automatisés est employé.

II.4. Techniques fondées sur la viscoélasticité

La particularité des thromboélastographes (TEG) est de permettre de suivre en continu de la formation du caillot du début de sa formation jusqu'à la lyse complète si nécessaire. La formation du caillot est détectée par des sondes suspendues dans le plasma ou le sang total. Les changements de viscosité du milieu et de son élasticité, qui surviennent au cours de la coagulation et de la fibrinolyse, sont transmis à un enregistreur graphique.

Malgré des améliorations récentes (miniaturisation des appareils, cuves à usage unique, possibilité de pratiquer deux analyses en parallèle, tracés des courbes gardés en mémoire...), apporté par un industriel (Hellige), les TEG ne sont plus guère utilisés en routine dans le laboratoire d'hémostase. En effet, l'interprétation des thromboélastogrammes est délicate et la technique ne se prête guère au travail en série, ni à l'automatisation... Néanmoins, les TEG gardent tout leur intérêt dans certaines indications particulières. Le suivi au bloc opératoire de l'hémostase des patients au cours de transplantation hépatiques ou cardiaques. A titre d'exemple, des modifications de tracé caractéristique d'une fibrinolyse permettent d'adapter beaucoup plus rapidement la thérapeutique par aprotinine (antifibrinolytique) que ne le permettrait un bilan d'hémostase « classique » (le délai étant alors lié au transport de l'échantillon au laboratoire, à sa centrifugation, à l'exécution de l'analyse puis au rendu du résultat).

III. AUTOMATISATION EN HEMOSTASE

III.1. Critères de choix d'un automate en hémostase

Lors de l'évaluation précédant l'achat d'un nouvel équipement, il faut comparer d'abord les analyseurs en fonction de critères tels que :

- Le coût de l'équipement,
- Période d'inactivité et fiabilité,
- Délai de réponse aux demandes de réparation,
- Facilité d'emploi,
- Disponibilité de services d'entretien adéquats dans un délai approprié,

- Processus de validation et temps de traitement,
- Coût des éléments jetables,
- Flexibilité en ce qui concerne l'usage de réactifs d'autres fabricants,
- Possibilité d'ajouter de nouveaux protocoles de tests,
- Cours de formation et soutien pour la formation continue.

La sensibilité de différents types d'équipement à divers paramètres variera en fonction de la façon dont les machines sont étalonnées et de la manière dont le point final de la réaction est détecté.

III.2. Avantages de l'automatisation dans un laboratoire d'hémostase :

- Améliore la reproductibilité de tests.
- Réduit les coûts d'échantillons et de réactifs,
- Facilite le stockage de données et les systèmes de recherche au moyen de logiciels informatiques,
- Permet de retester les résultats automatiquement lorsque des erreurs sont commises au premier passage,
- Offre la possibilité d'exécuter différents tests sur un même échantillon,
- Permet l'échantillonnage à partir d'un tube fermé, ce qui augmente la sûreté et l'efficacité des tests de coagulation. Ceci réduit dans une large mesure la possibilité que l'opérateur soit exposé à des aérosols ou des éclaboussures de l'échantillon du patient ou de commettre des erreurs d'étiquetage. Un fabricant offre un système breveté de dépistage qui sépare automatiquement le plasma des érythrocytes avant d'effectuer les tests sans centrifugation préalable,
- Permet de diluer les échantillons, les étalons et les contrôles. L'équipement peut être programmé pour des dilutions additionnelles si le résultat initial échappe à la linéarité de la méthode. Il peut aussi effectuer automatiquement d'autres tests sans intervention de l'opérateur s'il est cliniquement justifié de procéder ainsi, ou en raison des résultats obtenus au premier essai,
- La plupart des analyseurs comportent des systèmes d'alarme qui avertissent l'opérateur dépassements de critères préétablis, qui peuvent indiquer des problèmes dans l'équipement (par exp : quantité trop faible de réactif, défaillance sur le plan de la température, volume d'échantillon trop petit et erreurs dans le contrôle de qualité).

III.3. Les différents automates en hémostase

III.3.1. L'agrégamètre

Deux grands groupes d'agrégamètres peuvent être identifiés selon qu'ils sont destinés à l'analyse d'un plasma riche en plaquettes (PRP) ou de sang total. Les premiers sont fondés sur les observations de Born qui rapportait en 1963 que l'agrégation des plaquettes d'un PRP s'associait à un éclaircissement du milieu donc à une diminution de l'absorbance. Du fait de l'opacité du milieu réactionnel, ce principe ne peut être utilisé dans le cas de l'analyse en sang total. Les agrégamètres en sang total reposent sur les variations d'impédance du milieu après agrégation des plaquettes.

III.3.2. Le STA compact :

Le STA compact est un système entièrement automatisé, capable de réaliser simultanément tous les tests d'hémostase ou de coagulation qu'ils soient en tests immunologiques, photométriques ou chromogéniques en mode d'accès aléatoire (chargement aléatoire des échantillons). Le système de gestion des échantillons offre un haut débit de travail et un traitement modéré et rapide des échantillons d'urgence sans avoir besoin d'interrompre les tests en cours d'analyse. Tous les étalonnages et les dilutions sont réalisés automatiquement, en augmentant la productivité du personnel pour les laboratoires effectuant des volumes modérés et des tests de coagulation spécialisés. Il répond aux exigences d'une grande variété de laboratoires de coagulation à travers le monde.



Fig.2: Un automate d'Hémostase parfaitement adapté à la routine et aux tests spécialisés

♣ **Paramètres :**

- TP,
- TCA,
- Fibrinogène,
- Temps de thrombine,
- Temps de reptilase,
- Facteurs de coagulation,
- L'héparine non fractionnée et de bas poids moléculaire,
- L'activité antithrombine III,
- L'activité de la protéine C
- APCR,
- La protéine S,
- Antigène de la protéine S,
- Antigène facteur VWF,
- L'activité du plasminogène,
- L'activité anti plasmine,
- D-Dimères et monomères de fibrine.

III.3.3. STart

STart est un analyseur de paillasse semi-automatique efficace, intégré avec méthode brevetée Stago de détection électromécanique du caillot (viscosité-based system detection) qui effectue des méthodes de coagulation, chromogènes et des dosages immunologique en mode d'accès aléatoire.

Cette méthode élimine les interférences lipidiques, ictériques ou d'autres échantillons ou réactifs optiquement denses.

L'analyseur offre des dosages programmables et préprogrammés avec stockage courbe, 4stations d'incubation indépendamment temporisés, relié électroniquement à pipette multiple, de 40 caractères d'affichage à cristaux liquides et une imprimante thermique interne.

Sa légèreté, sa taille compacte le rend idéal pour les tests à faible volume de charge moyenne ou en tant que soutien pour une systématisation de détection du caillot optique.

Spécification : Efficacité prouvée dans plus de 100 pays.



Fig.3: Analyseur semi automatique de paillasse.

♣ **Paramètres :**

- TP,
- TCA,
- Fibrinogène,
- Temps de thrombine,
- Temps de reptilase,
- Facteurs de coagulation,
- L'héparine non fractionnée et de bas poids moléculaire,
- L'activité antithrombine III,
- L'activité de la protéine C et la protéine S,
- Antigène de la protéine S,
- Antigène facteur VWF,
- L'activité du plasminogène et L'activité anti plasmine,
- APCR...

IV. CONTRÔLE QUALITE EN HEMOSTASE

IV.1. Définition

Le contrôle qualité consiste à mettre sous contrôle un ensemble de processus. La qualité des résultats ne dépend pas uniquement des contrôles effectués mais aussi et surtout de la bonne organisation et de la bonne exécution des tâches du processus de réalisation.

IV.2. Les moyens de contrôle qualité dans le laboratoire d'hémostase

IV.2.1. Organisation du laboratoire

Le contrôle qualité nécessite au préalable une bonne organisation du laboratoire pour contrôler non seulement la phase analytique, mais aussi prendre en compte des éléments pré et postanalytiques. Cette organisation s'est inscrite dans un contexte réglementaire depuis l'entrée en vigueur de la première version de guide de bonne exécution des analyses (GBEA) en 1994. Elle peut aussi se traduire par l'application volontaire des normes internationales ISO (International Organization for Standardization) dont le respect fait l'objet d'une accréditation.

IV.2.1.1. Guide de Bonne Exécution des Analyses GBEA

IV.2.1.1.1. Présentations de GBEA :

Le GBEA est né de la volonté de l'administration et de la profession d'harmoniser la pratique de la biologie et d'améliorer la qualité dans les laboratoires (publics et privés) en se référant à un texte officiel, opposable à chaque laboratoire.

Le GBEA est défini comme étant un instrument au service de la qualité dans la mise en application permet de maîtriser la plupart des événements pré, per et postanalytiques. A ce titre, il consacre un chapitre à l'assurance qualité qu'il définit comme l'ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour qu'un produit ou un service satisfasse aux exigences de la qualité.

Ce guide impose la mise en place d'un système d'assurance qualité, prévoit la mise en œuvre de contrôle de qualité interne, la participation au contrôle national de qualité et recommande aux laboratoires de participer à d'autres programmes de contrôle de qualité externe.

Le respect du GBEA implique de la part du biologiste :

- La formalisation par écrit de l'organisation et du fonctionnement du laboratoire ;

- La rédaction de procédures opératoires (écrire ce que l'on fait) ;
- La gestion du système documentaire, en formant et en informant le personnel ;
- L'assurance de la mise en œuvre effective et correcte de ce qui est décrit dans le système documentaire ;
- L'archivage des documents prévus par les tests législatifs et réglementaires et ceux relatifs à la qualité.

IV.2.1.2. Normes ISO :

◆ Définition d'une norme :

« Document établi par consensus, qui fournit, pour des usages communs et répétés, des règles, des lignes directrices ou des caractéristiques, pour des activités ou leurs résultats, garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné. » (Extrait du guide ISO /CEI 2).

Contrairement au GBEA, les normes ISO applicables aux LAM sont de portée internationale. Elles sont élaborées par ISO puis adoptées au niveau communautaire et national.

Des séries de normes s'appliquant aux LAM : ce sont les normes ISO 9000, ISO 15189 et EN 45000. Il s'agit surtout d'outils de développement économique et d'échanges aux niveaux national et international.

La série des normes ISO 9000 est publiée par l'Afnor et permettrait d'obtenir la certification du système de qualité. En fait, ces normes, assez exigeantes, en termes de logistique et de charges administratives en particulier, sont souvent d'abord appliquées par les industriels. Cette série comprend cinq normes : la norme ISO 9000, la norme ISO 9001, la norme ISO 9002, la norme ISO 9003 et la norme ISO 9004. Cette dernière comporte dans sa deuxième partie ce qui convient le mieux aux LAM.

La série des normes ISO 15189 spécifique aux LAM est facilement appréciable par les biologistes et couvre la totalité de leur activité. Elle détaille notamment les exigences techniques concernant la compétence du personnel, les locaux et la qualification du matériel. Par ailleurs, ces exigences prennent en compte l'ensemble de l'analyse y compris les phases pré et post-analytiques. Elles prennent celles de la norme ISO 17025 aux quelles s'ajoutent notamment la communication interne, la mesure de la satisfaction des clients, la surveillance de tous les processus et l'amélioration en continue de l'efficacité.

La série des normes européenne EN 45000 comprend trois normes interdépendantes, plus faciles à respecter que les ISO 9000. Elle établit les critères de qualité permettant de reconnaître la compétence et la fiabilité d'un laboratoire d'essai afin de faciliter son accréditation et favoriser les échanges internationaux. Les critères définissant cette série concernent les différents aspects du fonctionnement d'un laboratoire, en particulier sa gestion et son organisation (responsable technique, document décrivant l'organisation et l'organigramme du laboratoire...), le personnel (en nombre suffisant ayant de bonnes compétences techniques ainsi qu'une expérience...), les locaux et les équipements nécessaires à une exécution correcte des mesures, les procédures de travail (décrites très précisément sur des documents spéciaux), le rapport d'essais (résultats d'essais réalisés par le laboratoire d'essais, ou rapport d'analyse effectué par un LAM ; dans ce dernier cas, on parle de l'édition du résultat d'analyse).

IV.2.2. Outils biologiques

IV.2.2.1. Echantillons biologiques plasmatiques

Ce matériel de CQ est utilisé pour vérifier la performance d'un procédé ou d'un système analytique. Il doit avoir une longue durée de conservation et être stable dans ses propriétés par rapport à lui-même. Il doit simuler le plus possible les échantillons frais de patient et pouvoir être analysé en même temps qu'eux. Il peut être titré par le fabricant selon des techniques de référence et est alors utilisable pour le contrôle d'exactitude de ces techniques, non titré, il sert alors au contrôle de la précision.

Deux types d'échantillons biologiques plasmatiques peuvent être utilisés au laboratoire :

- Aliquotes de plasma congelé préparés localement : plasmas normal (contrôle pour TQ, TCA), plasmas AVK (pool provenant de patients sous antivitamine K) (contrôle TQ TCA allongés), pool de plasmas de patients traités par héparine (contrôles « TCA allongé »),
- Echantillons de plasma lyophilisé, préparés industriellement par différentes firmes pharmaceutiques, ils sont réputés stables 1 à 2 an, grâce à l'ajout d'agent conservateur. On retrouve ainsi des :

- Plasmas étalons ou standards de calibration : certains sont étalonnés par rapport aux standard internationaux, quand ceux-ci existent ; d'autres sont proposés par des organismes de contrôle de qualité après validation.
- Plasmas de contrôle ayant une valeur moyenne \bar{x} et un intervalle de confiance déterminé selon une technique spécifique. Ces échantillons sont plutôt destinés au CQ journalier (précision).

IV.2.2.2. Etalons

On citera les étalons internationaux de fibrinogène (Fg) purifié, ainsi que d'héparine non fractionnée et d'HBPM détenus au NIBSC (titrés en unités internationales). Ces étalons d'héparine sont souvent utilisés par les fabricants pour calibrer leurs contrôles mais peuvent être achetés par les biologistes pour établir leurs étalonnages locaux.

IV.2.2.3. Réactifs

Peu de réactifs de référence existent en coagulation.

Des thromboplastines de référence, de trois origines différentes (humaine, lapin, bovine), certifiées par la BCR (community bureau of reference à bruxelles) ont permis, à partir de 1985, l'introduction de l'INR comme mode d'expression international du TQ de sujets traités par AVK. Ce matériel de référence est à l'origine de la calibration de thromboplastines commerciales avec détermination d'un ISI spécifique. Les autres réactifs de référence en hémostase au niveau international ou national sont rares (ex : a-thrombine détenue au NIBSC).

IV.2.2.4. Les tests d'hémostase analysés en contrôle de qualité :

Ce sont des tests quantitatifs, qui ne peuvent se pratiquer que sur du plasma déplaqueté, congelé ou lyophilisé : TQ, TCA, Fg, facteurs du complexe prothrombinique et/ou de la voie endogène, dosage des protéines C et S, de l'ATIII, des D-dimères, héparinémies anti-IIa et/ou anti-Xa, recherche d'un anticoagulant circulant. Ne sont pas analysés en contrôle de qualité, les tests qualitatifs et les tests d'utilisation restreinte ou réservés à certains laboratoires spécialisés (tests spécifiques de fibrinolyse, agrégation plaquettaire qui nécessitent aussi un matériel frais).

IV.2.3. Les outils statistiques :

IV.2.3.1. Étalonnage (ou calibration) :

C'est l'ensemble des procédures permettant d'obtenir à partir d'un système de mesures, un résultat donné ou un ensemble de résultats groupés autour d'une valeur moyenne donnée. Par cet étalonnage, on cherche à établir la relation liant une valeur pondérale ou une activité (en pourcentage), à une échelle arbitraire (exemple : temps), que cette relation soit graphique ou mathématique. On utilise une (ou des) méthode(s) de référence appropriée(s), et un matériel standard (étalon) et/ou des calibrateurs appropriés, dont la valeur vraie est connue ou a été établie par référence à un autre système de mesures lui-même entièrement étalonné. Certains paramètres du matériel de mesure (tel temps d'incubation, réactifs...) peuvent être alors modifiés pour obtenir le résultat le plus satisfaisant possible. Une bonne calibration dépendra du système analytique et/ou de la dextérité du technicien, du nombre de points de gamme, de la linéarité de la gamme (exemple : droite d'étalonnage concernant des dosages de facteurs de la voie exogène sur papier bilogarithmique), mais aussi de la qualité du standard de calibration.

IV.2.3.2. Erreurs de mesure:

C'est la différence entre valeur mesurée et valeur vraie (que l'on cherche à estimer). Au sens statistique, on décrit deux types d'erreurs :

➤ Erreur systématique : c'est la différence, toujours de même signe, entre la valeur attendue théorique et la valeur moyenne obtenue expérimentalement. L'exactitude sera donc d'autant plus grande que l'erreur systématique est plus faible. La détermination de l'erreur systématique peut se faire par l'étude comparative d'échantillons à l'aide de différentes techniques, par l'étude répétée d'échantillons stables dont on connaît la valeur (du moins les valeurs entièrement déterminées avec le même système de mesure) ; puis calcul de la moyenne des résultats obtenus et l'analyse de la distribution des valeurs expérimentales et la valeur vraie, ou enfin par l'étude statistique à partir des différences individuelles entre dosages du jour et dosages antérieurs.

✓ Origines :

- Le comportement des solutions de calibrage (différent de celui des échantillons à doser) ;
- Etalons : nature, titre (stabilité au cours de la conservation) ;

- Destruction de l'analyte au cours des étapes précédant le dosage (prélèvement, transport, centrifugation, décantation) ;
- Méthode de mesure ou de calcul.

➤ Erreur aléatoire : l'erreur liée au hasard ; c'est l'écart de signe et de grandeur imprévisible de la valeur attendue d'un paramètre et sa valeur mesurée expérimentalement. Elle fluctue d'une mesure à une autre ; elle est explorée par la mesure de la précision.

✓ Origines :

- Opération de distribution des volumes (échantillons ou réactifs) ;
- Erreurs de mesure.

➤ Dérive : c'est la variation au cours du temps de l'erreur systématique ; elle est surtout liée aux technologies des équipements et sera d'autant plus difficile à mettre en évidence qu'elle est faible. Elle est appréciée par des mesures de reproductibilité soit sur un étalon lyophilisé de référence (même lot), soit sur des aliquotes congelées du même échantillon plasmatique. On peut aussi procéder à la duplication des mesures des échantillons de malades en passant la série après un intervalle de temps et en étudiant la différence entre les groupes de mesures appariées. La moyenne de différence devrait être nulle en l'absence de dérive et de modifications des échantillons.

IV.2.3.3. Exactitude ou justesse

Elle mesure l'accord entre la valeur théorique attendue et la valeur obtenue lors de la mesure, ou si possible lors de mesures répétées, la répétition des mesures permet d'annuler les variations aléatoires.

IV.2.3.4. Précision et dispersion

C'est la qualité de l'accord entre des mesures répétées tenant compte de la dispersion des valeurs autour de la moyenne. Elle représente le degré de groupement des résultats expérimentaux successifs obtenus sur le même échantillon et dans les mêmes conditions. Elle ne s'applique qu'à des paramètres à distribution gaussienne. Quand la dispersion est grande, la précision est mauvaise. Elle est meilleure quand l'erreur aléatoire est faible. L'organisation internationale de métrologie demande de remplacer ce terme par les termes de répétabilité et de reproductibilité.

Sa détermination se fait par calcul de l'écart type ou le coefficient de variation de la distribution des valeurs.

IV.2.3.5. Répétabilité (intra série)

C'est l'expression quantitative de la précision lorsque le même opérateur réalise la technique de façon répétée sur le même spécimen et dans les mêmes conditions de travail (même laboratoire, même lot de réactif au cours de la même série d'analyses). Les mesures doivent être répétées n fois ($n = 11$ au moins, au mieux ≥ 31) pour des raisons de vraisemblance statistique.

- Objectif : CV < 6-5%

IV.2.3.6. Reproductibilité (inter série)

C'est l'expression quantitative de la précision lorsque la technique est réalisée sur plusieurs séries. La reproductibilité intralaboratoire est calculée dans un même laboratoire à partir des résultats des aliquotes d'un même échantillon distribué au hasard dans les séries d'analyses de patients (reproductibilité intrasérielle), ceci soit dans la journée, soit jour après jour, soit en fonction des séries pendant plusieurs jours consécutifs (reproductibilité intersérielle).

- Objectif : CV < 10%

IV.2.3.7. Quelques notions à vérifier au cours de l'étude des automates

- La contamination inter-échantillons : Il s'agit de l'effet exercé par un sérum sur celui qui le suit ou qui le précède.
- La stabilité : Elle est apparentée à la stabilité des réactifs « sensibles » et « embarqués » à bord des automates. Il est préconisé, pour cela, de doser 10 fois le réactif sur l'intervalle [jour d'ouverture – date de péremption du réactif]. Une analyse de variances des recouvrements peut mettre en évidence une déviation.
- Interférence : L'interférence peut intervenir lorsqu'un composant est en forte concentration (cas d'un médicament), ce qui a pour effet d'interférer sur le résultat du dosage de l'analyte. Le résultat peut ainsi être inexact.

❖ Une certaine compréhension de terminologie de statistique de base est requise pour les analyses de contrôle de qualité. Quelques définitions sont rappelées :

♣ Moyenne : la moyenne \bar{x} d'une série de n mesures sur le même échantillon est calculée selon la somme Σ de toutes les valeurs x_i obtenues. La formule sera :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

♣ Variance s^2 : elle caractérise la dispersion. Elle est définie par la somme des carrés des écarts de chaque valeur de x_i à sa moyenne rapportée à l'effectif :

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

♣ Ecart type ou déviation standard s : c'est la racine carrée de la variance ; elle désigne l'écart moyen à la moyenne, et s'exprime dans l'unité du composant mesuré, ou du test réalisé.

♣ Coefficient de variation **CV%** = **100 s/x** : c'est le rapport de l'écart type à la moyenne.

♣ Courbe de Gauss : c'est la répartition normale des résultats biologiques de mesures répétées d'un même échantillon : avec une fréquence maximale autour de la valeur théorique moyenne : 68% des résultats (ou surface sous la courbe) sont compris entre ± 1 sd autour de la moyenne ; 95% sont compris entre ± 2 sd ; 99,7 des résultats sont compris entre ± 3 sd.

♣ Limites de surveillance : pour une répartition gaussienne, un risque à 5% signifie que, pour la mesure considérée, il y a 2,5% de chances que la valeur observée pour l'échantillon tombe en dehors de la limite supérieur et 2,5% en dehors de la limite inférieure fixée (± 2 sd).

♣ Digramme de Levey-Jennings : ou carte de contrôle à valeurs moyennes a été introduit dès 1950 dans certains LAM ; il est établi pour chaque test et niveau de contrôle. Les résultats sont reportés en fonction du temps. On détermine sur une période donnée, en générale 30 jours, la moyenne M , l'écart type DS et le CV . La valeur du contrôle doit tomber à l'intérieur des bornes ± 2 s (bornes 95% de confiance). Il ne doit pas y avoir d'augmentation ou de décroissance continue des valeurs contrôle sur plus de cinq résultats consécutifs (distribution uniforme de chaque côté de ligne moyenne), moins de deux résultats consécutifs doivent être en dehors des bornes $m \pm 2$ sd, et aucune valeur ne doit être au de la de ± 3 sd (valeur

inacceptables). Ce diagramme permet de visualiser les erreurs systématiques et ou aléatoires éventuelles.

♣ Règles multifactorielles de Westgard : ces règles complexes par la prise en compte de plusieurs paramètres, et par leur calcul, sont peu connues en hémostase. Cependant, leur utilisation est à la base des procédures de CQI sur certains automates mixtes. Leur intérêt est leur grande puissance d'analyse statistique pour diminuer les « faux rejets » tout en maintenant un haut niveau de détection d'erreurs ; une bonne précision avec la meilleure exactitude possible.

♣ Graphes de Youden : originellement conçu pour le rendu des résultats de comparaison inter-laboratoire, est une représentation graphique utilisant une paire de résultats de contrôle de qualité pour deux matériaux (par exemple deux niveaux de concentration différents d'un même analyte). Le résultat pour un niveau figurant sur l'axe des ordonnées, l'autre sur l'axe des abscisses.

IV.3. Démarches du contrôle qualité en hémostase :

IV.3.1. Phase pré analytique :

Les facteurs de l'hémostase et les cellules impliquées dans ce processus peuvent s'activer en dehors de l'organisme, au contact de verre, d'une surface mouillable ou en présence d'extraits cellulaires ou tissulaires. Les examens de laboratoire visent pratiquement tous à apprécier un état d'activation ou une capacité d'activation in vivo du système d'hémostase. Entre le vaisseau sanguin et l'automate existe un temps critique qui conditionne totalement la qualité du résultat : le prélèvement sanguin et le traitement pré-analytique de l'échantillon

La maîtrise des différentes composantes de l'étape préanalytique occupe une place cruciale dans la validité des tests biologiques d'exploration du système de l'hémostase et de surveillance des traitements antithrombotiques. Elle conditionne une grande partie de la valeur informative clinique des résultats rendus. C'est, en hémostase, un volet important du plan du contrôle qualité. Cette étape comprend :

IV.3.1.1. Analyse de la prescription

Les examens d'hémostase sont très divers. Certaines recommandations s'appliquent à tous les examens, qu'ils soient de routine ou spécialisés, d'autres ne s'appliquent qu'à un groupe

d'examens, voire à un seul type d'examens. L'analyse de la prescription est donc un préalable indispensable au prélèvement lui-même.

IV.3.1.1.1. Tests de routine ou semi-routine :

Cette distinction est déjà arbitraire, la notion de routine étant conditionnée par les caractéristiques du laboratoire : nombre de prélèvements traités et orientations propres du laboratoire ou de l'établissement pour un laboratoire hospitalier.

Néanmoins, on classera dans cette catégorie les examens suivants : temps de céphaline + activateur (TCA), temps de Quick/taux de prothrombine (TP), fibrinogène, temps de thrombine. Ces examens ne sont habituellement pas stockés. Ils sont souvent prélevés à distance du laboratoire, dans les services hospitaliers. Les variables pré-analytiques échappent alors au biologiste, qui va traiter un « prélèvement apporté au laboratoire ». Il est indispensable que le biologiste ait lui-même participé à la mise en place ou à la validation du circuit utilisé par les prélèvements, pour qu'il puisse en connaître les modalités, l'heure, le temps et les conditions du transfert vers le laboratoire. Ces données sont particulièrement importantes pour les patients sous traitement anticoagulant.

Les dosages différentiels de facteurs de coagulation : complexe prothrombinique, facteur VIII et IX procèdent de la même stratégie. Ils sont parfois, en fonction du laboratoire, réalisés de manière différée après congélation-décongélation. Ceci est déconseillé pour les dosages appliqués au système contact (facteur XII, XI, prékallicroïne et kininogène de haut poids moléculaire).

IV.3.1.1.2. Tests plus spécialisés :

Dosage d'inhibiteurs de la coagulation, réalisés soit par méthode fonctionnelle, soit par méthode immunologique : antithrombine III, protéine C, protéine S, second facteur de l'héparine, résistance à la protéine C activée, anticorps anti-phospholipides, plasminogène, facteur Willebrand, facteur de coagulation par méthode immunologique, dépistage de lupus anticoagulant.

Marqueurs d'activation de l'hémostase : certains de ces dosages sont très sensibles aux conditions du prélèvement et au traitement de l'échantillon : facteur 4 plaquettaire, bêta thromboglobuline, fibrinopeptide A par exemple.

Certains dosages de marqueurs d'activation de la coagulation et de la fibrinolyse ont un réel intérêt clinique, il s'agit tout particulièrement des D-Dimères, et à moindre degré des fragments 1 + 2 de la prothrombine voire des complexes enzyme-inhibiteur (thrombine-antithrombine, plasmine-antiplasmine).

IV.3.1.1.3. Tests requérant des conditions particulières :

Etude des fonctions plaquettaires (agrégamétrie) : ils doivent être effectués au laboratoire. Lorsque cela est impossible, les prélèvements doivent être rapidement apportés au laboratoire après accord préalable.

Etude de la fibrinolyse : temps de lyse des euglobines (TLE), dosage des activateurs et d'inhibiteurs du plasminogène : ils doivent être effectués au laboratoire, toujours à la même heure en raison du cycle nyctéméral de certains facteurs.

L'analyse de la prescription par la personne qui va effectuer le prélèvement est donc essentielle. Elle va déterminer le choix des modalités de prélèvement.

IV.3.1.2. Modalités de prélèvement :

IV.3.1.2.1. Choix de l'anticoagulant :

♣ Anticoagulant de référence :

En hémostase, c'est le citrate de sodium à 0,109 M (3,2%). Le citrate de sodium 0,129 M n'est plus utilisé. Le citrate est un chélateur rapide du calcium. Il est le plus efficace pour empêcher la dégradation des facteurs V et VIII. Le prélèvement dilue à la fois le plasma et les éléments figurés. Il est donc essentiel de respecter strictement le rapport anticoagulant/sang total qui doit être de 1 pour 9. Un tube prélevé ou transmis au laboratoire insuffisamment rempli ne doit pas être traité.

La quantité de globules rouges présents dans le tube peut influencer sur le rapport final plasma/anticoagulant. Il est donc parfois nécessaire, en cas de polyglobulie (hématocrite supérieur à 55%) ou d'anémie profonde (hématocrite inférieur à 20%) d'appliquer une correction et de modifier la quantité d'anticoagulant à mettre dans le tube selon la formule proposée par Mac Gann :

$$\text{Volume d'anticoagulant} = 0,00185 \times \text{volume de sang (ml)} \times (100 \text{ hématocrite})$$

Le prélèvement sur citrate permet aussi d'effectuer la numération plaquettaire. Pour l'agrégation plaquettaire, il est aussi possible d'utiliser une solution ACD (acide citrique, citrate sodique, dextrose).

♣ Anticoagulant + antiagrégant :

L'inhibition de la coagulation par le citrate peut s'avérer insuffisante, en particulier pour bloquer l'activation plaquettaire. En effet, l'activation plaquettaire libère certains produits tel le facteur 4 plaquettaire, la bêta thromboglobuline, le facteur Willebrand ou PAI-1. Les prélèvements pour dosage de ces facteurs ou pour l'étude de la fibrinolyse doivent donc être effectués sur solution antiagrégante. En pratique, on utilise la solution CTAD, qui contient, outre le citrate habituel, de la théophylline, de l'adénosine et du dipyridamole.

♣ Anticoagulant + anti fibrinolytique :

Lors des traitements thrombolytiques, le dosage du fibrinogène et de ses produits de dégradation peut être faussé par l'activité fibrinolytique persistant dans le tube : dans ce cas, le dosage du fibrinogène reflète davantage le temps que met le prélèvement pour arriver au laboratoire que les effets secondaires in vivo du traitement thrombolytique. La solution préconisée ici est l'utilisation d'anti fibrinolytique, en particulier l'aprotinine, qui permet une appréciation plus juste du fibrinogène, mais entraîne un allongement du temps de céphaline plus activateur. Il n'existe à ce jour aucun tube commercialisé contenant du citrate additionné d'aprotinine. La nature protéique de celle-ci rend impossible la stérilisation de l'anticoagulant. La solution doit être préparée par le laboratoire au moment de son utilisation, ou gardée au congélateur. Ceci nécessite donc une collaboration très étroite avec le service où est pratiquée la thrombolyse.

IV.3.1.2.2. Choix du tube :

- Le tube destiné aux prélèvements d'hémostase ne doit pas activer l'un ou plusieurs de ses facteurs. On utilisera donc soit un tube en verre siliconé, soit un tube plastique type polypropylène. Il faut ici être attentif aux matériaux choisis par le fabricant : certains, bien adaptés aux dosages biochimiques ou sérologiques s'avèrent inutilisables pour l'hémostase du fait des risques d'activation des facteurs contacts, ou de l'inhibition de l'héparine présente dans le prélèvement chez les patients traités. En outre, on vérifiera toujours que la date de

péremption du tube n'est pas dépassée (vieillessement de l'anticoagulant par contamination bactérienne, mauvais remplissage par perte progressive du vide à travers un bouchons devenu poreux).

-Quelques tests destinés à l'étude de l'hémostase doivent être prélevés sur tube en verre : étude de rétraction du caillot, temps de consommation de prothrombine, dosage des produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF).

IV.3.1.2.3. Le problème du vide :

L'utilisation de tube sous vide type Vacutainer est largement répandue en pratique hospitalière et extrahospitalière. En principe, cette méthode est déconseillée pour l'hémostase du fait de la violence de l'aspiration, de l'activation plaquettaire qui en résulte et de la formation de mousse qui peut induire des modifications influant sur le résultat. Il en va de même du prélèvement à la seringue avec aspiration. Mais en pratique, l'aspiration sous vide a peu d'influence sur les résultats des tests de routine et de nombreux examens de coagulation. En revanche, cette méthode ne doit pas être utilisée pour les prélèvements destinés à l'étude des fonctions plaquettaires, au dosage des marqueurs d'activation plaquettaire et pour la constitution du "pool laboratoire". Il faut alors "casser le vide" en ouvrant le tube et laisser le sang s'écouler librement.

IV.3.1.2.4. Détermination de la quantité à prélever :

Cette détermination doit être évaluée au moment de la préparation du prélèvement. La quantité prélevée pour chaque examen doit tenir compte de la nécessité d'effectuer un certain nombre d'examens en double, et de la possibilité d'un contrôle pour un résultat jugé aberrant ou simplement hors normes.

IV.3.1.2.5. Étiquetage immédiat :

Il s'agit d'une nécessité absolue. L'identification précise du patient sur le tube au moment de la ponction évitera bien des erreurs parfois de conséquence fâcheuse, comme par exemple lors de la surveillance d'un traitement anticoagulant.

L'heure de la ponction devra être mentionnée pour les paramètres sensibles. La position du tube dans la séquence du prélèvement sera précisée si plusieurs tubes pour étude de l'hémostase sont nécessaires.

IV.3.1.3. Technique du prélèvement :

En préalable : s'assurer que les conditions du prélèvement et de son transfert puis de son traitement au laboratoire sont remplies. Certains prélèvements doivent être effectués au laboratoire ; d'autres impliquent que le laboratoire ait effectué une préparation préalable, ou se soit organisé pour que le test soit fait immédiatement, d'où la nécessité d'un rendez-vous ou d'un accord préalable du biologiste.

IV.3.1.3.1. La ponction veineuse :

Le malade doit être au repos, calme et de préférence à jeun. L'émotion, l'effort physique, le stress peuvent entraîner des modifications notables de l'hémostase : activation plaquettaire, activation du facteur VIII, thrombocytose, activation de la fibrinolyse, élévation des marqueurs d'activation de l'hémostase. En outre un prélèvement sur un malade agité sera souvent de mauvaise qualité et activé.

Le garrot lorsqu'il est nécessaire ne doit pas être trop serré et sera laisser le moins de temps possible. Une veinostase prolongée entraîne une activation de certains facteurs, comme le facteur VIII et de la fibrinolyse. Elle induit en outre une hémococoncentration qui nécessitera d'appliquer un facteur de correction calculé à partir de l'hématocrite.

Le choix de la veine est important. On préférera une veine de bon calibre, au pli du coude, du côté opposé à une éventuelle perfusion ou à une aiguille laissée à demeure pour traitement héparinique.

Le geste lui-même sera une ponction franche, non traumatique, non hésitante. Une recherche quelque peu laborieuse de la veine, voire des tentatives multiples, entraînent, outre leur désagrément pour le patient, une activation de l'hémostase.

Les premiers millilitres de sang prélevés doivent être rejetés car ils contiennent souvent de petites traces de débris tissulaires qui peuvent aussi favoriser l'activation. Si d'autres prélèvements non destinés à l'hémostase doivent être effectués, le tube pour hémostase ne sera ni le premier prélevé ni le dernier. La "place idéale" pour l'hémostase est la seconde. Le tube prélevé sera agité avec précaution par 4 ou 5 retournements lents. L'heure du prélèvement sera notée.

IV.3.1.3.2. L'interrogatoire du patient :

Il s'agit d'un élément essentiel qui doit être conduit en même temps que la ponction. Tous les facteurs pouvant influencer le résultat biologique doivent être précisés : sexe, âge, pathologies connues, prise médicamenteuse, prise d'une contraception orale, groupage sanguin, éventuelle grossesse en cours...

IV.3.1.4. Transfert et traitement de l'échantillon :

IV.3.1.4.1. Acheminement :

Lorsque le prélèvement n'est pas effectué au laboratoire, il est essentiel qu'il y parvienne le plus tôt possible, sans trop d'agitation et dans les meilleures conditions.

La température est un problème complexe : le prélèvement ne doit pas être conservé au froid. Celui-ci est néfaste pour certains examens : il peut induire une détérioration des fonctions plaquettaires et une activation des facteurs VII et XI, qui donne des taux faussement élevés de ces facteurs, et surtout il induit un raccourcissement du temps du Quick. Les prélèvements pour étude des fonctions plaquettaires doivent être conservés à température ambiante (mais une "température ambiante" excessive entraîne aussi une activation de l'hémostase dans le tube). De même, les tubes sur lesquels doivent être effectués un temps de Quick (la quasi-totalité) doivent être gardés à température ambiante. Après 2 à 4 heures à 4°C, le temps de Quick d'un patient traité par antivitamines K se raccourcit parfois jusque dans des zones de normalité.

Cependant, le froid (+4°C) permet une meilleure conservation de facteurs labiles : il permet de ralentir les réactions enzymatiques, et donc dans une certaine mesure de réduire la génération de thrombine. En outre il évite la dégradation de certains facteurs (facteur V, activateurs du plasminogène). Les tubes prélevés pour étude des marqueurs d'activation de l'hémostase et étude de la fibrinolyse seront donc mis sur de la glace pilée pour leur transport.

IV.3.1.4.2. Réception :

Qu'il s'agisse de laboratoire polyvalent ou de laboratoire d'hématologie, les prélèvements pour hémostase doivent être traités en priorité. Les plus urgents à traiter sont : les tests de fonction plaquettaire, les surveillances de traitements hépariniques, les surveillances de traitements thrombolytiques, les dosages de marqueurs d'activation, la recherche de lupus

anticoagulant et l'étude de la fibrinolyse. Le bon étiquetage des tubes est vérifié et les erreurs d'identification voire de prescription sont rectifiées.

IV.3.1.4.3. Centrifugation :

Il s'agit encore d'une étape essentielle.

-Le problème de la température de centrifugation a été discuté : la majorité des tests nécessite une température maintenue constante entre 15 et 20°C. Il faut donc conseiller une centrifugeuse thermostatée. D'autres tests (fibrinolyse) imposeront de maintenir la température à + 4°C.

-La préparation d'un plasma pauvre en plaquette (PPP) est obtenue par centrifugation à 2000 à 2500g pendant 15 à 30 minutes, selon l'appauvrissement plaquettaire souhaité. Ceci permet habituellement d'obtenir des taux résiduels inférieurs à 20 Giga/L. pour réduire encore ce taux, une double centrifugation est parfois nécessaire. La deuxième centrifugation est effectuée sur plasma décanté, à 2000g pendant 15 minutes. Pour les tests très influencés par la présence de plaquettes résiduelles, comme les tests de dépistage de l'anticoagulant circulant lupique, une numération plaquettaire sur le PPP doit donner des chiffres inférieurs à $10^9/L$.

-Pour l'obtention d'un plasma riche en plaquettes (PRP) utilisé en explorations fonctionnelles plaquettaires, une centrifugation à 800g et +15°C pendant 15 minutes suffit.

IV.3.1.4.4. Décantation :

L'examen du surnageant constitue un moyen de contrôle supplémentaire. Les prélèvements hémolysés ne doivent pas être utilisés. Le problème n'est pas tant le risque d'interférences que les modifications qu'induit l'hémolyse qui active les plaquettes et raccourcit le TCA. De même, les plasmas lactescents ne seront, sauf cas particulier, pas traités, surtout si le laboratoire utilise un appareil à détection photo-optique du caillot. Pour les plasmas ictériques, il doit être tenu compte aussi du type d'appareil utilisé.

Lorsque le traitement immédiat de l'échantillon ne peut être effectué (examen différé dans la journée, ou congélation), il est nécessaire de décanter les plasmas. Pour ce faire, le prélèvement du plasma dans le tube, à l'aide d'une pipette siliconée, doit être effectué nettement au-dessus de l'interface culot cellulaire/ plasma en évitant d'aspirer près de la couche leucocytaire. On évitera aussi de prélever à la surface où surnage habituellement les

particules lipidiques. Cet écueil n'est pas évité par certains automates complets, qui prélèvent à 1mm en dessous de la surface. La décantation ne conservera donc souvent que la zone comprise entre le tiers supérieurs et le tiers inférieur du surnageant.

IV.3.1.4.5. Congélation :

Lorsque l'examen ne peut être fait dans la journée, il faut recourir à la congélation. La congélation sera effectuée après double centrifugation, en petits aliquotes de 0,5 à 1ml. Elle doit surtout être rapide pour éviter l'activation des facteurs VII et XI par le froid.

Dans la majorité des cas, et pour de courte durée, une congélation stable à -20°C suffit. Pour des durées supérieures à une semaine, pour certains facteurs ou métabolites instables, la congélation à -80° C s'impose, en veillant à éviter la déshydratation des échantillons. De même, le pool laboratoire sera conservé à -80°C.

IV.3.1.4.6. Décongélation :

Elle doit être rapide, jamais à température ambiante, mais au bain marie à 37°C, ceci afin d'éviter la dénaturation du fibrinogène ou d'autres composants plasmatiques. L'échantillon devra en revanche être rapidement enlevé du bain-marie dès la décongélation effectuée, afin d'éviter son activation et surtout la diminution des facteurs labiles (V et VIII).

IV.3.2. La phase analytique

IV.3.2.1. Choix du type de test à pratiquer

Le choix du type de test à réaliser dépendra essentiellement du type d'information recherchée. Le biologiste devra savoir définir une stratégie d'utilisation de tests semi-globaux de dépistage, utilisés en première intention, que viendront compléter des tests spécifiques de seconde ligne.

-Le dépistage d'une anomalie de l'hémostase s'appuie le plus souvent sur une batterie de tests dits " semi-globaux". Une anomalie d'un test de dépistage conduit à des dosages spécifiques qui doivent chacun permettre d'apprécier la fonction hémostatique du facteur considéré, si possible dans tous ses aspects.

-La constatation d'une anomalie de fonction d'un facteur de l'hémostase amène à s'interroger sur le mécanisme du " déficit" : présence ou absence physique de la molécule ; anomalie

fonctionnelle (activité de la triade catalytique pour les enzymes, fixation aux phospholipides, altération moléculaire modifiant la reconnaissance par l'enzyme activatrice).

-Le dosage d'un facteur séparé de la coagulation est le plus souvent fait par une technique de coagulation, utilisant des plasmas déficients : ceci explore de façon assez complète le rôle du facteur dosé dans le processus de coagulation.

En cas de déficit fonctionnel, la recherche de la présence du facteur incriminé repose sur les tests immunologiques. L'utilisation d'anticorps polyclonaux permet de détecter des facteurs même ponctuellement mutés. Cependant les polyclonaux ont des performances variables selon les lots alors que les anticorps monoclonaux ont une assez bonne reproductibilité.

IV.3.2.2. Choix du type d'appareil pour technique coagulante

Plusieurs méthodes de détection du caillot existent (voir en haut « les différentes techniques »).

IV.3.2.3. Choix des réactifs

Celui-ci dépend en partie de l'appareillage disponible (exemple : difficulté d'utilisation de réactifs opaques avec des instruments à détection photo-optique) et des contraintes de stabilité imposées par la fréquence des dosages. Il dépend aussi du type de recrutement pathologique susceptible d'être exploré : une céphaline donnée n'a pas la même sensibilité à l'héparine, aux anticoagulants circulants de type lupique, aux déficits modérés en facteurs IX et VIII ou aux déficits en facteurs de la phase contact. Ceci nécessite d'avoir au moment de la mise en route de l'examen des données cliniques concernant le patient ou, au moins, une orientation diagnostique.

La même question se pose avec les thromboplastines : il ne faut peut être pas utiliser la même thromboplastine pour dépister un déficit modéré, en facteur VII en particulier, pour surveiller un traitement anticoagulant ou pour effectuer un temps de thromboplastine diluée. L'indice de sensibilité international (ISI) ne s'applique, rappelons le, qu'aux surveillances de traitements anticoagulants équilibrés, pour lesquels la pratique de l'INR n'a pas tout résolu.

IV.3.2.4. Vérification des instruments et appareils

La qualité des résultats rendus devra aussi s'appuyer sur une recherche constante de toute modification technique insidieuse pouvant entraîner une dérive. Les automates de coagulation

seront quotidiennement vérifiés et les programmes d'appréciation de leur validité technique régulièrement activés selon les instructions des fabricants. Les réfrigérateurs et congélateurs doivent être régulièrement inspectés et les disques d'enregistrement de température vérifiés (lorsqu'ils existent...). Un contrôle des performances des centrifugeuses est aussi nécessaire : température, vitesse de rotation, horloges internes. Les bains-marie (variation maximale admissible $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), les thermomètres, les chronomètres, les balances et les pH mètres seront vérifiés et périodiquement réétalonnés.

Toutes ces vérifications sont longues et fastidieuses. Elles sont de la responsabilité du biologiste qui, lorsqu'il signe des résultats d'examen qu'il n'a pas effectués lui-même, valide en fait l'ensemble des procédures utilisées.

IV.3.2.5. Préparation des réactifs

Les instructions de stockage des réactifs, de stabilité, de reconstitution, d'utilisation et les instructions spéciales de manipulation devront être respectées scrupuleusement : les lots périmés seront jetés, tout comme les réactifs accidentellement non tenus au frais ou au contraire congelés par mauvais fonctionnement d'une chambre froide.

L'eau distillée utilisée pour reconstituer les lyophilisats doit avoir un pH entre 6,8 et 7,2.

Les réactifs lyophilisés doivent être reconstitués à l'aide de pipettes volumétriques précises et il faudra attendre le temps indiqué pour obtenir une reconstitution-dissolution complète.

Les réactifs en suspension doivent être homogénéisés avant utilisation.

L'heure et la date de reconstitution seront indiquées sur les flacons et un nouvel étalonnage entrepris à chaque changement de lot de réactif.

IV.3.2.6. Préparation d'un pool de plasmas normaux

- Prélèvement :
 - Prélèvements réalisés le matin, en raison des variations nyctémérales.
 - Sujets : 10 à 20 sujets adultes « sains », ne prenant pas de médicament interférent avec la coagulation (exemple : anti vitamine K, antibiotiques...); l'aspirine et les anti inflammatoires non stéroïdiens peuvent être acceptés pour ce pool destiné au contrôle de la coagulation. Essayer d'équilibrer les sexes ainsi que l'âge (les TCA sont plus courts chez les

sujets âgés et en limites supérieures chez les jeunes). Eviter de prélever des femmes sous contraception orale.

- Sujets n'ayant pas absorbé de matières grasses depuis au minimum de 4 heures, sans être strictement à jeun. Repos de 30 minutes environ avant le prélèvement (pour éviter le relargage de facteurs endothéliaux).

- Préparation du plasma :

- Centrifuger chaque tube à 2500 g, 15 minutes à 15°C ; décanter le plasma dans des tubes en plastiques. Pratiquer les TQ et TCA le plus rapidement possible sur chaque plasma décanté. Eliminer les PPP dont le TQ et/ou le TCA sont en dehors de l'intervalle de normalité de laboratoire. Dans un erlenmeyer ou un bécher on mélange les plasmas qui remplissent les critères de normalité. Pratiquer TQ et TCA sur le pool plasmatique frais.

- Centrifuger le pool plasmatique une deuxième fois à 2500g, 15°C, 20 minutes. décanter.

- Répartir rapidement le pool en aliquotes de 0,5 ml, dans des tubes en plastique ou en polypropylène de volume \leq à 3ml (pour une meilleure conservation, le volume de plasma ne doit pas être trop inférieur à celui du tube). Boucher les tubes ; inscrire la date. Les placer immédiatement à $- 80^{\circ}\text{C}$. une congélation à $- 20^{\circ}\text{C}$ ne permet pas une conservation correcte du plasma plus de 3 à 4 semaines.

- Vérifier les TQ et TCA de ce nouveau pool normal par rapport à l'ancien pool.

NB : on peut préparer des pools plasmatiques de contrôle congelés par la même procédure précédente sauf que le choix du plasma diffère (patient traité par AVK ou héparine).

IV.3.2.1.7. Etablissement d'une norme

La norme sur laquelle repose toute interprétation n'a pas de définition absolue. Une norme biologique n'est pas toujours une norme mathématique ni une norme médicale. Elle est issue d'une approche de modélisation statistique des résultats obtenus sur une population a priori prédéfinie comme de comportement médical et biologique "normal", et peut être à tout moment remise en cause par la description d'un facteur de covariance des résultats, jusqu'alors inconnue ou négligé.

Le fait d'être "dans la norme" pour un paramètre donné ne signifie pas être exempt de pathologie pour ce facteur, tout comme la situation "hors norme" (anormal) ne correspond

pas nécessairement à une pathologie. Un des exemples en est la relation groupe sanguin érythrocytaire – facteur Willebrand plasmatique.

IV.3.2.8. Contrôle de qualité

« L'action de mesurer, d'examiner, d'essayer une ou plusieurs caractéristiques et de les comparer aux exigences spécifiées en vue d'établir leur conformité et, si non, de mettre en évidence des défauts et de déclencher des actions correctives »

L'acceptation des contraintes d'un contrôle de qualité régulier permet de vérifier l'absence de dérive des résultats. Aux différentes étapes du contrôle de qualité interne s'ajoute la nécessité pour le biologiste de participer au contrôle de qualité national (voir plus loin contrôle de qualité interne et externe).

IV.3.2. Phase post analytique

Elle concerne la validation du résultat, son rendu et son archivage.

L'édition des résultats sous forme cumulative (au moins cinq résultats antérieurs), avec mention des traitements et leur posologie, permet plus aisément la vérification de la cohérence des résultats du jour par comparaison avec ceux des jours précédents, mais aussi en fonction du traitement du patient et du contexte clinique. L'édition cumulative des résultats constitue l'un des moyens d'améliorer et de faciliter leur surveillance et leur validation ; ces informations doivent être accessibles aussi bien au technicien qui réalise les tests qu'au biologiste qui interprète les résultats et les valide.

IV.4. Contrôle de qualité

IV.4.1. Contrôle de qualité interne CQI

IV.4.1.1. Définition

C'est l'ensemble des mesures prises par le biologiste pour évaluer en permanence la qualité des analyses effectuées, ainsi que la performance du laboratoire, et permettre la validation quotidienne des résultats. Le CQI est à la base de la précision des résultats fournis par le biologiste au praticien, tendant à maintenir et à améliorer leur qualité. Il est par définition spécifique à chaque laboratoire. Chacun le met en œuvre en fonction de son organisation et des équipements dont il dispose.

Principe fondamental : les erreurs détectées à l'aide des spécimens de contrôle doivent être le reflet exact de celles qui se produisent avec les spécimens de patient.

IV.4.1.2. Objectifs

- Détection immédiate et identification des erreurs pour définir des actions correctives.
- Permet de mettre en évidence les variations analytiques suivantes :
 - ✓ Erreurs systématiques.
 - ✓ Erreurs aléatoires.
 - ✓ Erreurs liées à un défaut de spécificité.
 - ✓ Interférences.
 - ✓ Erreurs grossières.

IV.4.2. Contrôle de qualité externe CQE

IV.4.2.1. Définition

Le CQE correspond à l'ensemble des moyens permettant de comparer de manière objective (mais rétrospective) les résultats fournis par des laboratoires différents et d'apprécier par une « agence externe », la performance d'un laboratoire par rapport à d'autres laboratoires. En effet, un défaut instrumental ou de réactifs, une mauvaise calibration, peuvent donner des résultats reproductibles au sein d'un même laboratoire, mais faux, et non détectables par certains contrôles internes. Il peut être à l'échelle régionale, nationale et internationale.

IV.4.2.2. Objectifs

- ✓ « déterminer la valeur des résultats des analyses exécutées par chacun des laboratoires qui y est soumis, compte tenu des techniques, réactifs et du matériel employé, en les comparant avec les résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires » ;
- ✓ « tendre à assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses de biologie médicale dans l'intérêt général de la santé publique, et à permettre à chaque laboratoire de vérifier la valeur de ses techniques et son bon fonctionnement » ;
- ✓ Tenter de réduire la dispersion interlaboratoire des résultats ;
- ✓ Décrire la situation globale en coagulation, en fonction des différents réactifs, des techniques et des appareillages ;

- ✓ Explorer différentes procédures de standardisation ;
- ✓ Révéler des défauts, alerter les participants, les engager et motiver à des actions correctives ;

IV.4.2.3. Avantages de CQE

- Correction des dérives ou des erreurs du biologiste ;
- Amélioration des résultats au fil des années avec une diminution nette de la dispersion pour des tests courant comme TQ, TCA ;
- Le CQE donne une image des pratiques méthodologiques des LAM pour quelques tests ou investigations : automates et réactifs utilisés ;
- L'étude en vraie grandeur des procédures de standardisation ;
- Le CQE présente de plus en plus une valeur pédagogique, grâce à des documents de synthèse annexés aux tableaux des résultats : informations répétées sur l'INR, articles sur l'ATIII, sur la définition et la détection des anticoagulants circulants...

IV.4.2.4. Limites

Le CQE est ponctuel, limité à quelques contrôles par an (en général quatre). Contrairement au CQI qui est le reflet immédiat du déroulement d'une analyse ou d'une série d'analyse, le CQE est donc un contrôle indirect, basé sur l'analyse d'échantillons lyophilisés qui simulent des plasmas de patients.

Le délai de réponse est un désavantage majeur du CQE : les résultats, même s'ils sont mauvais, ne seront pas connus avant plusieurs jours ou semaines, durant lesquelles des résultats faux ont pu être rendus par le laboratoire.

Ces délais entre l'étude des échantillons et le retour des résultats ont été l'objet des critiques.

Ils sont dus à toutes les procédures assurant l'anonymat des résultats vis-à-vis de l'équipe scientifique, aux problèmes de routage des échantillons et des documents réponse....

MATERIEL ET METHODES

I.MATERIEL

I.1. POPULATION TEMOIN

Il s'agit de 62 sujets des deux sexes, comprenant 30 hommes (48,4%) et 32 femmes (51,6%) âgés de 19 à 51 ans en bonne santé apparente, en dehors de toute hospitalisation et sans antécédent (ne prenant pas de médicament interférent avec la coagulation (exemple : anti vitamine K, antibiotiques....)).

I.2. LES PRELEVEMENTS

Les prélèvements ont été réalisés au laboratoire d'hémiobiologie du centre hospitalier et universitaire de Tlemcen le matin sur des sujets à jeûne après un repos de 30 minutes environ. L'échantillon sanguin est obtenu par ponction veineuse franche, sur citrate trisodique 0,109M (3,2%), dans un rapport de 9 volumes de sang pour un volume d'anticoagulant.

Ils sont acheminés rapidement au laboratoire dans un délai d'une heure. Les examens sont réalisés sur du plasma citraté pauvre en plaquettes, obtenu après centrifugation à 2500 g/minute pendant 15 minutes.

I.3. STA COMPACT®

I.3.1. Définition :

Le STA Compact® est un automate de laboratoire conçu pour réaliser des tests *in vitro* destinés au diagnostic des pathologies liées à l'hémostase ainsi pour aider à la surveillance des traitements anticoagulants. Il permet de réaliser des tests de chronométrie (mesure d'un temps de coagulation), de colorimétrie ou d'immunologie (méthode des micro-latex) sur des échantillons de plasma. Il est conçu pour fonctionner 24h/24h.

I.3.2. Procédure d'installation :

Le STA Compact® ne peut être installé que par un représentant de SAV. De même, si le STA Compact® doit être déplacé, ceci doit être impérativement fait par un représentant du SAV qui dispose des éléments nécessaires pour la manipulation de l'instrument.

Les spécifications techniques du STA Compact® sont résumées dans l'ANNEXE1.

I.3.3. Description du système STA Compact® :

I.3.3.1. STA Compact® vue globale :

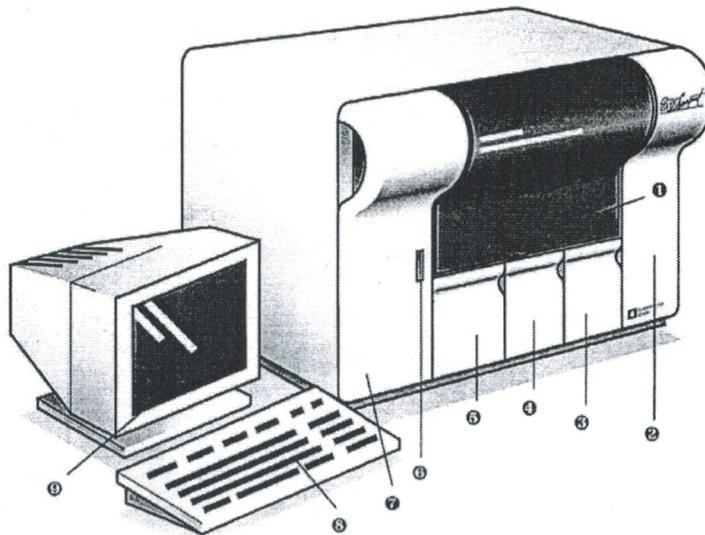


Fig.4: STA Compact® , vue globale

- 1- Face avant,
- 2- Portillon droit (accès au pipeteur et à la bobine de cuvettes),
- 3- Tiroir poubelle cuvettes,
- 4- Tiroir produits,
- 5- Tiroirs échantillons,
- 6- Lecteur codes à barres,
- 7- Portillon gauche (accès au lecteur de disquettes),
- 8- Clavier,
- 9- Ecran couleur VGA

I.3.3.2. Cycle analytique sur STA Compact® :

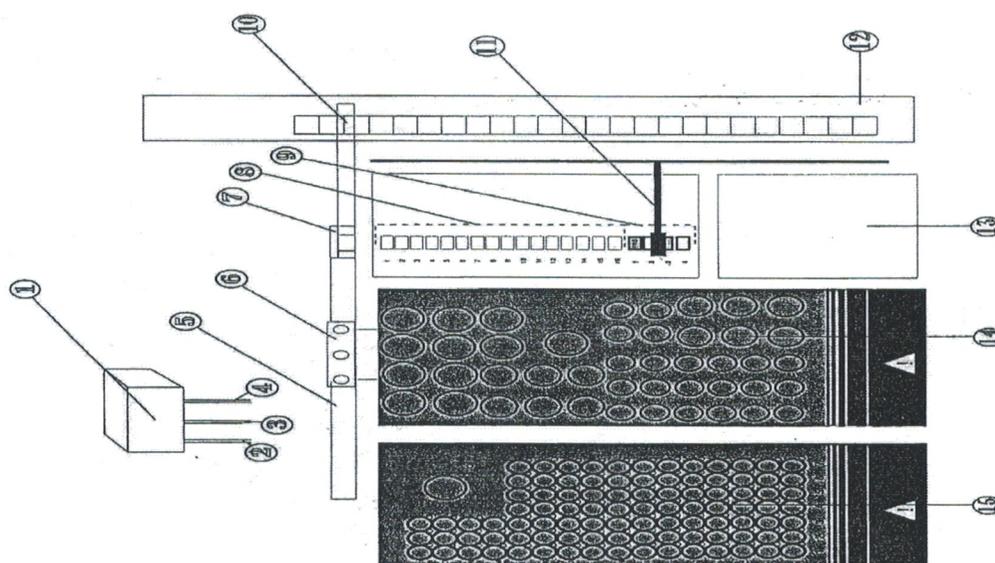


Fig.5: cycle analytique sur STA Compact®

- 1- Tête de pipetage équipée de 3 aiguilles
- 2- Aiguille n°1 (échantillons)
- 3- Aiguille n°2
- 4- Aiguille n°3
- 5- Vérin pneumatique
- 6- Puits de rinçage
- 7- Station de mesure
- 8- Zone d'incubation (16 positions)
- 9- Zone de mesure (4 positions)
- 10- Station approvisionnement en cuvettes
- 11- Tête de préhension
- 12- Tiroir bobine de cuvettes
- 13- Tiroir poubelle cuvettes
- 14- Tiroir produits
- 15- Tiroir échantillon

Les tubes primaires et les tampons de dilution sont chargés dans le tiroir échantillons où leur position est automatiquement reconnue par le système d'identification positive.

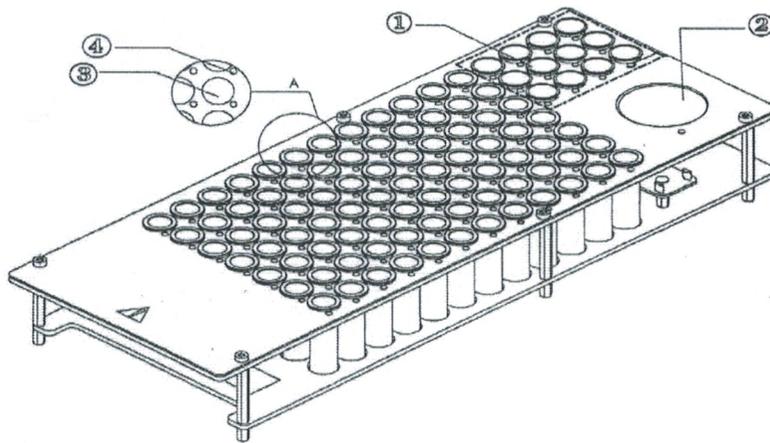


Fig.6: Tiroir échantillons

- 1- zone pour tubes pédiatriques
- 2- position pour flacon de diluant
- 3- position pour tube 5 ml
- 4- LED de statut : ON= tube en cours, OFF = rien, clignotant = tube à retirer

Les flacons de plasmas de contrôle, de plasmas de calibration ou de réactifs sont placés dans le tiroir produits où leur température est maintenue entre 15°C et 19°C par un système basé sur des effets Peltier. Leurs positions sont également reconnues par le système d'identification positive.

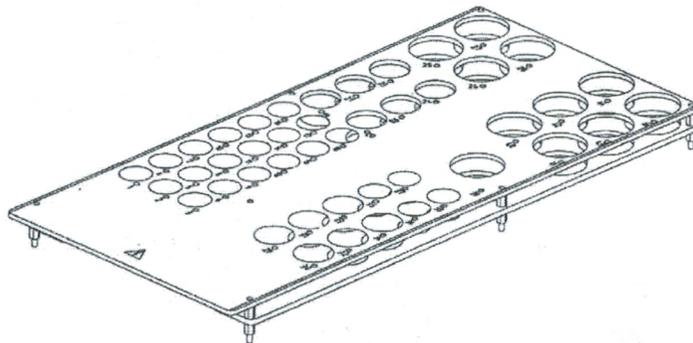


Fig.7: Tiroir produits

Les échantillons, les plasmas de contrôle et les plasmas de calibration sont pipetés par l'aiguille n°1 de la tête de pipetage, puis ils sont distribués dans une cuvette en position incubation.

Les réactifs à distribuer avant la première incubation sont pipetés par l'aiguille n°2 de la tête de pipetage, puis ils sont distribués dans la cuvette correspondante en position incubation.

Les réactifs à distribuer après la première incubation (principalement les réactifs déclenchants) sont pipetés par l'aiguille n°3 de la tête de pipetage. Quand un préchauffage à 37°C est nécessaire, ils sont acheminés de l'aiguille n°3 au tube chauffant n°3 se trouvant juste au dessus. Puis, avec ou sans préchauffage, ces réactifs sont distribués dans la cuvette correspondante en zone mesure.

Chaque aiguille est équipée d'un système de détection de niveau de liquide ; ce qui minimise les contaminations possibles et assure un prélèvement sûr. Entre chaque pipetage, les aiguilles sont rincées intérieurement et extérieurement dans leur puits de rinçage respectifs.

Les cuvettes de réaction et de mesure sont chargées sur le STA Compact® sous la forme d'une bobine de 1000 cuvettes. A la station approvisionnement en cuvettes, elles sont distribuées une par une dans une navette. Cette navette est ensuite déplacée vers la station mesure par un système basé sur un vérin pneumatique. A cette station, la tête préhension vient prendre la cuvette et la dépose en zone d'incubation.

Cette même tête assure, ensuite, le transfert de la cuvette de la zone incubation à la zone mesure puis de la zone mesure à la poubelle cuvettes.

La zone incubation et la zone mesure font partie du même bloc qui est maintenu à $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ par un système basé sur des effets Peltier.

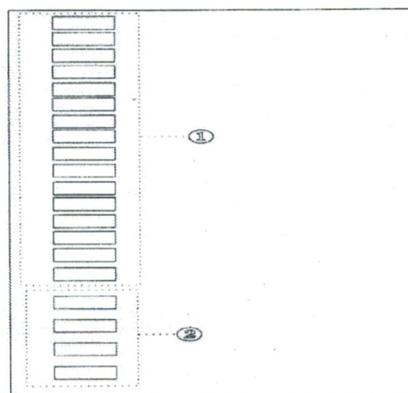


Fig.8: Platine mesure

- 1- Zone d'incubation, 16 positions
- 2- Zone de mesure, 4 têtes de mesure

Tous ces principes confèrent à la machine le pouvoir de traiter chaque test totalement indépendamment des autres et d'offrir une cadence de travail quasi indépendante des temps d'analyse.

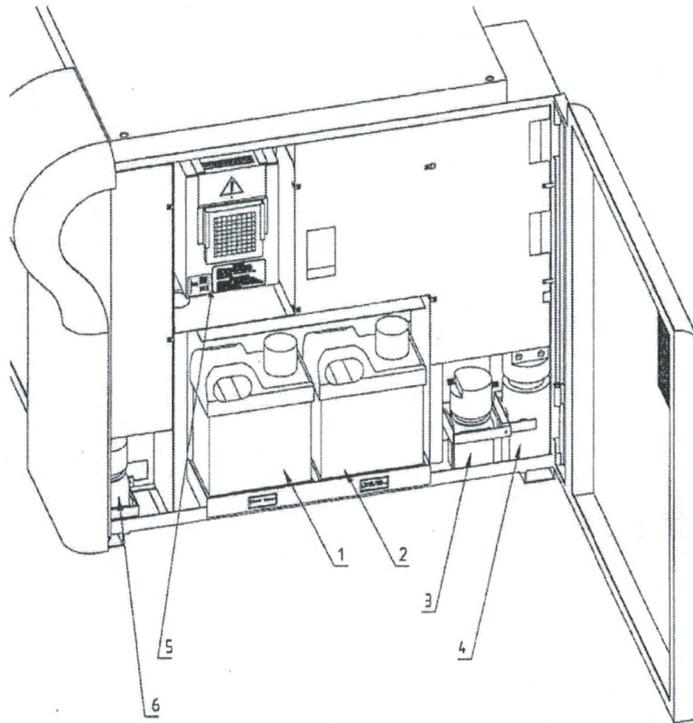


Fig.9: STA Compact® vue de droite

- 1- Bidon de STA® - Cleaner Solution
- 2- Poubelle liquide
- 3- Réservoir Tampon
- 4- Réservoir de rinçage
- 5- Boitier photométrie (pour le changement de lampe)
- 6- Réservoir Peltier

I.3.3.3. Principe de mesure

I.3.3.3.1. En chronométrie

Le principe consiste à mesurer la variation de l'amplitude d'oscillation de la bille. Une diminution de l'amplitude correspond à une augmentation de la viscosité du milieu, soit au

phénomène de coagulation. Un algorithme utilise cette variation d'amplitude pour déterminer le temps de coagulation.

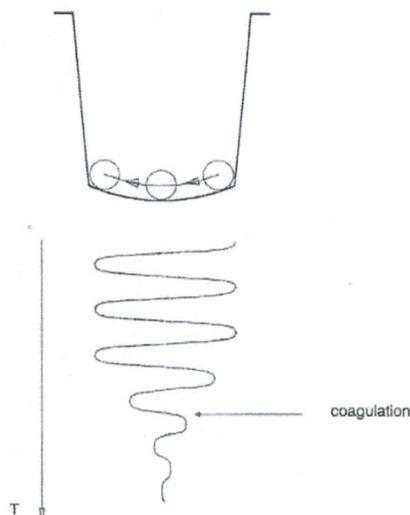


Fig.10: Schéma mouvement de la bille.

A viscosité constante, on obtient un balancement pendulaire constant de la bille grâce à deux rails incurvés du fond des cuves et un champ électromagnétique crée alternativement de chaque côté de la tête de mesure pour entretenir ce balancement.

Pour chaque tête de mesure, le champ magnétique est créé par deux bobines de motorisation et est ajusté en fonction de la viscosité du milieu et du type de test (caillot faible pour le fibrinogène, caillot normal pour tous les autres). Les bobines de mesure comprennent une bobine émettrice et une bobine réceptrice.

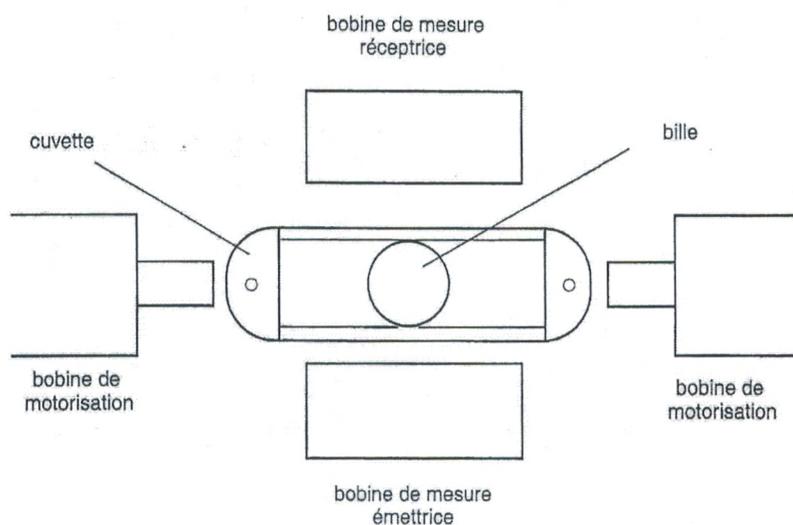


Fig.11: principe physique du système de mesure

1.3.3.3.2 En colorimétrie :

Le principe de détection des tests chromogéniques ou immunologiques sur STA Compact[®] est basé sur l'absorbance (densité optique, DO) d'une lumière monochromatique (405 nm ou 540 nm) passant au travers d'une cuvette au moment où une réaction chromogénique a lieu.

Le principe de mesure d'absorbance est présenté par le schéma ci-dessous. La lumière incidente (I_0) pénétrant la cuvette est partiellement absorbée par le milieu réactionnel lors de son passage.

La lumière transmise ($I_1 = I + I_p$) est mesurée et convertie en absorbance par l'équation suivante :

$$A = -\log (I_1 / I_0)$$

Note : log décimal

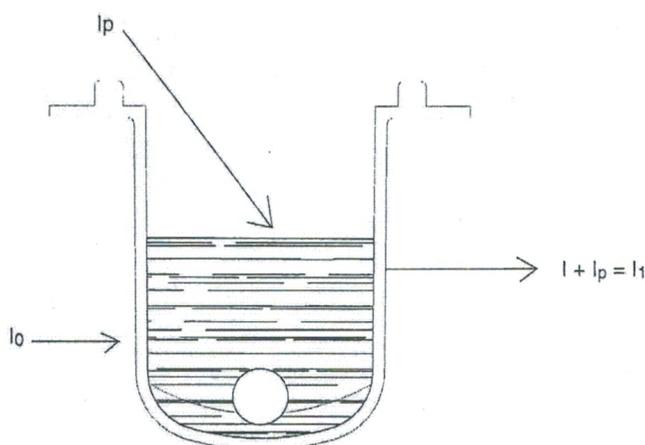


Fig .12: principe de mesure d'absorbance

La lumière parasite (I_p) est éliminée en prenant 2 mesures rapprochées de la lumière transmise :

$I_1 = I + I_p$ (première mesure avec lumière incidente et lumière parasite),

$I_2 = I_p$ (seconde mesure en bloquant la lumière incidente, correspond à la lumière parasite).

Puis en soustrayant I_2 de I_1 , on obtient I correspondant à la lumière résultante de la lumière incidente seule. On suppose que la lumière parasite (I_p) reste identique entre les 2 mesures.

La source de la lumière incidente monochromatique (I_0) est obtenue à partir d'une lampe tungstène-halogène et d'un filtre monochromatique (405nm ou 540 nm) placé dans une porte filtre mobile.

A partir des mesures de densité optiques obtenues, la loi de Beer-Lambert est appliquée, soit :

$$A = \epsilon I C$$

A=absorbance

ϵ = coefficient d'extinction moléculaire

l = longueur du trajet optique

C= concentration

Où la concentration du chromogène recherché est directement proportionnelle à l'absorbance.

II. METHODES

Pour atteindre nos objectifs on se limite au dosage de trois paramètres d'hémostase : temps de Quick (TQ) ou taux de prothrombine (TP), temps de céphaline+activateur (TCA) et le fibrinogène. Les mesures ont été réalisées sur le STA Compact de Diagnostica Stago dont la détection du caillot est basée sur le principe chronométrique.

Avant de réaliser le dosage, il faut d'abord préparer l'appareil et vérifier le bon fonctionnement du système en suivant les étapes ci-dessous :

II.1. Préparation du STA Compact

On met le STA Compact en marche par l'interrupteur marche/arrêt. L'appareil procède à diverses vérifications au niveau des logiciels et de l'automatisme. S'il détecte un problème, un message d'erreur sera affiché en fonction de l'erreur trouvée.

Il faut attendre 25 minutes pour que la température du tiroir produits soit stabilisée.

Quand la fenêtre VERIFICATION TERMINEE est affichée, on peut alors accéder au tableau de bord qui représente un écran essentiel permettant d'accéder à toutes les opérations sur STA Compact®.

Pour éviter toute alerte d'erreur au cours des analyses il est nécessaire de vérifier la bobine de cuvette, sac poubelle de cuvette (changé systématiquement pour chaque changement de bobine de cuvette) et le liquide de lavage STA®-Cleaner Solution. Aussi, tout au long de son utilisation, l'appareil devra subir des maintenances régulières par le personnel qualifié du laboratoire (les technologistes médicaux, technologues ou techniciens de laboratoire).

II.2. Chargement des produits et échantillons

Lorsque les réactifs sont prêts à l'emploi (ANNEXE 3), on fait passer le code-barre imprimé sur l'étiquette du flacon devant le lecteur code-barre du STA Compact®. On valide le volume de réactif indiqué par l'appareil. Puis, on place le réactif dans le tiroir produits du STA Compact®. Le bip émis alors par l'instrument indique que l'identification et la position du réactif sont bien enregistrées par le STA Compact®.

Le chargement des échantillons se fait en mentionnant sur l'écran du STA Compact le nom et le prénom du malade puis on place le tube dans le tiroir échantillons, la position du tube sera reconnue automatiquement par le STA Compact.

Si l'identification positive n'est plus fonctionnelle (totalement ou partiellement) sur le tiroir échantillons ou sur le tiroir produits, la position des tubes ou flacons peut être saisie manuellement.

Avant tout chargement, les points suivants devront être vérifiés :

- Pour réactifs et autres produits (contrôles, calibrateurs, diluants et solutions décontaminantes), on observe s'il y a présence de mousse en surface, si oui on l'élimine.
- Pour les échantillons, on n'utilise que des tubes centrifugés et on vérifie que le plasma soit en quantité suffisante et qu'aucune mousse, qu'aucun caillot ou micro-caillot ne puissent venir troubler les résultats.

Si la gestion de détection de niveau a été neutralisée pour une ou plusieurs aiguilles, un message d'avertissement s'affichera à l'ouverture du tiroir concerné (tiroir échantillons, pour aiguille N°1, tiroirs produits pour les trois aiguilles).

II.3. Déchargement des échantillons ou des produits

II.3.1 Déchargement avec identification positive

Cette procédure n'est possible que pour les échantillons ou les produits chargés avec identification positive : soit reconnaissance automatique de la position de chargement dans le tiroir par le STA Compact®.

Les LED adjacentes au tube (flacon) clignotent :

- Pour les échantillons dont les dossiers correspondants sont terminés,
- Pour les produits qui ne sont plus valables en volume ou/ et en stabilité.

II.3.2. Déchargement sans identification positive :

Cette méthode de déchargement n'est possible que pour les produits ou échantillons présents dans le tiroir actuellement ouvert. Elle est absolument nécessaire pour les produits ou échantillons chargés sans identification positive.

II.4. Maintenance

Au niveau du laboratoire d'hémodiagnostic du CHUT, les deux types de maintenances sont appliquées.

- Une maintenance préventive est réalisée (ANNEXE 4) :

Une fois par semaine pour les aiguilles, puits de rinçage, réservoir peltier, tiroirs échantillons et produits.

Une fois par mois par un changement de l'embout téflon et le joint de la seringue.

Une fois par trois mois par remplacement des filtres à air.

- Une maintenance curative :

C'est une maintenance plus poussée (changement de pièces du STA Compact) qui doit être pratiquée par le représentant du SAV du constructeur en cas d'anomalies constatées entraînant un rejet des séries en cours, il faudra alors mettre en œuvre des procédures de dépannage plus ou moins lourdes selon les cas.

II.5. Lancement des analyses (fermeture du tiroir échantillons ou produits)

Le lancement ou l'arrêt des tests peut aussi être déterminé à partir du menu Etat. Dès qu'on confirme le lancement des tests, le traitement des échantillons se fait ainsi :

- Pipetage des calibrateurs pour tous les tests,
- Pipetage des contrôles de calibration pour tous les tests,
- Pipetage des contrôles de qualité pour tous les tests,
- Pipetage des échantillons urgents,
- Pipetage des échantillons pour tous les tests suivant l'ordre chronologique de chargement.

II.6. Calibration

La calibration est réalisée obligatoirement à chaque nouveau lot de réactif et peut être effectuée suivant 7 modes différents (ANNEXE 5).

A chaque nouveau numéro lot, les concentrations des étalons et/ou la valeur des seuils pour les contrôles de calibration des produits de la ligne STA[®] de Diagnostica Stago sont lues par l'intermédiaire de la lecture des feuilles de codes à barres se trouvant dans chaque boîte de produit.

L'utilisation des contrôles de calibration permet de valider automatiquement les calibrations. On a obligatoirement 2 niveaux de contrôles de calibration car un seul niveau ne permet pas de valider de manière fiable une pente.

Les étalons sont lancés soit en simple, soit en double suivant le type de détermination choisie dans les écrans **CONFIGURATION DE TESTS**.

Quant ils sont définis, les contrôles de calibration sont lancés soit en simple, soit en double suivant le type de l'échantillon.

Dès que les résultats des contrôles de calibration sont obtenus, ils sont comparés à leurs plages d'acceptation ; si ceux-ci sont en dehors, le STA Compact[®] relance alors automatiquement des contrôles suivant le principe ci-dessous :

1 er lancement	Résultat (s)	Relance automatique STA Compact®
Contrôle lancé en simple	En dehors de la plage définie	Relance du contrôle en double
Contrôle lancé en double	1 des 2 résultats est en dehors de la plage définie	Relance du contrôle en simple

La calibration peut être non validée automatiquement dans deux cas :

- Calibration non validée à cause de contrôles de calibration hors normes,
- Calibration non validée due à l'absence de contrôles de calibration.

- Correction du point 100% :

Cette option n'est proposée que dans le cas de tests chronométriques avec % comme unité principale et avec l'échelle des mesures en linéaire et l'échelle de concentration en inverse. Elle permet de déplacer parallèlement à elle-même la courbe de calibration de façon à ce qu'elle passe par le nouveau point donné en seconde et qui correspond à 100%.

II.7. Contrôle de qualité

II.7.1. Contrôle de qualité interne

Pour chaque test (TP, TCA et fibrinogène), on effectue des contrôles de qualité à intervalle régulier, au moins une fois par série d'analyses, mais minimum une fois par jour, aussi lors de :

- Changement de lots de réactifs,
- Nouvel étalonnage,
- Changement de pipettes,
- Survenue de problèmes techniques et après chaque service,
- Changement de personnel (nouveau collaborateur),
- Et dans tous les cas où il est jugé nécessaire ou en cas de doute sur les résultats obtenus.

Les réactifs utilisés pour le contrôle sont STA®-System Control N et STA®-System Control P (ANNEXE 3).

Les résultats des contrôles de qualité sont reportés sur le diagramme de Levey-Jennings et sont interprétés suivant les règles de westgard.

Quand on change des contrôles avec un nouveau lot, les valeurs de l'ancien lot sont automatiquement effacées, le lot précédent devient l'ancien lot et le nouveau lot le lot courant.

Les contrôles de qualité sont lancés soit en simple, soit en double suivant le type de détermination choisi pour l'échantillon.

Dés que les résultats d'un contrôle de qualité sont obtenus, ils sont comparés à la plage d'acceptation, si ceux-ci sont en dehors, le STA Compact relance alors automatiquement d'autres contrôles suivant le principe ci-dessous :

1 ^{er} lancement	Résultat (s)	Relance automatique STA Compact [®]
Contrôle lancé en simple	En dehors de la plage définie	Relance du contrôle en double
Contrôle lancé en double	1 des 2 résultats est en dehors de la plage définie	Relance du contrôle en simple

S'il est confirmé que le contrôle de qualité est en dehors de la plage d'acceptation, tous les résultats des patients pour le test concerné seront accompagnés du message d'alarme « Contrôle de qualité : hors normes ou non fait ».

Si on décide d'accepter les résultats d'un contrôle de qualité déclaré hors norme, tous les résultats des patients pour le test concerné seront accompagnés du message d'alarme : « Contrôle de qualité : validation forcée ».

NB: Si l'appareil signale que les résultats obtenus pour les contrôles se situent en dehors des fourchettes indiquées sur les papillons inclus dans le coffret STA[®]-Coag Control N+P ou STA[®]-System Control N+P, s'assurer du bon fonctionnement de tout le système : conditions opératoires, réactifs, plasmas à tester, etc. Si besoin, recommencer les tests.

II.7.2. Contrôle de qualité externe

Le laboratoire d'hémiologie unité hémostase de CHUT a participé à un programme de contrôle de qualité externe ponctuel en collaboration avec la société Stago en 2004 et 2008.

Le laboratoire reçoit une série d'échantillons lyophilisés ou liquides "inconnus". Ces échantillons sont dosés par le laboratoire pour chaque test effectué. Les résultats obtenus sont

transmis à l'organisateur du contrôle ponctuel qui recueille les données et utilise divers modèles statistiques pour déterminer la valeur vraie de l'échantillon inconnu lors de chaque test. Ensuite, le résultat du test transmis par chaque laboratoire est comparé à la valeur vraie et le laboratoire est évalué sur son exactitude

II.8. Lancement des tests d'hémostase

II.8.1. Temps de Quick (TQ) :

Le principe consiste à comparer ; en présence de facteur tissulaire, de phospholipides et d'ion calcium ; le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté à étudier par rapport à un témoin normal servant de référence.

Le TQ permet d'étudier globalement les facteurs de la voie exogène de la coagulation, FVII (proconvertine), FX (stuart), FII (prothrombine), FV (proaccélélerine) et le fibrinogène.

Le réactif utilisé est une thromboplastine tissulaire STA-NEOPLASTINE®CI (Voir ANNEXE3) qu'on place dans la zone avec agitation magnétique du tiroir produits.

Identification						
Abréviation		TP				
Nom		Taux de prothrombine				
Méthode		chronométrie				
Echantillon			Diluant			
Volume	Incubation	Dilution	Nom	flacon	Stabilité	Volume min.
50µl	240sec	1/1	OWREN-KOLLER	15ml	72h	0,90ml
Réactifs						
Nom	volume	flacon	stabilité	volume min	Lavage	
STA-Neoplastine CI	100µl	5ou	48h	0,70 ou 0,90ml	avant	après
		10ml			Non	intensif
Calibration						
Mode : codes à barres						
Points de visualisation				100,00%		
				50,00%		
				33,33%		
				25,00%		
Contrôles	Nom			flacon	Stabilité	Volume min
Niveau 1						
Niveau 2	STA –SYSTEM CONT N			1 ml	8h	0,50 ml
	STA –SYSTEMCONT P			1 ml	8h	0,50 ml

La détermination du temps de Quick des plasmas à tester est effectuée automatiquement par l'automate au fur et à mesure du chargement des échantillons.

Les résultats du test sont exprimés :

- soit en secondes par rapport à un témoin : temps de Quick (TQ), (12 à 14 sec).
- soit en pourcentage d'activité : taux de prothrombine (TP), la conversion du TQ en TP se fait ainsi :

On établit une courbe d'étalonnage à partir du plasma témoin (PPP) ;

Le plasma est dilué au 1/2, 1/3, 1/4, et au 1/5, dans le tampon d'Owren-Koller, puis on mesure le temps de Quick pour chaque dilution ;

Les temps de coagulation sont portés en ordonnée et les inverses des dilutions en abscisse. On considère que le TQ fait sur plasma pur non dilué correspond à 100% de TP, donc la dilution au demi correspond à 50%. Si on joint les points on obtient une droite d'étalonnage dite de Thyvolle

En pratique courante, on établit cette droite d'étalonnage à chaque nouveau lot de NEOPLASTINE.

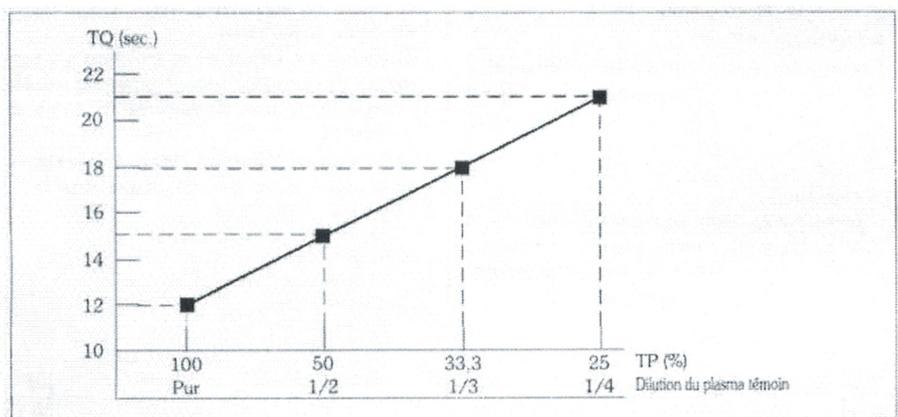


Fig.13: Courbe de Thyvolle

- Soit en INR (*International Normalized Ratio*) permettant une standardisation du suivi des patients traités par antivitamines K (AVK) exclusivement.

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TQ malade}}{\text{TQ témoin}} \right) \text{ISI}$$

- TQ malade : le temps de Quick mesuré pour le plasma du patient à tester ;
- TQ témoin : le temps de Quick témoins (TP = 100 %) ;
- ISI : l'indice de sensibilité international spécifique du réactif NEOPLASTINE utilisé.

L'INR n'a pas d'unité. Il est, par définition, indépendant du réactif utilisé, et plusieurs mesures successives, faites dans des laboratoires différents, peuvent être comparées entre elles sans problème.

II.8.2. Temps de céphaline activée (TCA) :

C'est le temps que met un plasma citraté à coaguler en présence de céphaline et d'un activateur lorsqu'on ajoute du chlorure de calcium. La céphaline, qui est un phospholipide, fournit l'équivalent du facteur 3 plaquettaire ; l'activateur assure l'activation du facteur XII et XI.

Le TCA explore l'activité des facteurs endogènes de la coagulation XII, XI, IX, VIII, X, V, II ainsi que le fibrinogène.

Les réactifs utilisés sont le STA-C.K.Prest® qu'on place dans la zone avec agitation magnétique du tiroir produits et STA-CaCl2 0,025M. (Voir ANNEXE3).

Identification							
Abréviation		TCK					
Nom		Temps de céphaline activée					
Méthode		chronométrie					
Echantillons							
Volum e	Incubation	Dilution					
50 µl	0 sec	1/1					
Réactifs							
Nom	Incubation	Volume	Flacon	Stabilité	Volume min.	Lavage	
						avant	apr ès
STA- CK.PREST CaCl2 0,025M	240 sec	50µl	5ml	48h	1,60ml	non	normal
		50µl	15ml	72h	0,90ml	non	normal
Calibration							
Mode: Ratio							
contrôles	Nom		Flacon	Stabilité	volume min		

niveau 1	STA –SYSTEM CONT N	1 ml	8h	0,50ml
niveau 2	STA –SYSTEMCONT P	1 ml	8h	0,50ml

La détermination de temps de céphaline–Kaolin des plasmas à tester est effectuée automatiquement par le STA Compact® au fur et à mesure du chargement des échantillons.

Les résultats sont exprimés en secondes par rapport à un témoin (30 à 40 sec). Pour une meilleure interprétation du TCA, on calcul le rapport TCA malade/ TCA témoin qui doit être inférieur à 1,2.

II.8.3. Dosage du Fibrinogène :

La mesure est effectuée par méthode fonctionnelle chronométrique basée sur la mesure du temps de thrombine (TT) selon Clauss. En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma contenant une faible concentration de fibrinogène est proportionnel au taux de fibrinogène plasmatique.

Le réactif est la thrombine calcique titrée contenant un inhibiteur spécifique de l'héparine (fibriprest Automate). (Voir ANNEXE 3)

Identification						
Abréviation		FIB				
Nom		Fibrinogène				
Méthode		chronométrie				
Echantillon			Diluant			
Volume	Incubation	Dilution	Nom	flacon	Stabilité	Volume min.
100µl	240sec	1/20	OWREN-KOLLER	15ml	72h	0,90ml
Réactifs						
Nom	volume	flacon	stabilité	volume min	Lavage	
STA-FIBRINOGEN	50µl	5ml	96h	0,70 ml	avant	après
					Non	spécial
Calibration						
Mode : codes à barres						
Points de visualisation				1,00g/l 3,00g/l 6,00g/l 9,00g/l 12,00g/l		
Contrôles	Nom		Flacon		Stabilité	Volume min
Niveau 1						
Niveau 2	STA –SYSTEM CONT N		1 ml		8h	0,50 ml
	STA –SYSTEMCONT P		1 ml		8h	0,50 ml

Le lavage spécial se fait par le STA – DESORB U

Le dosage du fibrinogène des plasmas à tester est effectué automatiquement par le STA Compact® au fur et à mesure du chargement des échantillons. Si pour un plasma, le résultat obtenu est en dehors de la zone de mesure, le STA Compact réalise automatiquement la dilution appropriée pour cet échantillon et ré exécute la mesure.

Les résultats sont exprimés en g/l de plasma au moyen d'une droite d'étalonnage. Cette droite est obtenue en portant les temps de coagulation en ordonné et les concentrations correspondant aux dilutions de la solution témoin en abscisse d'une feuille bilogarithmique. La concentration du fibrinogène du plasma à tester est obtenue par interpolation.

Les valeurs normales sont comprises entre 2 et 4,5 g/l.

RESULTATS

I. CALCULS DES VALEURS DE REFERENCES

La moyenne à été assignée à un intervalle de confiance de 95% soit, la moyenne géométrique \pm 2DS (Déviations Standards).

Variable	Etude réalisée				Littérature		
	Moy	Ecart type	IC (95%)	N	Moy	IC	N
TP (%)	92,2	8,73	74 - 110	60		70 - 120	
INR	1,07	0,09	0,9 - 1,2	60	1	0,8 - 1,2	51
TQ (sec)	12,8	0,76	11,2 - 14,3	60	13	11,5 - 14,5	51
TCA (sec)	36,1	2,79	30,5 - 41,7	60	33,2	28,6 - 38,2	42
FIB (g/l)	3,06	0,58	1,8 - 3,2	60	3,1	1,9 - 4,3	55

Tableau1 : valeurs normales de TP, TCA et Fibrinogène étudiés dans une population saine.

Analyse et interprétation :

Nos valeurs sont proches de celles de la littérature (20)

II. ANALYSE DES RESULTATS DE CONTROLE DE QUALITE

II.1. Distribution des prélèvements non conformes en hémostase

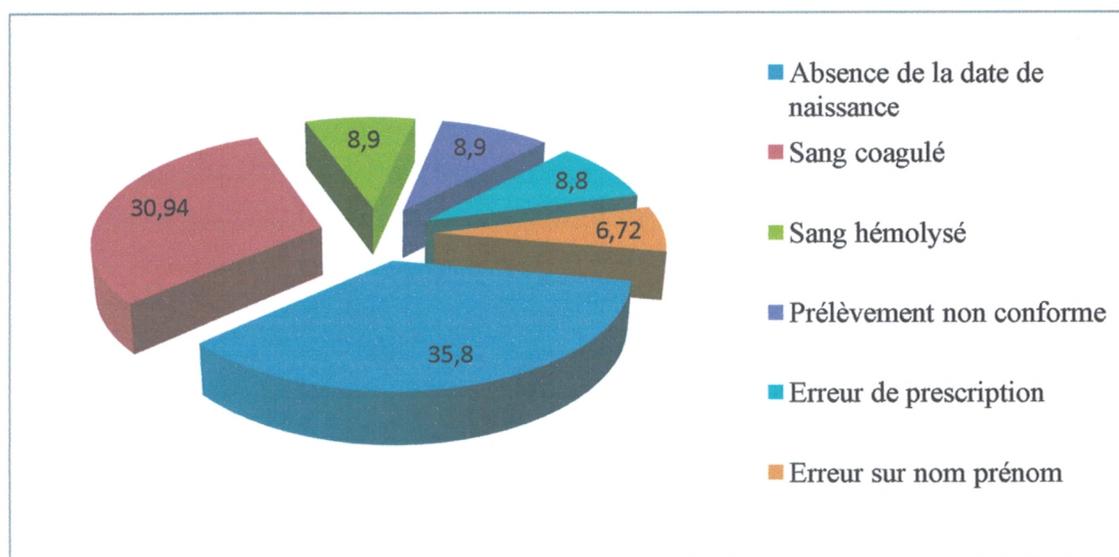


Fig.14: Pourcentage des anomalies les plus fréquentes pour prélèvement d'hémostase

Sur près de 6050 demandes, 223 anomalies ont été observées soit 3,7%, il n'y a pas de répartition homogène des erreurs.

II.2. Interprétation des résultats de contrôle de qualité interne

TP:

Moyenne = 12,29

Ecart-type = 0,20

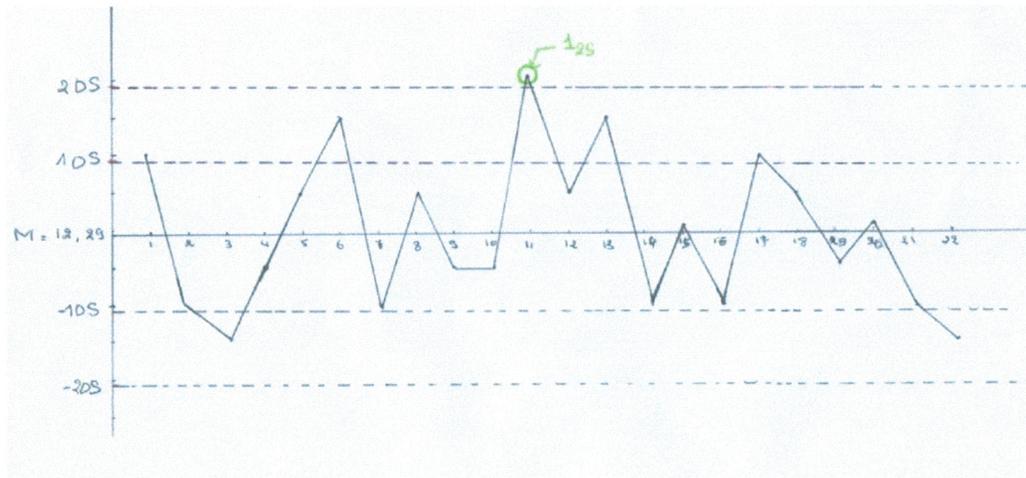


Fig.15:Diagramme de Levey-Jennings pour 22 résultats de contrôle de dosage du TP en seconde

TCA:

Moyenne = 33,4

Ecart-type = 2,56

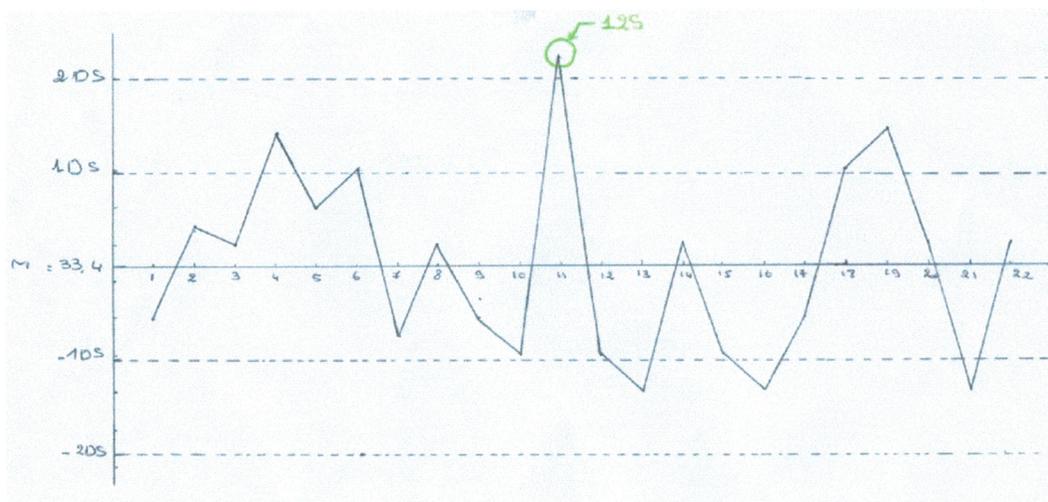


Fig.16:Diagramme de Levey-Jennings pour 22 résultats de contrôle de dosage du TCA en seconde

Analyse et interprétation :

Série 11 (TP et TCA) présence d'un signal 1_{2S} qui représente la règle de contrôle où une observation excède la limite fixée à $\pm 2S$. Il s'agit d'une règle d'alarme sur le diagramme de Levey Jennings et elle est interprétée comme une exigence nécessitant de vérifications d'autres données de contrôle en testant notamment les données avec les autres règles de Westgard pour pouvoir juger si la série peut être acceptée ou doit être rejetée.

II.3. Interprétation des résultats de contrôle de qualité externe

III.1. Année 2004 :

	STA- QCE 2004/1			STA- QCE 2004/2		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
TP Sec	C	A	B	B	B	A
TP %	A	A	B	A	B	A

A : Résultat entre $\pm 1S.D$

B : Résultat entre $\pm 2S.D$

C : Résultat en dehors de $\pm 2S.D$

- Nos résultats :

	STA- QCE 2004/1			STA- QCE 2004/2		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
TP Sec	20,2	21,6	23,3	13,1	14,4	13,6
TP %	40,0	40,0	44,0	84,0	80,0	89,0

- Résultats statistiques :

	STA- QCE 2004/1		STA- QCE 2004/2	
	Moy.Cal*	S.D	Moy.Cal*	S.D
TP Sec	22,3	1	13,9	0,4
TP %	40,1	2,5	87,9	4,7

Moy.Cal* : moyenne calculée (moyenne de tous les résultats utilisant les réactifs STAGO).

- Résultats portées sur diagramme de Youden :

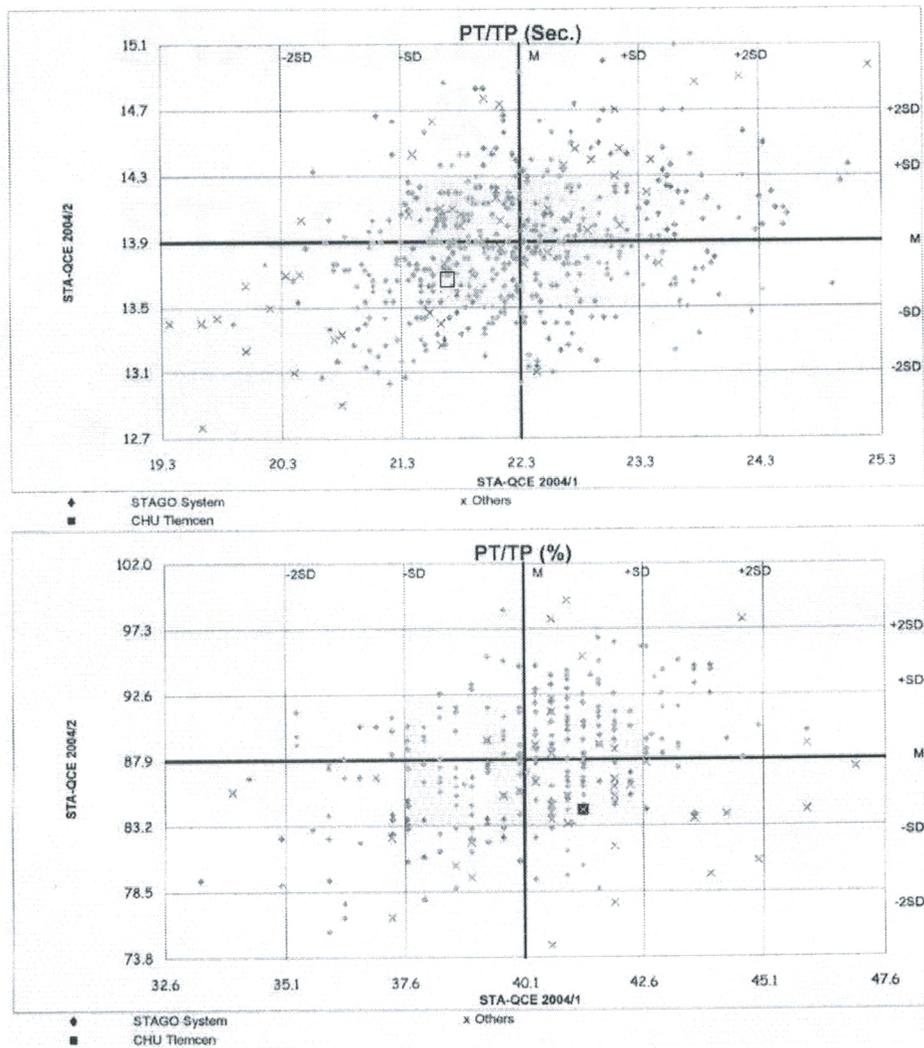


Fig.17: STA-CQE du TP (sec) et TP (%) en 2004

III.2. Année 2008 :

	STA- QCE 2008/1			STA- QCE 2008/2		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
TCA silice (sec)	B	A	A	B	A	A
TP (sec)	A	A	A	C	A	B
TP (INR)	A	A	A	B	A	A

A : Résultat entre moyenne \pm 1 déviation standard (D.S).

B : Résultat entre moyenne \pm 2 déviation standard (2D.S).

C : Résultat en dehors de la moyenne \pm 2 déviation standard (2D.S).

- Nos résultats :

	STA- QCE 2008/1			STA- QCE 2008/2		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
TCA silice (sec) (PTT Automate)	48	55,2	54,6	31,6	32,92	34,3
TP (sec)	24,7	24,30	23,75	12,45	13,67	13,9
TP (INR)	1,99	2,15	2,13	1	1,02	1,04

- Résultats statistiques :

	STA- QCE 2004/1		STA- QCE 2004/2	
	Moy.Cal*	S.D	Moy.Cal*	S.D
TCA Silice (sec) (STA-PTTA/STA-APTT Roche)	55,6	4	33,5	1,6
TCA kaolin (sec) (STA-C.K.PREST/STA APTT Kaolin)	53,5	2,8	29,2	1,1
TCA Cephascreen (sec) (STA Cephascreen)	55	2,7	31,7	1,2

Graphique "Youden Plot" : STA-QCE 2008-1 & 2

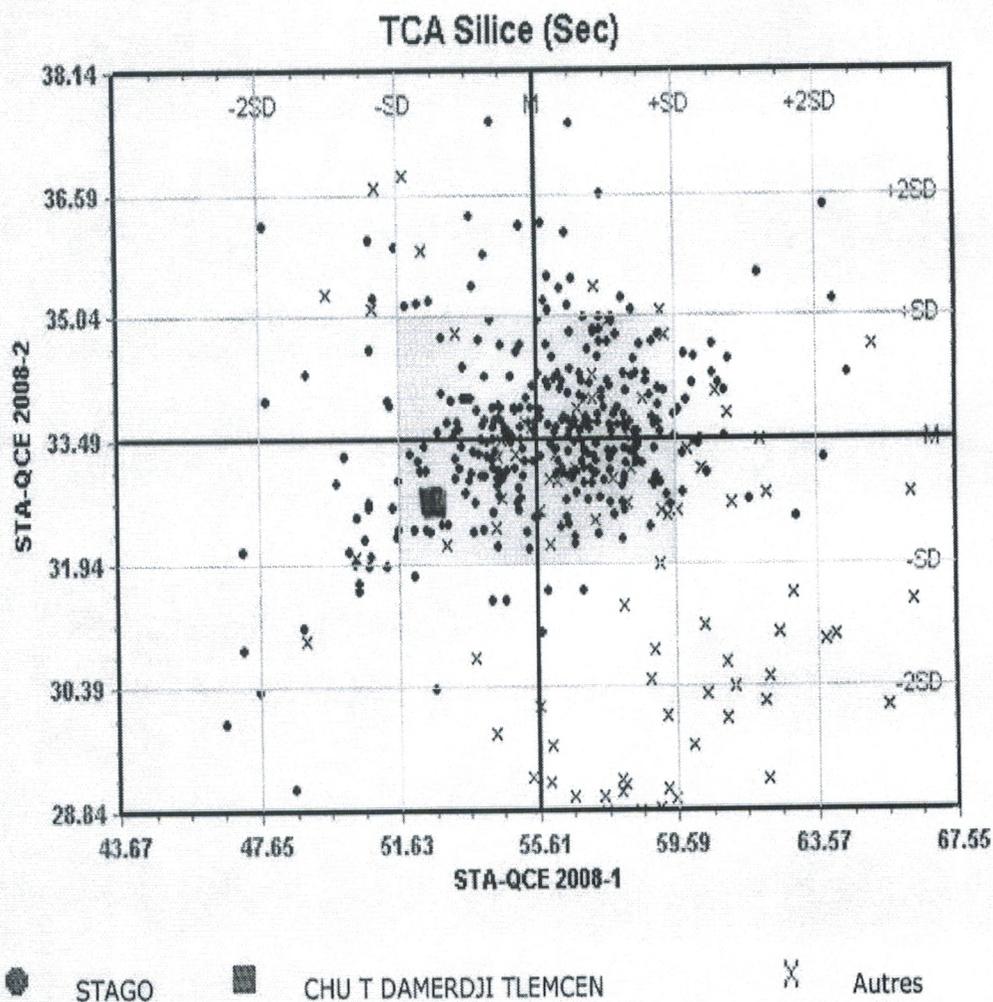


Fig.18: STA-CQE du TCA silice (sec) en 2008

Graphique "Youden Plot" : STA-QCE 2008-1 & 2

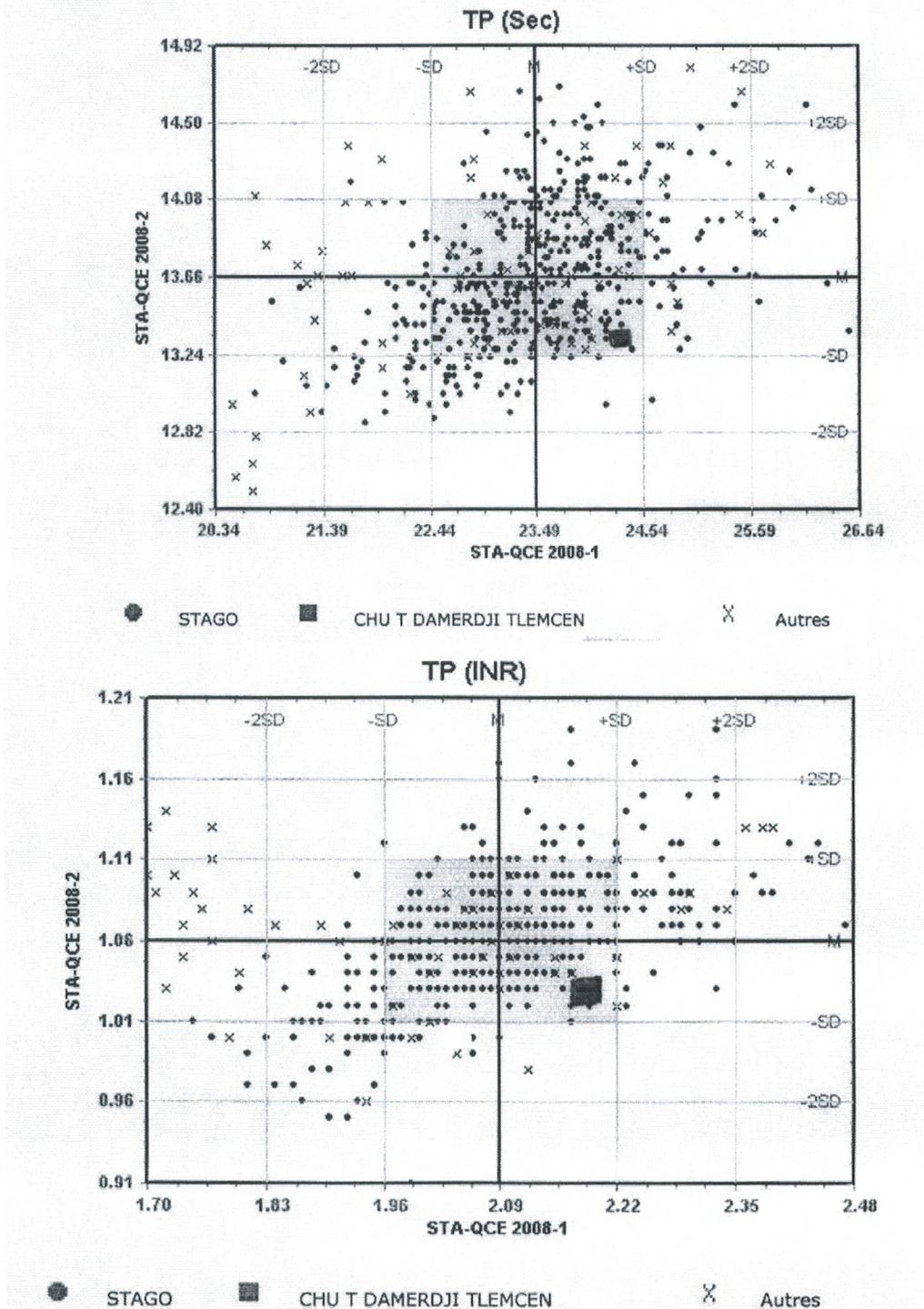


Fig.19: STA-CQE du TP (sec) et TP (INR) en 2008

Analyse et interprétation :

L'analyse des tableaux indique que pour le TP en seconde en 2004, les résultats du laboratoire fluctuent d'un jour à l'autre et même entre les deux échantillons, en 2008 il ya une bonne amélioration des performances.

Cependant, le TP en % a donné de bonnes valeurs, en 2004 les performances ont été satisfaisantes mais c'est un peut reculer en 2008 dont elles sont devenues discutables et générant un signal.

Avec le TCA, le laboratoire a obtenu en 2008 de bons résultats qui prouvent des performances satisfaisantes.

Pour bien visualiser les performances, l'analyse se concentre sur le diagramme de Youden :
Pour tous les paramètres étudiés durant les années 2004 et 2008, les résultats du laboratoire se situent dans la zone acceptable (n'excédant pas une déviation standard par rapport à la moyenne). Cependant les valeurs gagnent progressivement l'angle inférieur droit de la zone acceptable (même sans sortir) pour le TP (INR et sec) en 2008, cela averti d'une manière précoce sur un défaut de linéarité (valeur basse un peu haute, valeur élevée un peu basse), défaut pouvant être lié par exemple à la mauvaise conservation du réactif ...etc.

DISCUSSION GENERALE

1. La phase pré-analytique

La répartition variable des anomalies reflète sans doute l'existence de causes multiples propres à chaque structure, les manœuvres de correction à envisager ne peuvent qu'être adaptées à chaque cas particulier, pour cela cette phase ne peut pas être bien maîtrisée au niveau hospitalier.

La phase analytique

2.1. Contrôle de qualité interne :

Au début la mise en place d'un contrôle de qualité au laboratoire nous a parait simple en se basant sur la création du diagramme de Levey-Jennings à l'aide de la moyenne et l'écart-type de 22 contrôle journaliers qui sont établies pour optimiser la probabilité de détecter une erreur de mesure suffisamment importante, tout en minimisant la fréquence d'alerte erronée. Cependant l'interprétation des résultats peut conduire à des conclusions erronées pour le niveau de contrôle, parce qu'un écart-type basé sur les mesures réalisées pendant une période inférieure à un mois de détermination de la moyenne est généralement insuffisamment représentatif : présente une incertitude importante et a peu de chance d'inclure toute les sources de variabilité possibles de la méthode. Pour cela il fallait déterminer un écart-type cumulé sur une période de 6 à 12 mois qui inclut les contributions de toutes les sources de variabilité telles qu'elles se manifestent et telles qu'elles sont prises en comptes et reflétées par les résultats individuels de contrôle de qualité.

Diagramme de Levey-Jennings

La vérification du diagramme logique d'application d'une série de contrôle dans le procédé multi-règles de Westgard (figure20) nous a conduits à décider que notre série analytique ne devrait pas être rejetée et les résultats des patients seront rendus après validation biologique. Cette dernière est sous la responsabilité d'un biologiste qui maitrise bien les règles de westgard et leurs interprétations. Le problème qui se pose aujourd'hui est que le personnel réalisant les analyses ne maitrise pas le contrôle qualité, ou n'utilise pas les bonnes limites et

les bonnes règles, à part repasser les contrôles encore et encore jusqu'à ce que cela fonctionne correctement.

A fin d'éviter les faux rejets des résultats, le biologiste doit être vigilant des cas suivants :

La série analytique est considérée comme étant sous contrôle et les résultats des patients peuvent être rendus, si aucune valeur de contrôle n'excède la limite 2S.

Les données de contrôle sont vérifiées par rapport aux règles 1_{3s} , 2_{2s} , R_{4s} et 10_x , si une valeur de contrôle excède la limite 2S. Dans le cas où aucune de ces règles n'est violée, la série est estimée sous contrôle. Par contre si l'une d'entre elles est enfreinte, la série est déclarée hors contrôle.

Selon la nature de la règle violée, on aura une indication sur le type d'erreur analytique qui se manifeste. Les erreurs aléatoires étant le plus souvent détectées par les règles 1_{3s} et R_{4s} , les erreurs systématiques seront généralement détectées par les règles 2_{2s} , 4_{1s} et 10_x ou lorsqu'elles sont plus importantes par la règle 1_{3s} .

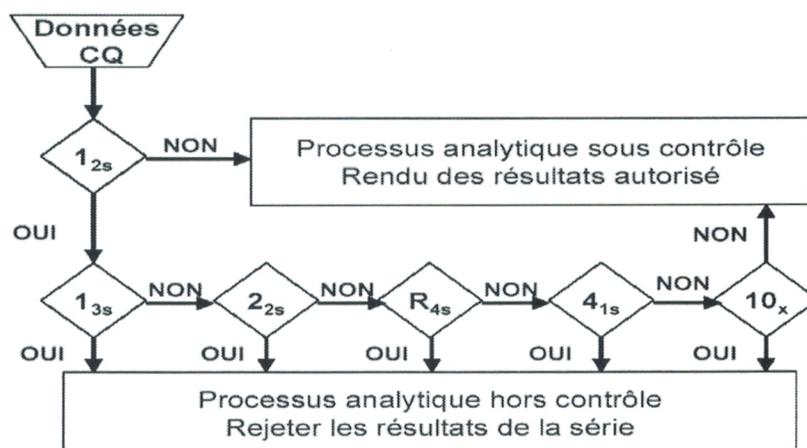


Fig.20: diagramme logique d'application d'une série de contrôle dans le procédé multi-règles de Westgard

2.2. Contrôle de qualité externe :

L'analyse des données du contrôle externe ponctuel réalisé en 2004 et 2008 a révélée que le laboratoire est dans la zone acceptable. Cependant ce type de contrôle fournit des statistiques recueillies lors d'événements uniques pour cela une participation du laboratoire à un programme de comparaison interlaboratoire peut faire améliorer l'évaluation des performances (justesse et fidélité). Ce programme est réalisé en envoyant mensuellement les données recueillies pour chaque contrôle testé. Ces données sont intégrées aux données des autres laboratoires utilisant le même automate.

Le problème qui se pose est que ces contrôles sont devenus payants mais pourquoi pas une participation un contrôle externalisé entre les laboratoires d'Algérie.

CONCLUSION

La mise en place d'un système qualité dans un laboratoire demande du temps (formation, documents, réunion). Un tel processus ne peut se dérouler sans une communication importante aussi bien en interne qu'avec les services cliniques, la raison pour la quelle nous proposons une plaquette d'information intitulée «Recommandations pour un prélèvement de qualité en hémostase » (figure en dessous) pour minimiser les anomalies fréquentes de prélèvement concernant l'identification des tubes, le respect des volumes d'anticoagulant et les heures de prélèvement pour la surveillance des traitements à l'héparine...

Le maintien d'un système qualité efficace repose sur une vigilance permanente : il est souvent plus difficile de faire vivre un système que de le mettre en place, c'est pourquoi les audits de surveillance sont d'excellents outils pour poursuivre une telle démarche. L'application de cette dernière demande la mise en place de tout un système de réglementations normalisées (GBEA et normes ISO) qui n'est pas bien suivi en Algérie.

La qualité ne dépend pas uniquement de l'analyse technique et organisationnelle mais aussi sur l'investissement de l'ensemble du personnel qui est la clef de la pérennité d'une démarche qualité. Afin de faciliter la tâche aux personnels du service d'hémostase nous avons préparé un registre des procédures opératoires des différents paramètres d'hémostase. Trois paramètres (TP, TCA, Fibrinogène) sont présentés en annexe 5 comme exemple.

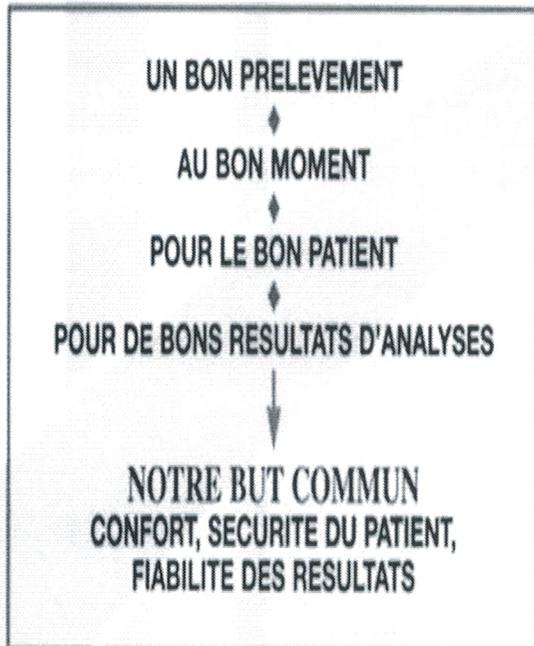
Dans le futur il est possible d'envisager des logiciels de gestion de contrôle de qualité qui pourront générer des fonctionnalités suffisantes pour accumuler un grand nombre de résultats de patient afin de suivre le contrôle qualité, calculer les statistiques appropriés pour estimer les valeurs moyennes nécessaires et assister l'opérateur à interpréter les résultats.

RECOMMANDATIONS POUR UN PRELEVEMENT DE QUALITE EN HEMATOLOGIE

◆ OBJECTIFS :

Vous transmettre des informations précises afin de vous aider à réaliser vos prélèvements sanguins concernant l'hématologie.

Servir de trait d'union entre les services de soins et le laboratoire.



PRELEVEMENTS

PHASE PREANALYTIQUE

Choix du matériel

- Tubes
 - en cas de prélèvements difficiles, penser aux tubes pédiatriques.
 - pour la surveillance des patients sous héparine, tubes CTAD.
- Vérifier les dates de péremption

Prélèvements

- Cf protocole infirmier en vigueur
- Temps de pause du garrot < 5 minutes
- Ordre des tubes en cas de prélèvement multiple :
 - 1) sans additif
 - 2) citrate
 - 3) EDTA
 - 4) autres
- respecter le volume de remplissage
- Homogénéisation par retournements doux 5 à 6 fois

Identification étiquetage au chevet du patient

- Sur feuille de demande :

- 1) Identification du patient : nom, prénom, nom de jeune fille, sexe, date de naissance.
- 2) Identité et qualité du préleveur : date et heure du prélèvement.
- 3) Identité du prescripteur : service, numéro de téléphone, degré d'urgence.
- 4) Examens demandés

- Sur tube :

Identification du patient (voir cf 1 ci-dessus), date, heure du prélèvement, nature de l'échantillon.

Acheminement dans les meilleurs délais

- conseillé dans l'heure qui suit le prélèvement
- éviter les chocs thermiques et les secousses
- ne pas stocker les tubes au réfrigérateur ou au congélateur

PHASE ANALYTIQUE

LABORATOIRE
TECHNIQUE

PHASE POST-ANALYTIQUE

RESULTATS
TRANSMISSION



DES RESULTATS VALIDES ET SIGNES
ARCHIVAGE

SANDRA



REFERENC EC BIBLIOGRAPHIQUES

1- FREYBURGER G., LABROUCHE S., L'automatisation en hémostase, Revue Française des Laboratoires, novembre 1996, N°288, article reçu le 20 décembre, accepté le 11 avril 1996.

2- LIÊN ABECASSIS, CHRISTELLE HAMON, Choix d'un automate d'hémostase, Revue Francophone des Laboratoires, juin 2007, N°393, article reçu le 28 février, accepté le 12 mars 2007.

3- NADIN CLAUDE, PALETTE XAVIER, Cahier de formation, biologie médicale: guide de bonne exécution des analyses - procédures- N° 06 septembre 1996, Bioforma.

4- SCHVED J.-F., SARLAT C., GRIS J.-C., Recommandations pratiques pour la réalisation des tests d'hémostase: du prélèvement au contrôle de qualité, Revue Française des Laboratoires, janvier 1995, N° 272, article reçu le 7 octobre, accepté le 5 décembre 1994.

5- FISCHER F., APPERT A., FERRERO C., MAERFELD K., BAYLE J., Evaluation du STA Compact sur les tests de coagulation de routine en pratique hospitalière, Française des Laboratoires, avril 1997, N° 292, article reçu le 20 septembre, accepté le 24 novembre 1996.

6- GRIS JEAN-CHRISTOPHE, MERCIER ERIC, Les constantes pré-analytiques en hémostase, Revue Française des Laboratoires, novembre 1999, N° 317, article reçu le 20 avril, accepté le 2 juillet 1999.

7- LEBLANC ROSE-MARIE, Le pré-analytique en hémostase et les recommandations du Groupe d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT), 20 avril 2009, N° 417.

8- CLAUDE GIROUD, Introduction à la pratique du contrôle de qualité au LABM, Editions FM BIO, Vanves, 2007.

9- MARION S., Accréditation de l'activité en hémostase: contraintes ou opportunités, Spectra Biologie N° 154, septembre-octobre 2006.

10- MARION SYLVIE, Validation des techniques dans le cadre d'accréditation « les normes d'acceptabilité à l'usage de validation des techniques ».

11- SAMPOL J., ARNOUX D., BOUTIÈRE B., Manuel d'hémostase, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris 1995.

12- VASSAULT A., GRAFMEVER D., COHEN R., BEAUDONNET A., BIENVENU J., Annales de Biologie Clinique: spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques, Vol. 57, Numéro 6, Novembre - Décembre 1999 : 685-95.

13- MIRFENDERESKI ROCHANAK, Mémoire de l'Ecole Nationale de Santé Publique, la démarche qualité dans les laboratoires d'analyse de biologie médicale, septembre 2007.

14- SAMAMA MM., ELALAMY I., CONARD J., ACHKAR A., HORELLOU M.-H., Hémorragies et Thrombose: du diagnostic aux traitements, 2^{ème} édition Elsevier Masson 2009.

15- HILDE DE BOECK, Contrôle de la qualité analytique au labo, août 2009.

16- FEINBERG M., Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude, le cahier des techniques de l'Inra, numéro spécial 2012.

17- GIANNOLI JEAN-MARC, L'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, congrès OPTMQ Rimouski, 18juin 2011.

18- COFRAC, Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale, document LAB GTA 06, révision 00 – Juillet 2005.

19- BIORAD 2009, Leçons de base de contrôle de qualité au laboratoire, cahier de travail de contrôle qualité.

20- MONAGLE P., Haemostasis and pediatrics reference range in children, XXth Congres ISTH, Sydney 6, 12 août 2005.

Annexe 1

Spécifications techniques du
STA Compact[®]

Type	Analyseur multiparamétrique. Travaille patient par patient. Chronométrie, colorimétrie et immunologie.
Normes	Conformes aux normes : -pour STA Compact® 230V : marque GS (IEC1010, EN 55011) et marquage CE(EN 60601 et conformité à la loi allemande EMVG). -pour STA Compact® 115V: UL 3101-1 (Underwriters Laboratory).
Gestion des échantillons	-1 Tiroir de 96 primaires centrifugés : *Diamètre : 11 mm (3ml) (0.43po) *Diamètre : 11.6 à 13.4 mm (5 ml) (0.46 à 0.53 po) *Longueur: 65 à 100 mm (2.56 à 3.94 po) - Liste des tubes recommandés : Tube polypropylène de Sarstedt (5ml) Monovette® de Sarstedt (3 ml et 5 ml) Venoject® II de Terumo® Vacutainer ® Hemogard™ de Becton Dickinson (5ml et 10 ml) -Identification positive -Lecteur codes à barres
Gestion des produits	-45 positions avec des flacons de différentes dimensions -Lecteur codes à barres - Identification Positive -Thermostatisation entre 15°C et 19°C -Gestion de la stabilité et du volume.
Principe des mesures	-Source lumineuse : lampe tungstène-halogène -Modes d analyses : chronométrie, colorimétrie et immunologie -Chronométrie, modification de viscosité du milieu, détection par des capteurs électromagnétiques -Colorimétrie et immunologie, mesure de D.O 405 nm et 540 nm.
Pipeteur	-Basé sur 1 seringue de 250µl
Cuvettes	-Identique pour réaction et mesure -Sous forme de bobines de 1000 cuves avec billes en acier inoxydable, -Autorisant un mouvement pendulaire de la bille (brevet STAGO) -Volume maximum utilisable : 400 µl -Volume minimum : *150 µl chronométrie *250 µl photométrie
N° de brevets	-FR 8718348 -FR 8809151 -US 4918984 -JP 1939942 -EP 0325874

Conditions d'utilisation	-Résistance aux chocs : suivant les normes en vigueur -Température : +15°C à 35°C (59°F à 95° F) -Humidité : 20 à 80% -Altitude : <2000 m Pas de lumière incidente sur les tiroirs ouverts.												
Conditions de stockage	-Température : -20°C à +60°C -Humidité relative : 20 à 80%												
Conditions de transport	-Température : -20°C à +60°C (-4°F à +140°F) -Humidité relative : 20 à 80%												
performance	Répétabilité intra-essai avec des produits Diagnostica Stago : <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">Plasmas normaux</td> <td style="text-align: right;">plasmas pathologiques</td> </tr> <tr> <td>TP (sec)</td> <td style="text-align: center;"><1.5%</td> <td style="text-align: right;"><2%</td> </tr> <tr> <td>TCA (sec)</td> <td style="text-align: center;"><1.5%</td> <td style="text-align: right;"><2%</td> </tr> <tr> <td>Fibrinogène (sec)</td> <td style="text-align: center;"><4%</td> <td style="text-align: right;"><5%</td> </tr> </table>		Plasmas normaux	plasmas pathologiques	TP (sec)	<1.5%	<2%	TCA (sec)	<1.5%	<2%	Fibrinogène (sec)	<4%	<5%
	Plasmas normaux	plasmas pathologiques											
TP (sec)	<1.5%	<2%											
TCA (sec)	<1.5%	<2%											
Fibrinogène (sec)	<4%	<5%											
Contamination inter - échantillons	Moins de 0.05%												
Environnement	Niveau sonore : 70 DbA au maximum Chaleur dégagée : 1400 W électrique au maximum												
Alimentation électrique	-Tension et tolérance : 230V (± 15%) ,210V (± 15%),115V(± 15%),95V(± 15%) -Fréquence et tolérance : 50/60Hz (47à65Hz) -Puissance : 1400VA maximum -Nombre et type de prise de courant : 1 prise 16A -Protection fusibles : oui -Nécessité onduleur pour microcoupure : non -Résultats de coupure franche : tests en cours perdus, possibilité d'altération du disque dur												
Classification	-Type de protection contre les chocs électriques : appareil de classe I. -Degré de protection contre les chocs électrique : appareil de type B -Degré de protection contre la pénétration nuisible d'eau : appareil ordinaire (appareil sous enveloppe sans protection contre de la pénétration d'eau) -Méthode de désinfection recommandée : (voir procédure de décontamination). -Degré de sécurité d'emploi : appareil non adapté à une utilisation en présence d'un mélange anesthésique inflammable avec de l'air, de l'oxygène ou du protoxyde d'azote. -mode de fonctionnement : Service continu												
Informatique	Disque dur : 40M octets minimum ; 8 microprocesseurs plus une unité centrale PC												
Lecteur de code à barres	Marque : Douchette WELCH ALLYN, modèle Scanteam 3700 Series. Principe de fonctionnement : lecture par CCD, éclairage par LED.												
Dimensions	Hauteur sans écran : 640 mm (25.2po) Largeur: 975mm (38.4po) Profondeur : 720mm en haut (28.3po)												

	657mm à la base (25.9po)
Ecran	Type : VGA couleur.
Espace à réserver	Hauteur : 996mm (39.2po) Largeur : 2530mm (99.6po) Profondeur : 1100mm (43.3po)
Clavier	Type : Cherry (AZERTY ou QWERTY) selon les langues (102 touches). Dimensions : 210 x 490mm (8.3 x 19.3 po) Homologué : GS, CSA, UL.
Poids	140 Kg

A

nnexe 2

Réactifs

STA- NEOPLASTINE® CI Détermination du temps de Quick

1/Intérêt du coffret :

Détermination du temps de Quick dans le plasma sur les appareils de la ligne STA acceptant ces réactifs.

2/ Composition :

Chaque coffret de STA®-Néoplastine®CI contient un papillon avec code-barre. Ce code-barre renferme les informations suivantes : numéro de lot, référence du coffret, référence du réactif, date de péremption, paramètres de calibration du réactif, valeur de l'ISI. Ainsi, grâce à ce code-barre, l'utilisation d'un étalon n'est pas nécessaire lors de la détermination du taux de prothrombine (TP) en % sur les instruments de la ligne STA® avec le réactif STA®-Néoplastine®CI.

- **Réactif 1** : STA®-Néoplastine®CI, thromboplastine précalibrée lyophilisée, préparée à partir de tissu cérébral frais de lapin. La STA®-Néoplastine®CI contient un inhibiteur de l'héparine, ceci permet de rapporter un allongement du temps de Quick à un déficit réel en facteurs II, V, VII, X et/ou fibrinogène.

La valeur de l'ISI, déterminée par rapport à un étalon secondaire de la RBT (rabbit brain thromboplastin) sur les appareils de ligne STA®, est indiquée sur le papillon inclus dans le coffret.

- **Réactif 2** : solvant contenant du calcium, flacon de 5ml (REF 00605) ou de 10 ml (REF 00666).

Le réactif 2 contient de l'azide de sodium (< 1g/l) comme conservateur.

Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être éliminés avec précaution. Si ces solutions sont rejetées à l'évier, les mélanger à des grandes quantités d'eau afin d'éviter la formation d'azides métalliques qui, s'ils sont concentrés, peuvent provoquer des explosions.

Certains réactifs de ces coffrets contiennent des produits d'origine humaine et/ou animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HIV1 et anti-HIV2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

3/ Précautions :

- Les coffrets intacts doivent être conservés à 2-8°C. ces réactifs sont destinés exclusivement à un usage in vitro et doivent être manipulés par des personnes habilitées. L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.

Les coffrets STA[®]-Néoplastine[®]Cl sont particulièrement dédiés aux appareils de la ligne STA[®] acceptant ces réactifs. Avant toute utilisation, lire attentivement le "Manuel de référence" de l'instrument utilisé.

- Les barreaux aimantés utilisés pour l'homogénéisation du réactif ne doivent pas être à l'origine de contamination. Pour éviter cela, avant toute transfert du barreau dans un nouveau flacon, rincer le barreau à l'eau distillée et l'essuyer afin d'enlever toute trace d'humidité. De plus chaque semaine, effectuer une décontamination du barreau en procédant de la façon suivante :

- Mettre le barreau sous agitation dans un flacon de STA[®]-Desorb U (REF 00975) pendant 5 minutes

- Le transférer dans un flacon d'eau distillée et laisser sous agitation 5 minutes

- Renouveler cette dernière opération avec un nouveau flacon d'eau distillée

- Essuyer le barreau pour enlever toute trace d'humidité.

4/ Préparation et conservation du réactif :

• Préparation :

Transvaser le contenu d'un flacon de Réactif 2 (R2) dans un flacon de Réactif 1 (R1) inclus dans le même coffret. Laisser la solution se stabiliser pendant 30 minutes à température ambiante (18-25°C).

Ensuite, agiter doucement pour obtenir une suspension homogène. Mettre un barreau aimanté (REF 27425), un STA[®]-Reducer neuf (STA[®]-Néoplastine[®]Cl 5) ou (STA[®]-Néoplastine[®]Cl 10), puis la capsule plastique operculée.

• Conservation :

Conservés à 2-8°C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Après reconstitution, le Réactif 1 est stable :

- Avec barreau aimanté, STA[®]-Reducer et capsule plastique operculée :

- ✓ 48 heures sur STA[®], STA Compact[®] et STA-R[®]

- ✓ 4 jours sur STA Satellite[®]

- Dans son flacon d'origine bouché (enlever le STA[®]-Reducer) : 8 jours à 2-8°C.

Ne pas congeler.

NB : Compte tenu des nombreuses combinaisons possibles en cas de conservation alternée (à bord des instruments et à 2-8°C), le laboratoire doit établir ses propres durée d'utilisation en fonction de ses pratiques. Ces durées ne peuvent dépasser celles mentionnées ci-dessus déterminées dans des conditions contrôlées.

En cas de conservation à 2-8°C, laisser le réactif à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes avant utilisation.

5/ Etalonnage :

La précalibration est identique pour tous les réactifs d'un même lot. Lors de la première utilisation de la précalibration, il est recommandé de vérifier, uniquement sur le premier lot, si les conditions locales (par exemple celles du prélèvement) sont telles qu'il existe une identité de résultats entre ceux obtenus en utilisant la précalibration et ceux trouvés à partir d'un étalonnage réalisé dans des conditions semblables à celle du dosage.

Pour entrer les coordonnées de l'étalonnage dans l'instrument, on fait passer le code-barre imprimé sur le papillon devant le lecteur code-barre de l'appareil. La calibration sera validée pour tout le lot après la détermination du TP de deux contrôles.

6/ Limites de la méthode :

•Prélèvement :

Une amorce minime de la coagulation (micro-caillots) entraîne un raccourcissement important des temps mesurés (activation auto catalytique de l'ensemble des facteurs), alors qu'une coagulation plus poussée les allonge (consommation des facteurs et du fibrinogène).

Ne pas conserver le plasma à 2-8°C, car le facteur VII est susceptible de s'activer à cette température (système des Kallicréine).

•Anticoagulant :

Respecter le rapport entre le volume de l'anticoagulant et celui du sang prélevé. En cas de variation importante de l'hématocrite, modifier la quantité d'anticoagulant en fonction de celui-ci.

•Héparines :

Il a été montré que la présence de l'héparine non fractionnée ou d'héparines de bas poids moléculaire n'interférait pas dans le test jusqu'à des concentrations respectives de 1 UI/ml et 1,5 UI anti-Xa/ml.

• Inhibiteurs de la thrombine :

Les inhibiteurs de la thrombine (ex. hirudine, argatroban...) présents dans l'échantillon à tester sont susceptibles d'entraîner un allongement du temps de Quick de cet échantillon.

STA – C.K.PREST® 5
Détermination du temps de céphaline + activateur (TCA)

1/INTERET DU COFFRET :

Détermination du temps de céphaline-kaolin(TCK).sur les appareils de la ligne STA® acceptant ces réactifs.

2/COMPOSITION :

Chaque coffret de STA®-C.K.Prest® contient un papillon avec code-barre. Ce code-barre renferme les informations suivantes : numéro de lot, référence du coffret, référence du réactif, date de péremption.

- ◆ Réactif 1 : céphaline (substitut plaquettaire) préparée selon Bell et Alton à partir de tissu cérébral de lapin, lyophilisée.
- ◆ Réactif 2 : flacon de 5ml, suspension tamponnée de kaolin à 5mg /ml.

Le Réactif 2 contient de l'azide de sodium (<1g/l) comme conservateur.

Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être éliminés avec précaution. Si ces solutions sont rejetées à l'évier, les mélanger à de grandes quantités d'eau afin d'éviter la formation d'azides métalliques qui, s'ils sont concentrés, peuvent provoquer des explosions.

Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et/ou animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

3/PRECAUTIONS :

- Le coffret intact doit être conservé à 2-8°C. Ces réactifs sont destinés exclusivement à un usage in vitro et doivent être manipulés par des personnes habilitées par le laboratoire

.L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur. Le coffret STA®-C.K Prest® est particulièrement dédié aux appareils de la ligne STA® acceptant ces réactifs .Avant toute utilisation, lire attentivement le «Manuel de référence » de l'instrument utilisé.

- Les barreaux aimantés utilisés pour l'homogénéisation du réactif ne doivent pas être à l'origine de contamination. Pour éviter cela, avant tout transfert du barreau dans un nouveau flacon, rincer le barreau à l'eau distillée et l'essuyer afin d'enlever toute trace d'humidité .De plus chaque semaine, effectuer une décontamination du barreau en procédant de la façon suivante :

- Mettre le barreau sous agitation dans un flacon de STA® -Desorb U pendant 5minutes.
- Le transférer dans un flacon d'eau distillée et laisser sous agitation 5minutes.
- Renouveler cette dernière opération avec nouveau flacon d'eau distillée.
- Essuyer le barreau pour enlever toute trace d'humidité.

4/PREPARATION ET CONSERVATION DU REACTIF :

- **Préparation**

Transvaser, après agitation , le contenu d'un flacon de Réactif 2 (R2) dans un flacon de Réactif 1 inclus dans le même coffret .Laisser la solution se stabiliser pendant 30 minutes à température ambiante (18-25 °C) .Ensuite , agiter doucement le flacon pour obtenir une suspension homogène .Mettre un barreau aimanté, puis la capsule plastique operculée. Placer le réactif dans l'instrument et après 20 minutes supplémentaires de stabilisation/agitation, le réactif est prêt à l'emploi.

- **Conservation**

Conservés à 2-8°C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquées sur le coffret.

Après reconstitution, le réactif est stable :

-Avec barreau aimanté (agitation intermittente) et capsule plastique operculée :

✓ 24 heures sur STA-R®

✓ 48 heures sur STA Compact®

-Dans son flacon d'origine bouché : 7 jours à 2-8 °C.

Ne pas congeler.

NB : Compte tenu des nombreuses combinaisons possibles en cas de conservation alternée (à bord des instruments et à 2-8 °C), le laboratoire doit établir ses propres durées d'utilisation en fonction de ses pratiques.

Ces durées ne peuvent dépasser celles mentionnées ci-dessus déterminées dans des conditions contrôlées.

En cas de conservation à 2-8 °C, laisser le réactif à température ambiante (18-25 °C) pendant 30 minutes avant utilisation.

5/LIMITES DE LA METHODE :

- Le STA[®]-C.K Prest[®] est généralement insensible aux déficits en prékallicroïne .Il est reporté dans la littérature que'' les patients déficitaires homozygotes(en prékallicroïne) n'ont aucune manifestation hémorragique particulière''.
- Lors de la surveillance des traitements par l'héparine, la libération de facteur 4 plaquettaire, inhibiteur potentiel de l'héparine, représente une des principales causes d'erreurs, aussi :
 - Prélever le sang sur tube plastique, verre siliconé ou tube CTAD
 - Effectuer la centrifugation dans un délai d'1 heure pour les prélèvements effectués sur citrate et de 4 heures pour les prélèvements réalisés sur CTAD.

STA-CaCl ₂ 0.025 M Solution de CaCl ₂ 0,025 M pour les tests de coagulation
--

1/ Intérêt du coffret :

Le réactif STA[®]-CaCl₂ 0.025 M est utilisé pour les tests de coagulation tels que le temps de céphaline + activateur (TCA) ou le dosage des facteurs de la voie endogène.

2/ Composition :

STA[®]-CaCl₂ 0.025 M : solution de CaCl₂ 0,025M.

Ce réactif contient de l'azide de sodium (<1g/l) comme conservateur.

Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être éliminés avec précaution. Si ces solutions sont rejetées à l'évier, les mélanger à de grandes quantités d'eau afin d'éviter la formation d'azides métalliques qui, s'ils sont concentrés, peuvent provoquer des explosions.

3/ Précautions :

Le coffret intact doit être conservé à 2-25°C. Ce réactif est destinés exclusivement à un usage *in vitro* et doit être manipulé par des personnes habilitées par le laboratoire .L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.

Lorsque le STA[®]-CaCl₂ 0.025M est utilisé sur les appareils de la ligne STA[®], lire attentivement avant emploi le «Manuel de référence » de l'instrument utilisé.

4/Préparation du réactif :

Si le flacon est conservé à 2-8°C, le laisser 30 minutes à température ambiante (18-25°C) avant emploi.

Lorsque ce réactif est utilisé sur les appareils de ligne STA[®], ne pas mettre de STA[®] - Reducer ni de capsule operculée.

5/Stabilité et conservation du réactif :

Conservé à 2-25°C sous son état d'origine, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Après ouverture, le réactif est stable :

- 24 heures à 37°C
- 3 jours sur STA Compact[®] et STA-R[®]
- 6 jours sur STA Satellite[®]

En cas d'utilisation fractionnée, la solution restante de STA[®]-CaCl₂ 0.025M maintenue à 2-8°C dans son flacon d'origine bouché, est stable, sinon contaminée, jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

6/ Mode d'emploi :

- En méthode semi-automatique, se reporter aux notices correspondant aux tests à réaliser.
- Sur les appareils de la ligne STA[®], après ouverture du flacon, le charger dans l'instrument comme indiqué dans le "Manuel de référence" de l'appareil utilisé. Le positionnement du flacon sera réalisé de la façon suivante :
 - Sur STA Compact[®], placer le flacon dans le tiroir produits
 - Sur STA-R[®], placer le flacon dans la zone R2 du tiroir produits
 - Sur STA Satellite[®], placer le flacon dans le carrousel produits.

L'instrument utilisera automatiquement le STA[®]-CaCl₂ 0.025M

Fibri-Prest Automate

Détermination quantitative du fibrinogène

1/Intérêt du coffret:

Dosage du fibrinogène plasmatique selon la méthode de Clauss

2/Composition :

Fibri-prest® Automate : thrombine calcique titrée (env. .80unités NIH /ml) . Lyophilisée, d'origine humaine contenant un inhibiteur spécifique de l'héparine permettant le dosage du fibrinogène sur le plasma des patients traités par cet anticoagulant.

Ce réactif contient des produits d'origine humaine et /ou animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ce réactif.la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti HIV1 et anti HIV2 a été effectuée et trouvée négative .cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi ce réactif d'origine biologique doit être manipulé avec les précautions d'usage s'agissant d'un produit potentiellement infectieux.

3/Précaution :

Les coffrets intacts doivent être conservé a 2-8°C .ces réactifs sont destinés exclusivement a un usage in vitro et doivent être utilisés par des personnes habilitées .l'élimination des déchets sera effectuée conformément a la réglementation locale en vigueur .manipuler avec les précautions d'usage les réactifs et les échantillons a tester.

4/Préparation et conservation du réactif :

• Préparation :

Reconstituer le réactif fibro-prest Automate comme indiqué ci-dessous :

-chaque flacon de **fibro-prest® Automate 2** par 2ml d'eau distillée.

- chaque flacon de **fibro-prest ®Automate 5** par 5ml d'eau distillée.

Après addition de l'eau distillée, laisser la solution se stabiliser 30minute a température ambiante (18-25°C).puis, homogénéisé avant emploi.

• Conservation :

Lyophilisé : à 2-8°C jusqu'à la date de péremption indiquées sur le coffret .

Reconstituer : 7 jours à 20+/-5°C } dans son flacon d'origine ou
en tube plastique
14 jours à 2-8°C } si conservé en aliquotes

En cas de conservation à 2-8°C, laisser le réactif à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes avant l'utilisation.

5/ Etalonnage

L'étalonnage est réalisé dans des tubes en plastique .préparer au minimum 3 dilution de l'Unicalibator en **STA®-Owren-Koller** (dilution au 1/5 et 1/10 et 1/20 ou au 1/10,1/20 et 1/40). Suivre les instructions au fabricant. Par définition, la dilution de l'Unicalibator utilisé pour les plasmas des patients correspondant au taux de fibrinogène indiqué sur le papillon.

6/Limites de la méthode

- Lorsque le dosage de fibrinogène est effectué dans le cadre d'un traitement thrombolytique, le sang doit être prélevé sur un mélange anticoagulant contenant un inhibiteur de la plasmine (par exemple aprotinine).
- Il a été montré que les produits de dégradation de la fibrine, l'hirudine et les héparines (HNF et HBPM) n'interféraient pas dans ce dosage (plasma testé dilué au 1/20) jusqu'à des concentrations respectives de 130µg, et 2 UI/ml.

STA- SYSTEM CONTROL N+P
Plasmas de contrôle pour les tests de coagulation

1/ Intérêt du coffret :

Le coffret est constitué d'un plasma normal et d'un plasma anormal utilisés sur les appareils de la ligne STA® acceptant ces réactifs, pour le contrôle de qualité lors de l'évaluation des paramètres de la coagulation.

Les paramètres ci-dessous sont déterminés sur le Réactif 1(STA®- System Control N)

- taux de prothrombine (TP) ;

- temps de céphaline + activateur (TCA)
- fibrinogène (méthode de Clauss)
- temps de thrombine
- temps de Reptilase
- facteur II
- facteur V
- facteur VII
- facteur VIII
- facteur IX
- facteur X
- facteur XI
- facteur XII
- antithrombine
- protéine C
- protéine S
- plasminogène
- antiplasmine

Les mêmes paramètres excepté les temps de thrombine et de Reptilase sont déterminés sur le réactif 2(STA[®]- System Control P).

Le coffret STA[®]-System Control N + P ne peut pas être utilisé sur STA Satellite[®] pour le contrôle du TCA réalisé avec le STA[®]-PTT A.

Le TP et le TCA sont des tests globaux d'exploration de l'hémostase. Le temps de thrombine et le temps de Reptilase explorent la fibrinoformation. Les facteurs VII, XII, XI, IX, VIII, V, X, II et le fibrinogène sont impliqués dans la coagulation proprement dite. L'antithrombine, la protéine C et la protéine S sont les inhibiteurs physiologiques de la coagulation. Le plasminogène et l'antiplasmine interviennent dans la fibrinolyse.

2/ Composition :

Chaque coffret de STA[®]-System Control N + P renferme deux papillons, un pour chaque réactif, sur lesquels figure un code-barre. Ce code-barre contient les informations suivantes : numéro de lot, référence du coffret, référence du réactif, date de péremption, valeurs du taux des différents paramètres testés déterminées les appareils sur la ligne STA[®].

- **Réactif 1** : STA[®]-System Control N, plasma humain normal citraté lyophilisé.
- **Réactif 2** : STA[®]-System Control P, plasma humain anormal citraté lyophilisé.

Ces réactifs contiennent des produits d'origine humaine et/ou animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

3/Précautions :

Le coffret intact doit être conservé à 2-8°C. Ces réactifs sont destinés exclusivement à un usage *in vitro* et doivent être manipulés par des personnes habilitées par le laboratoire. L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur. Ce coffret est particulièrement dédié aux appareils de la ligne de STA® acceptant ces réactifs. Avant toute utilisation, lire attentivement le Manuel De Référence de l'instrument utilisé. Manipuler avec les précautions d'usage les réactifs et échantillons à tester.

4/Préparation des réactifs :

Pour chacun des Réactifs 1 et 2, ajouter très exactement 1 ml d'eau distillée. Laisser la solution se stabiliser pendant 30 minutes à température ambiante (18-25°C°). Homogénéiser en agitant doucement avant emploi.

5/Stabilité des réactifs :

- **Lyophilisés** : à 2-8°C, jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.
- **Reconstitués** : 8 heures ; pour les dosages de facteur VIII, il est recommandé de limiter l'utilisation de ces contrôles à 4 heures.

6/Mode d'emploi :

Lorsque le Réactif 1 et 2 sont prêts à l'emploi, les charger dans l'appareil comme indiqué dans le Manuel De Référence de l'instrument utilisé. Le positionnement des flacons sera réalisé de la façon suivante :

- sur STA Compact®, placer les flacons en position 1à18 ou 35à38 du tiroir produits
- sur STA-R®, placer les flacons en position R0 du tiroir produits
- sur STA Satellite®, placer les flacons dans le carrousel produits.

Les plasmas STA®-System Control N et P seront utilisés automatiquement par l'instrument.

<p>STA-OWREN-KOLLER Tampon Owren-Koller pour les tests d'hémostase</p>

1/ Intérêt du coffret :

Le réactif **STA[®]-Owren-Koller** est utilisé comme tampon de dilution dans les tests d'hémostase.

2/ Composition :

STA[®]-Owren-Koller : solution tamponnée présentant un pH de 7,35 environ.

Ce réactif contient de l'azide de sodium (<1g/l) comme conservateur.

Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être éliminés avec précaution. Si ces solutions sont rejetées à l'évier, les mélanger à de grandes quantités d'eau afin d'éviter la formation d'azides métalliques qui, s'ils sont concentrés, peuvent provoquer des explosions.

3/ Précautions :

Le coffret intact doit être conservé à 2-8°C. Ce réactif est destiné exclusivement à un usage *in vitro* et doit être manipulé par des personnes habilitée. L'élimination des déchets doit sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.

Lorsque le **STA[®]-OWREN-KOLLER** est utilisé sur les appareils de la ligne **STA[®]** acceptant ce réactif, lire attentivement avant emploi le Manuel De Référence de l'instrument utilisé. Manipuler avec les précautions d'usage les réactifs et les échantillons à tester.

4/préparation du réactif :

Avant utilisation, laisser le réactif 30 minutes à température ambiante (18-25°C). Lorsque ce réactif est utilisé sur les appareils de la ligne **STA[®]**, ne pas mettre de **STA[®]-Reducer** ni de capsule operculée.

5/Stabilité et conservation du réactif :

Conservé à 2-8°C sous son état d'origine, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Après ouverture, le réactif est stable :

- 3 jours sur STA Compact[®] et STA-R[®]
- 6 jours sur STA Satellite[®].

En cas d'utilisation fractionnée, la solution restante de STA[®]-OWREN-KOLLER maintenue à 2-8°C dans son flacon d'origine bouché, est stable, si non contaminée, jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

6/ Mode d'emploi

- En méthode semi-automatique, se reporter aux notices correspondant aux tests à réaliser
- Sur les appareils de la ligne STA, après ouverture du flacon, le charger dans l'instrument comme indiqué dans le Manuel De Référence de l'appareil utilisé. Le flacon sera placé dans le tiroir échantillons.

STA- DESORB U Solution de désorption pour les appareils de la ligne STA [®]

1/ Intérêt du coffret :

Le réactif STA[®]-Desorb U est une solution décontaminante utilisée sur les appareils de ligne STA[®].

2/ Composition :

STA[®]-Desorb U : 15 ml de solution contenant de l'hydroxyde de potassium (KOH < 1%).

Ce réactif contient des produits d'origine humaine et/ou animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ce réactif, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ce réactif d'origine biologique doit être manipulé avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

3/ Précautions :

Le coffret intact doit être conservé à 2-8°C. Ce réactif est destiné exclusivement à un usage *in vitro* et doit être manipulé par des personnes habilitée. L'élimination des déchets doit sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.

Le réactif STA®-Desorb U contient de l'hydroxyde de potassium, composé irritant à la concentration utilisée (<1%).

R36/38 : irritant pour les yeux et la peau.

S26 : en cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S37/39 : porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage.

S45 : en cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

Le STA®-Desorb U non utilisé peut être rejeté dans le bidon nommé "poubelle liquide".

4/préparation du réactif :

Lors de l'utilisation du réactif, mettre un STA®-maxi Reducer neuf et la capsule operculée.

Le réactif est alors prêt à l'emploi.

NB : un fin dépôt blanc peut être observé dans le fond des flacons ; ceci n'a aucune incidence sur les performances du produit.

5/ Stabilité et conservation du réactif :

Conservé à 2-8°C, sous son état d'origine et à l'abri de la lumière, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Après ouverture, le STA®-Desorb U est stable avec STA®-maxi Reducer et capsule operculée.

- 5 jours sur STA Compact® et STA-R®

- 14 jours sur STA Satellite®

.6/ Mode D'emploi :

Lorsque le réactif est prêt à l'emploi, le charger dans l'appareil. Le flacon sera positionné dans le tiroir produits.

A

nnexe 3

CALENDRIER DE
MAINTENANCE
PREVENTIVE

	A EFFECTUER	PROCEDURES	DU MENU MAINTENANCE	REMARQUES
HEBDOMADAIRE				
• Filtres à air	Nettoyage	Aspirer la poussière	Machine hors tension	1 filtre arrière + 1 filtre photométrique*
• Puits de rinçage	Nettoyage	Solution de décontamination (eau de javel à 0,37%)	Entretien/Purge aiguille	
• Aiguilles	Vérification	Mandrins Diamètre aiguille 1<2 et 3	Entretien/Purge aiguille	Décontaminer 30 mn les mandrins (solution de décontamination)
• Tiroirs	Nettoyage	Eau chaude		Utiliser solution de décontamination si tubes ou flacons cassés
• Platine de mesure	Nettoyage	Eau chaude	Rinçage	
• Cellules de mesure*	Nettoyage	Cotons-tiges imbibés d'éthanol à 20%	Rinçage	Utiliser uniquement de l'éthanol à 20%
• Réservoir Peltier	Vérification	Contrôle du niveau de glycol	Machine hors tension	Eteindre la machine pour ajouter le glycol
• Ventouse	Nettoyage	Eau chaude	Entretien/changement de la ventouse	Abandonner la procédure avant la fin de validation du programme
• Sauvegarde	Sauvegarde	Utiliser 2 disquettes 1 pour semaines paires 1 pour semaines impaires	Sauvegarde	Sauvegarde des paramètres système + configuration des tests
MENSUELLE				
• Embout téflon	Remplacer	Enlever la seringue et changer embout téflon + joint	Entretien/changement embout + seringue	Plonger l'embout neuf dans de l'eau distillée avant remontage
TRIMESTRIELLE				
• Filtres à air	Remplacer	Changer les filtres à air (les jeter)	Machine hors tension	1 filtre arrière + 1 filtre photométrique*

A

nnexe 4

Les modes de calibration

Les calibrations peuvent être effectuées suivant 7 modes différents :

MODE	CALIBRER
Codes à barre Attention : réservé à certains tests de Diagnostica Stago.	Lancer obligatoirement les 2 contrôles de calibration. La lecture des paramètres de calibration se fait lors du chargement des réactifs.
Brut	Lancer les 2 contrôles de calibration si ceux-ci ont été définis dans les écrans CONFIGURATION DE TESTS
Ratio	-Entrer la valeur du temps témoin, -Lancer les 2 contrôles de calibrations si ceux-ci ont été définis dans les écrans CONFIGURATION DE TESTS .
Graphique linéaire Graphique Polynôme ordre 2 Graphique Polynôme ordre 3 Graphique hyperbolique	-Lancer les étalons, -Lancer les 2 contrôles de calibration si ceux-ci ont été définis dans les écrans CONFIGURATION DE TESTS .

Annexe 5

PROCEDURES
OPERATOIRES

MODE OPERATOIRE DE CONDUITE D'UNE ANALYSE SUR STA COMPACT:

TEMPS DE QUICK

Rédigé le

Nom : Fonction : Techn. laboratoire

Validé le Nom : K ALLAL TAOULI Fonction : MCA

- Fréquence de l'analyse: *Réalisée EN routine*

- Examen réalisé en période de garde.

1. INTERET CLINIQUE

◆ Étude globale de l'activité des facteurs de la coagulation II, V, VII et X ainsi que le fibrinogène.

◆ Un allongement du temps de Quick a été observé en cas de :

-Déficits congénitaux ou acquis en facteurs II, V, VII, X ou fibrinogène.

-Insuffisance hépatique (cirrhose, hépatite)

-Administration d'antivitamines K (AVK)

-Hypovitaminose K

-Fibrinolyse

-Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

◆ Une surveillance biologique d'un traitement anticoagulant par les AVK.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

C'est la mesure du temps de coagulation d'un plasma citraté après recalcification en présence de thromboplastine tissulaire (facteur tissulaire).

3. VALEURS DE REFERENCE

• TQ : 12 – 14 secondes.

• TP : 70 -100%, des taux supérieur à 100% n'ont pas de signification particulière.

4. LISTE DES REACTIFS

STA[®]- NEOPLASTINE[®] CI

STA[®]- NEOPLASTINE[®] CI PLUS

STA[®]- System Control N + P ou STA[®]- Coag Control N + P.

STA[®]-Unicalibrator.

5. LISTE DES CONSOMMABLES

Se référer aux procédures générales sur STA Compact.

6. RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS:

Traitement des échantillons:

* Prélèvement du sang veineux sur tube de citrate trisodique 0,109 M : 1 vol. de citrate pour 9 vol. de sang.

* Centrifugation: 15 minutes à 2000-2500g.

* Décantation: aliquoter 0,5 ou 1ml de plasma citraté en prenant soin de laisser une épaisseur de plasma au-dessus de la couche cellulaire en évitant aussi de prélever à la surface où surnagent habituellement les particules lipidiques.

*Conservation du plasma: 8 heures à 20±5°C.

Ne pas conserver à 2-8°C.

*Congélation: congeler cet aliquote dès qu'il est prêt à -20°C.

*Décongélation : Il est recommandé de faire une décongélation rapide au bain-marie à 37°C (ne jamais décongeler à température ambiante).

Liste: feuille de paillasse STA Compact

feuille de travail ou sont inscrits les demandes

7. CONTROLES DE QUALITE INTERNE (CQI)

→ Les résultats du contrôle du jour sont affichés avec divers codes de couleur :

- o (bleu) : résultat compris dans la plage d'acceptation du contrôle de qualité,
- o (rouge) : résultat en dehors de la plage d'acceptation du contrôle de qualité,
- Δ (rouge) : résultat hors échelle.

Apparition d'un message « contrôle de qualité hors normes » pour les deux derniers cas.

Résultats des patients affichés en rouge clair et accompagnés du message « contrôle de qualité : hors normes ou non fait »

→ Conduite à tenir en cas de valeurs hors bornes:

- 1) Relancer le test,
- 2) En cas d'échec: reconstituer un nouvel aliquot de contrôle,
- 3) En cas d'échec: reconstituer de nouveaux réactifs et retester,
- 4) En cas de nouvel échec, voir avec un biologiste.

8. DEROULEMENT DE L'ANALYSE

Dénomination du test : TP

Position du réactif sur le rack : STA[®]- NEOPLASTINE[®] CI

STA[®]- NEOPLASTINE[®] CI PLUS

9. DOCUMENTATION RELATIVE A L'ANALYSE

- Documentation fournie avec le réactif
- Consulter aussi le classeur technique..... (Situé sur paillasse)

10. VALIDATION ANALYTIQUE

1) Vérifier l'exactitude des valeurs obtenues pour le pool laboratoire

Se reporter au paragraphe des CQI

2) Caractéristiques de la technique :

- Limite de détection:

°STA[®]- NEOPLASTINE[®]CI - temps max: 60s - temps min: 10s

° STA[®]- NEOPLASTINE[®] CI PLUS - temps max: 120s - temps min: 10s

- Interférences connues :

- Variation importante d'hématocrite
- Présence des inhibiteurs de la thrombine dans le plasma

- Prélèvement hémolysé

3) Conduite à tenir devant des résultats anormaux :

* Temps anormalement bas:

- Relancer le test après avoir vérifié l'absence de bulle dans le tube.

11. RESULTATS

- ◆ Secondes par rapport à un témoin : temps de Quick (TQ).
- ◆ Pourcentage d'activité : taux de prothrombine (TP) (conversion par la courbe de Thyvolle).
- ◆ INR (International Normalized Ratio) permettant une standardisation du suivi des patients traités par les AVK exclusivement.

12. SAISIE DES RESULTAT

Se fait automatiquement sue STA-Compact

13. ARCHIVAGE

Se fait à 3 niveaux :

- ❖ Automatiquement sur STA-Compact
- ❖ Registre bilan de routine
- ❖ Secrétariat du service

4. LISTE DES REACTIFS

- STA[®]-C.K.PREST[®] ou STA[®]-PTT A
- STA[®]-CaCl₂ 0,025M
- STA[®]-Coag Control N+P ou STA[®]- system Control N+P.

5. LISTE DES CONSOMMABLES

Se référer aux procédures générales sur STA Compact.

6. RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS:

Traitement des échantillons:

* prélèvement du sang veineux sur tube citaté 0,109 M :1 vol.de citrate pour 9vol.de sang. Lors de la surveillance des traitements par l'héparine, il est préférable d'employer des tubes CTAD qui permettent d'inhiber la libération plaquettaire *in vitro*.

*centrifugation : 15 minutes à 2000-2500 g

* décantation: aliquoter 0,5 ou 1ml de plasma citaté en prenant soin de laisser une épaisseur de plasma au-dessus de la couche cellulaire en évitant aussi de prélever à la surface où surnagent habituellement les particules lipidiques.

* conservation : 4 heures à 20±5°C

Plasmas héparinés : 2heures à 20±5°C (prélèvement sur citrate)

4heures à 20±5°C (prélèvement sur CTAD).

*congélation: congeler cet aliquote dès qu'il est prêt à -20°C.

*décongélation : Il est recommandé de faire une décongélation rapide au bain-marie à 37°C (ne jamais décongeler à température ambiante).

Liste: feuille de paillasse STA Compact

feuille de travail ou sont inscrits les demandes

7. CONTROLES DE QUALITE INTERNE (CQI)

→Les résultats du contrôle du jour sont affichés avec divers codes de couleur :

- o (bleu) : résultat compris dans la plage d'acceptation du contrôle de qualité,
- o (rouge) : résultat en dehors de la plage d'acceptation du contrôle de qualité,
- Δ (rouge) : résultat hors échelle.

Apparition d'un message « contrôle de qualité hors normes » pour les deux derniers cas.

Résultats des patients affichés en rouge clair et accompagnés du message « contrôle de qualité : hors normes ou non fait »

→ Conduite à tenir en cas de valeurs hors bornes:

- 1) Relancer le test,
- 2) En cas d'échec: reconstituer un nouvel aliquot de contrôle,
- 3) En cas d'échec: reconstituer de nouveaux réactifs et retester,
- 4) En cas de nouvel échec, voir avec un biologiste.

8. DEROULEMENT DE L'ANALYSE

Dénomination du test : TCA

Position du réactif sur le rack : STA[®]-C.K.PREST[®]

STA[®]-PTT A

9. DOCUMENTATION RELATIVE A L'ANALYSE

- Documentation fournie avec le réactif
- Consulter aussi le classeur technique..... (Situé sur paillasse)

10. VALIDATION ANALYTIQUE

- 1) Vérifier l'exactitude des valeurs obtenues pour le pool laboratoire

Se reporter au paragraphe des CQI

- 2) Caractéristiques de la technique :

- Limite de détection:

- STA[®]-C.K.PREST[®] - temps max : 140sec - temps min : 20 sec
- STA[®]-PTT A - temps max : 180 sec - temps min : 20 sec

- Interférences connues :

- Lors de la surveillance des traitements par l'héparine, la libération de facteur 4 plaquettaire, inhibiteur potentiel de l'héparine, représente une des principales causes d'erreurs.

3) Conduite à tenir devant des résultats anormaux :

* Temps anormalement bas:

- Relancer le test après avoir vérifié l'absence de bulle dans le tube.

11. RESULTATS

- ◆ En secondes par rapport à un témoin (30 à 40 sec).
- ◆ Pour une meilleure interprétation du TCA, on calcule le rapport TCA malade/ TCA témoin qui doit être inférieur à 1,2.

12. SAISIE DES RESULTAT

Se fait automatiquement sue STA-Compact

13. ARCHIVAGE

Se fait à 3 niveaux :

- ❖ Automatiquement sur STA-Compact
- ❖ Registre bilan de routine
- ❖ Secrétariat du service

5. LISTE DES CONSOMMABLES

Se référer aux procédures générales sur STA Compact.

6. RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS:

Traitement des échantillons:

* prélèvement du sang veineux sur tube de citrate trisodique 0,109 M : 1 vol. de citrate pour 9 vol. de sang.

* centrifugation 2500 tours/min pendant 10 min

*conservation du plasma : 8 heures à $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Liste: feuille de paillasse STA2

feuille de travail ou sont inscrits les demandes

7. CONTROLES DE QUALITE INTERNE (CQI)

→ Les résultats du contrôle du jour sont affichés avec divers codes de couleur :

- o (bleu) : résultat compris dans la plage d'acceptation du contrôle de qualité,
- o (rouge) : résultat en dehors de la plage d'acceptation du contrôle de qualité,
- Δ (rouge) : résultat hors échelle.

Apparition d'un message « contrôle de qualité hors normes » pour les deux derniers cas.

Résultats des patients affichés en rouge clair et accompagnés du message « contrôle de qualité : hors normes ou non fait »

→ Conduite à tenir en cas de valeurs hors bornes:

- 1) Relancer le test,
- 2) En cas d'échec: reconstituer un nouvel aliquot de contrôle,
- 3) En cas d'échec: reconstituer de nouveaux réactifs et retester,
- 4) En cas de nouvel échec, voir avec un biologiste.

8. DEROULEMENT DE L'ANALYSE

Dénomination du test : FIB

RÉSUMÉ

L'hémostase est l'ensemble de mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux, arrêt des hémorragies. L'étude de l'hémostase a été pendant longtemps réalisée au bain marie à 37°C en se basant sur la détection visuelle du caillot de fibrine. Les améliorations permettent l'apparition de nouveaux appareils semi-automatiques puis entièrement automatisés, cependant cette évolution était longue pour des raisons techniques et économiques.

Le service d'hémobiologie, unité hémostase, CHU Tlemcen se dispose de deux automates: le Start qui est un semi-automate et le STA Compact système entièrement automatisé sur lequel est concentré notre travail.

Ces automates doivent subir des maintenances régulières, ainsi, leurs résultats doivent être contrôlés et à chaque nouveau lot doivent être calibrés, ce qui assure une meilleure démarche des analyses raison pour laquelle on se pose la question: est ce que le service d'hémobiologie au niveau de CHU de Tlemcen, l'unité d'hémostase, répond aux normes qualité? Autrement dit on doit s'assurer du bon fonctionnement des automates disponibles en faisant la qualité interne et externe, recherchant des référentiels et répondant aux besoins des patients.

En pratique, l'atteinte de ces objectifs se fait en se basant sur la création du diagramme de Levey-Jennings (à l'aide de la moyenne et l'écart-type de 22 contrôles journaliers analysés par le STA Compact) et l'analyse des résultats de contrôle de qualité externe (réalisé en 2004 et 2008). L'interprétation des résultats obtenus confirme que le laboratoire d'hémobiologie CHU Tlemcen se situe en zone acceptable. Cependant la qualité ne dépend pas uniquement de l'analyse technique et organisationnelle mais aussi sur l'investissement de l'ensemble du personnel qui est la clef de la pérennité d'une démarche qualité. L'envisagement dans le futur des logiciels de gestion de contrôle de qualité améliore les performances des laboratoires.

Mots clé : automate- hémostase-évaluation-contrôle- qualité.

ABSTRACT

Hemostasis is the set of mechanisms that contribute to keep blood in the fluid inside the vessels, stop bleeding state. The study of hemostasis long been performed in a water bath at 37 ° C based on the visual detection of the fibrin clot. The improvements allow the emergence of new semi-automatic machines and fully automated, however this trend was long for technical and economic reasons.

The hemobiology service hemostasis unit, UHC Tlemcen has two automats: the Start which is a semiautomatic and STA Compact fully automated system that focused our work.

These automats require regular maintenance, thus, their results must be controlled and each new batch must be calibrated, this approach provides better analysis why we ask the question: is that the hemobiology service hemostasis unit, UHC Tlemcen, meets the quality standards? In other words we need to ensure the proper functioning of machines available by internal and external quality, looking for references and meet the needs of patients.

In practice, achieving these objectives is based on the creation of Levey-Jennings (using the mean and standard deviation of 22 daily checks analyzed by the STA Compact) and analysis of the results of external quality control (conducted in 2004 and 2008). The interpretation of the results confirms that the laboratory hemobiology CHU Tlemcen is in acceptable area. However, the quality depends not only on the technical and organizational analysis but also on the investment of all staff which is the key to the sustainability of a quality approach. The envisioning in the future of logiciels management quality control improves the performance of laboratories.

Key-words: automation-haemostasis-evaluation-quality.