



HAL
open science

Intérêt de la cytologie automatisée dans la prise en charge des liquides d'épanchement et du liquide céphalo-rachidien en bactériologie

Chloé Rosant-Legendre

► **To cite this version:**

Chloé Rosant-Legendre. Intérêt de la cytologie automatisée dans la prise en charge des liquides d'épanchement et du liquide céphalo-rachidien en bactériologie. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03164975

HAL Id: dumas-03164975

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03164975v1>

Submitted on 10 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

U.F.R de Pharmacie d'Amiens

Année 2020

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenue publiquement le Jeudi 15 octobre 2020

Par ROSANT-LEGENDRE Chloé

Née le 17 août 1994 à Amiens (80)

Intérêt de la cytologie automatisée dans la prise en charge des liquides d'épanchement et du liquide céphalo-rachidien en bactériologie.

Président du jury : Madame le Professeur Catherine Mullié-Demailly

Membres du jury :

Madame le Professeur Nadine Lemaître

Madame le Docteur Morgane Choquet

Directrice de thèse : Madame le Docteur Emilie Legrand-Pluquet

REMERCIEMENTS

À mon président du jury,

Madame le Professeur Catherine Mullié-Demailly

Professeur des Universités – Praticien hospitalier attaché

Service du laboratoire d'hygiène, CHU d'Amiens

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, merci pour votre confiance.

Veillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.

À mes juges,

Madame le Professeur Nadine Lemaître

Professeur des Universités – Praticien hospitalier

Chef de Service du laboratoire de bactériologie, CHU d'Amiens

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci pour votre confiance, vos conseils et votre enseignement.

Madame de Docteur Morgane Choquet

Assistant hospitalo-universitaire

Service du laboratoire de bactériologie, CHU d'Amiens

Tu me fais l'honneur de juger ce travail. Merci pour ta bonne humeur et ton enseignement tout au long de mon internat.

À ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Emilie Legrand-Pluquet

Praticien hospitalier

Service du laboratoire de bactériologie, CHU d'Amiens

Merci pour m'avoir guidé tout au long de ce travail et durant tout mon internat. C'était un plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta confiance et ton enseignement.

À ma maman, tu as fait de moi celle que je suis aujourd'hui. Merci pour ton éducation, ton entier dévouement pour moi et ton soutien indéfectible. Ma vie a toujours été remplie de ton amour et cela a toujours fait le plus grand de mon bonheur. Mon amour pour toi dépasse ce que les mots peuvent exprimer.

À mon papa, avec tout mon amour. Tu aurais été fier de me voir ici aujourd'hui. J'espère que tu me regardes avec tes magnifiques yeux verts remplis d'amour et de tendresse.

À ma grand-mère, coco, avec mon amour pour toujours. Modèle de modernité et de féminisme, tu as toujours su me transmettre les bonnes valeurs à travers ton amour et ton éducation. Merci pour ton soutien, merci pour tout ce que tu as toujours fait (et que tu fais toujours) pour moi.

À Maxime, tu remplis ma vie d'amour et de bonheur. Merci pour ton indéniable soutien. Merci de me supporter au quotidien et d'être l'homme que tu es.

À mon Papy, Alain, Eric, François, Marie-Claude et Christel. Merci pour votre amour et votre soutien depuis toujours.

À Annie et Jules, à mes tantes et oncles, à mes cousins et cousines,

À ma belle-famille,

À mes ami(e)s, Elsa, Marie, Julien, Tety bright, Mehdou, Cécilou, Floflo et juju,

À toute l'équipe de bactériologie du CHU d'Amiens,

À tous les biologistes et les techniciens des différents laboratoires du CHU d'Amiens,

À toute l'équipe de BIOAMIENS pour leur formation et leur bonne humeur,

TABLE DES MATIERES

I. LISTE DES ABBREVIATIONS	1
II. INTRODUCTION	2
A. LES LIQUIDES BIOLOGIQUES EN BACTERIOLOGIE MEDICALE	2
1. <i>Liquides d'épanchement</i>	3
2. <i>Le liquide céphalo-rachidien</i>	10
3. <i>Prise en charge des liquides biologiques</i>	11
B. TECHNIQUES DE REFERENCES	13
1. <i>Analyse cytologique quantitative</i>	13
2. <i>Analyse cytologique qualitative</i>	13
3. <i>Examen direct bactériologique</i>	14
C. TECHNIQUES AUTOMATISEES	15
D. L'UF4000 : SA TECHNOLOGIE, SON PRINCIPE, SON FONCTIONNEMENT.....	16
1. <i>Caractéristiques de l'appareil</i>	16
2. <i>Technologie et principe de fonctionnement</i>	16
E. NORMES ET EXIGENCES POUR LA QUALITE EN BACTERIOLOGIE MEDICALE	17
F. OBJECTIFS ET BUTS.....	18
III. MATERIELS ET METHODES	19
A. PRE-REQUIS : MODALITES DE VERIFICATION	19
B. FIDELITE.....	22
1. <i>Répétabilité</i>	22
2. <i>Reproductibilité / Fidélité intermédiaire</i>	23
C. ETENDUE DE MESURE.....	24
1. <i>Limite de détection (LD)</i>	24
2. <i>Limite de quantification (LQ)</i>	25
3. <i>Linéarité</i>	25
D. CONTAMINATION	26
1. <i>Contamination cellulaire</i>	26
2. <i>Contamination microbienne</i>	27
E. LES INCERTITUDES / LES FACTEURS DE VARIABILITE ET LEUR EVALUATION	28
F. COMPARAISON DE METHODE.....	29
1. <i>Modèles statistiques : Comparaison leucocytes/hématies et formule leucocytaire</i>	30
2. <i>Comparaison du décompte leucocytes/hématies (H/L)</i>	31
3. <i>Comparaison de la formule leucocytaire</i>	33
4. <i>Comparaison des bactéries</i>	34
IV. RESULTATS	36
A. FIDELITE	36
1. <i>Répétabilité</i>	36
2. <i>Reproductibilité / Fidélité intermédiaire</i>	39
B. ETENDUE DE MESURE.....	39
1. <i>Limite de détection (LD)</i>	39
2. <i>Limite de quantification (LQ)</i>	39
3. <i>Linéarité</i>	40
4. <i>Conclusion sur l'étendue de mesure</i>	42
C. CONTAMINATION.....	42
1. <i>Contamination cellulaire</i>	42
2. <i>Contamination microbienne</i>	43
D. EVALUATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE.....	44
<i>Cas des leucocytes</i>	45
E. COMPARAISON DE METHODE	45
1. <i>Comparaison leucocytes/hématies</i>	45
2. <i>Comparaison %PN / %MN de la formule leucocytaire</i>	50
3. <i>Comparaison des bactéries</i>	57

V. DISCUSSION	68
A. VERIFICATION DE LA METHODE IN SITU.....	68
1. Fidélité.....	68
2. Etendue de mesure.....	69
3. Contamination.....	70
B. COMPARAISON DE METHODE.....	72
1. LCR.....	73
2. Liquide articulaire.....	78
3. Autres liquides.....	81
4. Conclusion de la comparaison de méthode.....	85
C. PERSPECTIVES D'UTILISATION EN ROUTINE.....	86
VI. CONCLUSION	88
VII. BIBLIOGRAPHIE	89
VIII. ANNEXES.....	92
<i>Annexe 1 : Proposition de tableau récapitulatif pour le liquide articulaire</i>	<i>92</i>
<i>Annexe 2 : Proposition de tableau récapitulatif pour le liquide pleural.....</i>	<i>92</i>
<i>Annexe 3 : Proposition de tableau récapitulatif pour le liquide d'ascite.....</i>	<i>92</i>
<i>Annexe 4 : Proposition de tableau récapitulatif pour le LCR.....</i>	<i>93</i>
<i>Annexe 5 : Extrait de la procédure applicable pour la prise en charge des liquides biologiques.....</i>	<i>94</i>
<i>Annexe 6 : Notice fournisseur de la cellule de KOVA.....</i>	<i>95</i>
<i>Annexe 7 : Etapes détaillées de l'analyse au sein de l'UF4000</i>	<i>96</i>
<i>Annexe 8 : Schémas récapitulatifs de la répétabilité.....</i>	<i>103</i>
<i>Annexe 9 : Schémas récapitulatifs de la linéarité.....</i>	<i>104</i>
<i>Annexe 10 : Schémas récapitulatifs de la contamination cellulaire.....</i>	<i>105</i>
<i>Annexe 11 : Schéma récapitulatif de la contamination microbienne.....</i>	<i>106</i>
<i>Annexe 12 : Coefficients de variation et plages du fournisseur.....</i>	<i>107</i>
<i>Annexe 13 : Données et calculs pour la contamination cellulaire.....</i>	<i>108</i>
<i>Annexe 14 : Photos de la contamination microbienne.....</i>	<i>108</i>
<i>Annexe 15 : Tests statistiques pour la comparaison des leucocytes du groupe LCR.....</i>	<i>109</i>
<i>Annexe 16 : Tests statistiques pour la comparaison des leucocytes du groupe Liquide articulaire.....</i>	<i>110</i>
<i>Annexe 17 : Tests statistiques pour la comparaison des leucocytes du groupe Autres liquides.....</i>	<i>111</i>
<i>Annexe 18 : Tests statistiques pour la comparaison des hématies du groupe LCR.....</i>	<i>112</i>
<i>Annexe 19 : Tests statistiques pour la comparaison des hématies du groupe Liquide articulaire.....</i>	<i>113</i>
<i>Annexe 20 : Tests statistiques pour la comparaison des hématies du groupe Autres liquides.....</i>	<i>114</i>
<i>Annexe 21 : Tests statistiques pour la comparaison de la formule leucocytaire du LCR.....</i>	<i>115</i>
<i>Annexe 22 : Tests statistiques pour la comparaison de la formule leucocytaire du liquide articulaire.....</i>	<i>116</i>
<i>Annexe 23 : Tests statistiques pour la comparaison de la formule leucocytaire des autres liquides.....</i>	<i>117</i>
<i>Annexe 24 : Proposition d'abaque du rendu des résultats semi-quantitatif.....</i>	<i>118</i>
<i>Annexe 25 : Diagrammes de dispersion des 4 cultures positives du LCR.....</i>	<i>118</i>
<i>Annexe 26 : Diagrammes de dispersion des 15 cultures positives du liquide articulaire.....</i>	<i>119</i>
<i>Annexe 27 : Diagrammes de dispersion des 24 cultures positives des autres liquides.....</i>	<i>120</i>
<i>Annexe 28 : Algorithmes de prise en charge d'un LCR au laboratoire.....</i>	<i>121</i>
<i>Annexe 29 : Algorithmes de prise en charge d'un liquide articulaire au laboratoire.....</i>	<i>123</i>
<i>Annexe 30 : Algorithmes de prise en charge d'un autre liquide au laboratoire.....</i>	<i>125</i>

I. LISTE DES ABBREVIATIONS

% : Pourcentage

AL : Autres liquides : liquide d'ascite, liquide pleural, liquide péricardique

AP : Anatomopathologie

CIQ : Contrôle interne de qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CRP : Protéine C réactive

CV : Coefficient de variation

CEQ : Contrôle externe de qualité

CIQ : Contrôle interne de qualité

EF : Etat frais

ET : Ecart-type

G - : GRAM négatif

G+ : GRAM positif

H : Hématies

IC : Intervalle de confiance

IM : Incertitude de mesure

ISLA : Infection spontanée du liquide d'ascite

L : Leucocytes

LA : Liquide articulaire

LB : Limite du blanc

LCR : Liquide céphalorachidien

LD : Limite de détection

LDH : Lactate déshydrogénase

LL : Limite de linéarité

LQ : Limite de quantification

M : Moyenne

MGG : May-Grünwald Giemsa

MN : Cellules mononuclées : lymphocytes, monocytes

N : Nombre d'échantillons

PCR : Polymerase Chain reaction

PN : Cellules polynuclées : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles

PNN : Polynucléaire neutrophile

QUAMIC : Groupe qualité microbiologie

Scattergrammes : Diagrammes de dispersion

SNC : Système nerveux central

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

> : Supérieur

< : Inférieur

5M : Méthode d'Ishikawa

II. INTRODUCTION

Les notes renvoient à la bibliographie page 89.

Cette étude, tenant lieu de thèse en biologie médicale, vise à mettre en place, au sein du laboratoire de bactériologie, l'automatisation de la cytologie des liquides d'épanchement par le module liquide biologique d'un automate de bactériologie médicale : l'UF4000 de l'entreprise Sysmex®.

Cet automate est un *analyseur automatisé de particules d'urine* utilisé en routine au sein du laboratoire du CHU d'Amiens pour les analyses cyto bactériologiques des urines. Il possède, en plus du module urine utilisé, un module liquide biologique non exploité à ce jour. Ce module liquide biologique vise à compléter et/ou remplacer l'analyse manuelle cytologique et l'examen direct bactériologique d'un liquide.

Le but de cette thèse est d'exploiter ce module en routine en vérifiant ses performances.

Cette étude de vérification de méthode du module liquide biologique de l'UF4000 permettrait aussi d'apporter des données non connues à ce jour dans la bibliographie.

A. Les liquides biologiques en bactériologie médicale

Le terme « liquides biologiques » utilisé par Sysmex Scorp® est un terme large désignant de manière générale un liquide produit par un organisme vivant. Il entend, par ce terme, l'analyse d'un liquide humain, autre que le sang, dont la numération et la différenciation cellulaire et d'autres particules contribuent au diagnostic d'une pathologie. Il distingue comme liquides biologiques : le liquide céphalo-rachidien (LCR), le liquide pleural, le liquide péritonéal / d'ascite, le liquide péricardique, le liquide synovial / articulaire et le liquide de dialyse péritonéale.

Notre étude s'est portée sur les cinq premiers liquides biologiques. Le liquide de dialyse péritonéale n'a pu être analysé faute de liquides disponibles lors de notre étude.

A l'exception du liquide céphalo-rachidien (LCR), les liquides biologiques analysés sont tous des liquides d'épanchement. Un liquide d'épanchement est un liquide s'accumulant de façon pathologique dans une cavité naturelle ou dans un tissu. Ici le tissu est la séreuse.¹

Les séreuses sont des membranes enveloppant les organes. Elles sont composées de deux feuillets : un feuillet viscéral collé à l'organe et un feuillet pariétal. Ils glissent l'un sur l'autre par l'intermédiaire d'une faible quantité de liquide, que l'on appelle la sérosité. Dans

certaines situations pathologiques, la sérosité augmente de volume de façon anormale, le liquide contenu dans la séreuse est appelé le liquide d'épanchement ou liquides des séreuses.¹

Séreuses	Organes enveloppés	Sérosité / liquide d'épanchement	Pathologie
Synoviale	Articulation	Liquide articulaire	Arthrite
Plèvre	Poumon	Liquide pleural	Pleurésie
Péricarde	Cœur	Liquide péricardique	Péricardite
Péritoine	Appareil digestif	Liquide d'ascite	Infection du liquide d'ascite

Tableau 1 : Les séreuses

Ces cinq liquides, le LCR et les liquides d'épanchement, sont tous des liquides de « Catégorie I » c'est-à-dire normalement stériles à condition que le prélèvement soit correctement réalisé.¹

Ce sont des prélèvements précieux : ils sont parfois difficiles à prélever, leur volume est souvent faible et leur infection conduit à des pathologies infectieuses graves, de morbidités et mortalités élevées.^{2,3}

1. Liquides d'épanchement

Les liquides d'épanchement sont classés en deux catégories : ^{1,2,3,22}

- **les transsudats** : ces liquides d'épanchement sont issus d'une cause mécanique. Il n'y a pas d'inflammation. Ils résultent d'un passage accru de liquide plasmatique entre les deux feuillets de la séreuse à cause d'une altération de leurs fonctions physiologiques.
- **les exsudats** : ces liquides d'épanchement résultent d'une inflammation des séreuses. Il y a une modification de la perméabilité de la membrane. Ils sont généralement d'origine infectieuse.

L'analyse bactériologique des liquides d'épanchement a donc pour but de mettre en évidence ces exsudats.

La première étape de l'examen d'un liquide d'épanchement est de distinguer un exsudat d'un transsudat avant toute analyse microbiologique.¹ Les critères utilisés pour cette distinction varient en fonction des liquides allant d'arguments biochimiques à cytologiques.

a) *Liquide articulaire*

Le liquide articulaire ou communément aussi appelé liquide synovial est un liquide se trouvant au contact de la séreuse de l'articulation : la synoviale. Elle est constituée d'un seul

feuillet. Ce liquide est sécrété par la membrane synoviale de la cavité articulaire. Il a plusieurs rôles : un rôle nutritif et un rôle de lubrifiant de l'articulation lors des mouvements grâce à son composant principal, le hyaluronate.⁶

Le liquide articulaire peut dans certains cas être sécrété en excès. Sa ponction aura alors un double intérêt : conduire au diagnostic suite à l'analyse clinique et paraclinique et apporter un traitement symptomatique afin de soulager le patient. Cet épanchement pourra être : ^{4,5}

- **un transsudat** : le liquide articulaire n'est pas inflammatoire mais d'origine mécanique, consécutif d'un traumatisme, de l'arthrose, d'algodystrophie, ostéonécrose etc.
- **un exsudat** : le liquide articulaire est inflammatoire (arthrite) et peut avoir différentes origines :
 - o infectieuse : arthrite septique : **bactérienne**, virale, mycosique, tuberculeuse.
 - o métabolique : arthrite microcristalline : accumulation de cristaux.⁶⁰
 - o auto-immune : arthrite réactionnelle : polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, rhumatisme psoriasique etc.

Aides cytologiques / bactériologiques / biochimiques à la distinction

La numération leucocytaire permet d'aider à distinguer les différentes causes de cet épanchement.⁷ Un transsudat a généralement un taux < 1000 leucocytes/mm³. Un exsudat présente plus de 2000 leucocytes/mm³.^{2,4}

De plus, la formule leucocytaire aide aussi au diagnostic de cet épanchement. Une formule prédominée par les polynucléaires neutrophiles oriente vers une arthrite septique, réactionnelle ou microcristalline.⁴ Une formule prédominée par des cellules mononuclées oriente le diagnostic vers des maladies de système ou des arthrites virales etc.⁴

L'analyse biochimique du liquide articulaire n'est pas indispensable dans la stratégie diagnostique mais y contribue. Les protéines totales sont souvent dosées en routine : un taux supérieur à 45g/l définit un liquide articulaire inflammatoire.⁴

D'autres éléments sont également systématiquement recherchés à l'examen direct et contribuent eux aussi au diagnostic : la macroscopie du prélèvement, la présence de microcristaux, la présence de bactérie à l'examen direct etc.⁴

Un tableau récapitulatif a été effectué et se trouve en *Annexe I (page 92)*.

Arthrite septique

L'urgence diagnostique du liquide articulaire au laboratoire est l'arthrite septique. Elle présente une mortalité élevée et entraîne des dommages fonctionnels irréversibles.^{3,4} De porte d'entrée hématogène suite à une infection cutanée le plus souvent, elle se caractérise par une articulation rouge, chaude, douloureuse et tuméfiée. Dans la plupart des cas, une seule articulation est touchée et le patient présente les signes généraux d'inflammation (fièvre, hyperleucocytose, CRP augmentée...^{2,4}

Le liquide articulaire est dans ce cas, inflammatoire et riche en leucocytes (>10000 leucocytes/mm³¹, >20000 leucocytes/mm³ dans 80% des cas et >50000 leucocytes/mm³ dans 65% des cas⁴). La formule leucocytaire est prédominée par des polynucléaires neutrophiles souvent altérés.^{1,4} L'examen direct par la coloration de GRAM n'est positif que dans 50 à 75% des cas.⁴ Les agents pathogènes les plus fréquemment rencontrés varient en fonction de l'âge. Pour l'adulte, ce sont des Cocci GRAM positifs avec le *Staphylococcus aureus* et les Streptocoques.⁴

b) Liquide pleural

Le liquide pleural est un liquide se trouvant entre les deux feuillets de la séreuse du poumon : la plèvre. Il permet le glissement des deux feuillets l'un contre l'autre de façon physiologique lors du changement de volume des poumons pendant l'inspiration et l'expiration. Le liquide pleural est constitué et résorbé au niveau du feuillet pariétal : son volume normal est de 2 à 5 ml par hémithorax. Une quantité excessive de ce liquide est considérée comme pathologique et peut être expliquée par différentes causes.^{4,10}

Une ponction pleurale est effectuée afin d'étayer le diagnostic. Cet épanchement peut être : ^{4,10,13}

- **un transsudat** : le liquide pleural n'est pas inflammatoire, il est pauvre en protéines et en cellules. Ce sont des pleurésies à plèvre normale. Elles résultent d'une anomalie mécanique :
 - par déséquilibre de pressions hydrostatiques (insuffisance cardiaque, hypertension portale) et oncotiques (hypoalbuminémie par syndrome néphrotique, insuffisance hépatocellulaire, cirrhose, dénutrition).
 - par diminution de la dépression pleurale (atélectasie pulmonaire).
 - par passage de liquide d'ascite vers la cavité pleurale (transdiaphragmatique par les puits de Ranvier).

- **un exsudat** : le liquide pleural est inflammatoire, riche en protéines et en cellules. Ce sont des pleurésies à plèvre pathologique résultant d'une atteinte de la plèvre par diverses agressions :
 - pleurésie infectieuse : lésions inflammatoires de la plèvre par augmentation de la perméabilité capillaire, d'origine bactérienne (épanchement parapneumonique non compliqué : liquide clair sans bactéries / épanchement parapneumonique compliqué : liquide trouble avec bactérie / empyème ou pleurésie purulente : pus franc avec bactéries), virale, tuberculeuse.
 - pleurésie métastatique : diminution de la réabsorption lymphatique par des cellules tumorales.
 - autres pleurésies : suite à une embolie pulmonaire, liée à l'amiante, liée à une maladie de système, suite à une pancréatite, chylothorax etc.

Aides cytologiques / bactériologiques / biochimiques à la distinction

L'analyse biochimique du liquide pleural permet d'effectuer cette distinction entre un exsudat et un transsudat. Pour cela, sont analysés plusieurs paramètres comme les protéines, les LDH, le glucose ou le cholestérol. Des ratios sont aussi souvent utilisés ou les critères de Light pour permettre de classer l'épanchement en exsudat ou transsudat.^{4,10,11}

La numération leucocytaire aide aussi au diagnostic : un liquide pleural d'origine transudative présente en général moins de 1000 leucocytes/mm³ tandis qu'un liquide pleural d'origine exsudative peut présenter de 1000 à 10000 leucocytes/mm³ et pouvant même être supérieur à 10000 leucocytes/mm³ lors d'une infection.^{1,4,12}

Une numération **précise** des leucocytes a peu d'intérêt ^{11,12} : le nombre de leucocytes varie beaucoup entre un simple exsudat et un empyème. En revanche, ce qui est déterminant pour orienter le diagnostic est la formule leucocytaire : un nombre important de neutrophiles orientera vers une infection à germes pyogènes.¹

Tout comme le liquide articulaire, d'autres éléments sont également systématiquement recherchés à l'examen direct et contribuent eux aussi au diagnostic : la macroscopie du prélèvement qui reste dans ce cas présent, limité, et la présence de bactérie à l'examen direct qui permet un diagnostic présomptif avec une bonne spécificité.^{1,4}

Un tableau récapitulatif a été effectué et se trouve en *Annexe 2 (page 92)*.

Pleurésie bactérienne

Au laboratoire, la pleurésie bactérienne est recherchée. Cette dernière peut se caractériser par une pleurésie parapneumonique simple jusqu'à une pleurésie purulente. La porte d'entrée pulmonaire est la plus fréquente, la moitié des pneumopathies bactériennes se compliquent d'un épanchement pleural. L'épanchement pleural est souvent unilatéral et se caractérise le plus souvent par de la fièvre, une toux productive, des douleurs thoraciques et une dyspnée.⁴ Le taux de leucocytes est généralement supérieur à 10000 leucocytes/mm³ (en cas d'empyème, les leucocytes peuvent être supérieurs à 25000 leucocytes/mm³) avec plus de 50% de PNN à la formule leucocytaire.⁴

La distinction entre l'épanchement parapneumonique non compliqué à compliqué ne s'effectue pas par le nombre de leucocytes mais par rapport à leurs caractères biochimiques et la présence de bactéries à l'examen direct.⁴

Chez l'adulte, les bactéries les plus fréquemment rencontrées pour les pleurésies bactériennes à porte d'entrée pulmonaire sont *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* et les Streptocoques oraux.^{1,2,4}

L'étiologie tuberculeuse de l'épanchement pleural montre, quant à lui, un taux de leucocytes pouvant aller jusque 10000 leucocytes/mm³ mais avec une prédominance de cellules lymphocytaires à la formule leucocytaire.⁴

c) Liquide péricardique

Le liquide péricardique est un liquide se trouvant entre les deux feuillets du péricarde. Il est présent de façon physiologique entre ces deux feuillets afin de faciliter leurs mouvements. Son volume varie de 20 à 50 ml. En situation pathologique, son volume peut augmenter et peut entraîner une compression cardiaque appelée la « tamponnade ».^{4,14,15}

Sa ponction a un but diagnostique et thérapeutique. Le diagnostic clinique et paraclinique prime avant le diagnostic par ponction.^{4,14,15}

Cet épanchement pourra être : ^{4,14,15}

- **un transsudat** : le liquide péricardique n'est pas inflammatoire, pauvre en protéines et en cellules : il résulte d'une anomalie mécanique (insuffisance rénale, d'hypothyroïdie, de chirurgie cardiaque, de traumatisme...).
- **un exsudat** : le liquide péricardique est inflammatoire (péricardite), riche en protéines et en cellules. Il est d'origine infectieuse, néoplasique ou d'autres causes inflammatoires.

La péricardite infectieuse est souvent virale. Elle peut être aussi bactérienne souvent secondaire à une pneumonie bactérienne ou à un empyème chez les sujets âgés ou chez les patients immunodéprimés.¹ Elle peut être également d'origine tuberculeuse.

Les bactéries les plus fréquemment impliquées dans les péricardites bactériennes sont *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, les Streptocoques, les Entérobactéries, quelques anaérobies et *Coxiella burnetii*.^{3,4}

L'analyse macroscopique du liquide péricardique ne permet généralement pas d'orienter le diagnostic.⁴ Par contre, son analyse biochimique à l'aide du dosage des protéines, tout comme le liquide pleural, permettra de définir son origine transudative (< 30g/l) ou exsudative (> 30g/l).

La numération leucocytaire est le test le plus spécifique pour le diagnostic d'un exsudat. Ce dernier est caractérisé par un taux de leucocytes supérieur à 1000 leucocytes/mm³.^{1,3,4}

Dans la plupart des cas, les péricardites bactériennes ont plus de 5000 leucocytes/mm³ et la formule leucocytaire est prédominée par les polynucléaires neutrophiles.⁴

d) Liquide d'ascite

Le liquide péritonéal est un liquide se trouvant physiologiquement, en très faible quantité, entre les deux feuillets du péritoine. Le péritoine est la séreuse recouvrant l'ensemble de l'appareil digestif. Le liquide péritonéal physiologique est principalement issu du liquide interstitiel hépatique passant à travers la capsule du foie.¹⁶ Lorsque son volume augmente et devient excessif (supérieur à 10ml), ce liquide porte alors le nom de liquide d'ascite.

Les principaux mécanismes de formation de l'ascite sont :¹⁶

- la rupture intrapéritonéale d'un conduit liquidien : du canal lymphatique mésentérique ou lymphatique hépatique, d'un canal excréteur du pancréas, d'un uretère.
- une gêne à la résorption du liquide péritonéal : une obstruction pouvant être secondaire à une tumeur maligne du péritoine ou d'une tuberculose péritonéale.
- un excès de production du liquide péritonéal : cirrhose, insuffisance cardiaque droite, syndrome néphrotique.

Les données de l'examen clinique peuvent à elles seules poser le diagnostic et de sa cause. Néanmoins la ponction du liquide d'ascite permettra de confirmer, avec le diagnostic paraclinique, l'étiologie avancée à l'examen clinique.¹⁶

Le liquide d'ascite est classé habituellement en : ⁴

- **transsudat** : le liquide d'ascite est pauvre en protéines (< 25g/l) et en cellules. On l'appelle classiquement *Ascite avec hypertension portale*. Il résulte d'une cause mécanique (phénomènes de stase sous-jacent). Ce transsudat est observé lors de la cirrhose, l'insuffisance cardiaque, de péricardite constrictive, de métastases hépatiques, de thromboses de la veine cave inférieure ou de la veine porte etc.
- **exsudat** : le liquide d'ascite est riche en protéines (>25g/l) et en cellules. Il est d'allure inflammatoire. On l'appelle *Ascite à pression portale normale*. Il est observé dans l'ascite maligne, pancréatique, chyleuse, la tuberculose péritonéale, l'hypothyroïdie, le syndrome néphrotique etc.

Aides cytologiques / bactériologiques / biochimiques à la distinction

L'analyse biochimique permet d'effectuer la différence du transsudat à un exsudat. Pour cela, plusieurs marqueurs traditionnels peuvent être utilisés : les protéines, le cholestérol, le glucose, les triglycérides etc. Mais parfois, l'interprétation de ses dosages de protéines classent, à tort, une ascite transudative en exsudative : par exemple, une partie des ascites avec hypertension portale ont un taux de protides élevés (exemple lors de l'insuffisance cardiaque ou lors d'ascites mixtes combinant une origine cirrhotique avec une origine tuberculeuse). L'utilisation d'un gradient séro-ascitique de l'albumine permet de corriger cette mauvaise distinction et de mieux définir son étiologie : ce gradient est supérieur au concept de transsudat/exsudat pour classer l'ascite.^{4,17,18}

L'analyse cytologique permettra aussi d'orienter le diagnostic : la présence de polynucléaires neutrophiles orientera le diagnostic en faveur d'une infection spontanée du liquide chez le cirrhotique, vers une pancréatite ou vers un hépatocarcinome. Les ascites lymphocytaires orienteront plus le diagnostic vers une tuberculose péritonéale.

Tout comme les autres liquides, d'autres éléments sont également systématiquement recherchés à l'examen direct et contribuent eux aussi au diagnostic : la macroscopie du prélèvement qui donne une bonne orientation diagnostique, et la présence de bactérie à l'examen direct.⁴ Un tableau récapitulatif a été effectué et se trouve en *Annexe 3 (page 92)*.

Infection spontanée du liquide d'ascite

Au laboratoire de bactériologie, est recherchée l'infection spontanée du liquide d'ascite (ISLA) nécessitant la mise en place immédiate d'une antibiothérapie en cas de cytologie

évocatrice et/ou d'examen direct positif.^{16,17} La porte d'entrée digestive est la plus fréquente : suite à une migration transmurale des bactéries intestinales et d'une colonisation secondaire de l'ascite due à l'immunodépression du cirrhotique.^{4, 17} Les signes biologiques et cliniques les plus courants sont les diarrhées, les douleurs abdominales, l'insuffisance rénale, l'hyperleucocytose et l'encéphalopathie.⁴

L'ISLA se définit par un nombre de polynucléaires neutrophiles en valeur absolue > 250/mm³ à la cytologie.^{1,17} L'examen direct par la coloration de GRAM est peu sensible (10%), tout comme la culture.^{1,4} Les bactéries les plus fréquemment rencontrées sont les entérobactéries : notamment *Escherichia coli* et *Klebsiella sp.* Les streptocoques peuvent aussi être observés.^{1,3,4}

En fonction du contexte clinique, la tuberculose péritonéale peut être évoquée. Le taux de leucocytes est généralement supérieur à 1000 leucocytes/mm³ avec une nette prédominance de lymphocytes à la formule leucocytaire.⁴

2. Le liquide céphalo-rachidien

Le liquide céphalorachidien n'est pas un liquide d'épanchement. C'est un liquide physiologique résultant de l'ultrafiltration du sang. Ce liquide est sécrété par les plexus choroïdes des ventricules cérébraux. Il circule dans les espaces sous-arachnoïdiens du système nerveux central (SNC). Il assure, en outre, un rôle mécanique d'amortisseur préservant ainsi le tissu nerveux sous-jacent.

Son volume est en général de 100 à 150 ml. Il est stérile, pauvre en protéines (0,15 à 0,45 g/l), en glucose (50% à 66% de la glycémie patient) et en cellules (<5 leucocytes/mm³ pour un adulte^{1,2}). La ponction de LCR se fait le plus souvent par la ponction lombaire, non sans risques et conséquences (hématomes, hernie cérébrale, infection...)²¹

L'analyse microbiologique permet et contribue au diagnostic de différentes infections du SNC : ¹ les méningites et ventriculites, les encéphalites et méningo-encéphalites infectieuses ou non, les suppurations intracrâniennes (empyèmes, thrombophlébites septiques, abcès).

Ces infections engagent le pronostic vital du patient et nécessitent une prise en charge rapide du LCR au sein du laboratoire.

Pour les diagnostiquer, les analyses cliniques, paracliniques et biologiques sont indispensables. La triade clinique dite classique de la méningite se caractérise par un syndrome méningé avec raideur de la nuque, céphalées intenses et vomissements.

Les analyses biochimique, cytologique et bactériologique du LCR permettent de définir le type d'infection du SNC et d'en prédire les conséquences.²⁰

La présence d'une hyperprotéinorachie avec une hypoglycorachie d'un LCR montrant plus de 3-5 leucocytes/mm³ et une formule prédominée par les neutrophiles orientent le diagnostic vers une infection d'origine bactérienne¹⁹ (formule interprétable à partir de 10 éléments^{1,2,3}). Chez les nouveau-nés, le seuil est plus haut, un LCR normal peut contenir jusqu'à 30 leucocytes/mm³.¹ Généralement, le LCR des méningites bactériennes non traitées montre plus de 1000 leucocytes/mm³ dont plus de 80% de polynucléaires neutrophiles.³ Un tableau récapitulatif a été effectué et se trouve en *Annexe 4 (page 93)*.

Les principales bactéries responsables de méningites sont différentes en fonction de l'âge. Les méningites communautaires des nouveau-nés sont souvent dues à *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli K1* ou *Listeria monocytogenes*. Chez les nourrissons, les enfants et les adultes, *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* sont les bactéries les plus fréquemment impliquées et *Haemophilus influenzae* en l'absence de vaccination. Chez les patients immunodéprimés, *Listeria monocytogenes*, les entérobactéries ou les champignons sont les plus impliqués.^{1,2}

3. Prise en charge des liquides biologiques

La prise en charge des liquides d'épanchement au sein du laboratoire est un diagnostic d'urgence. En effet, l'analyse cytologique du liquide permet soit de conduire au diagnostic de la pathologie du patient, soit d'orienter et compléter rapidement le diagnostic clinique et paraclinique du médecin en charge du patient. L'analyse microbiologique, quant à elle, oriente sur la thérapeutique à adopter ou à confirmer/infirmier la thérapeutique par antibiothérapie probabiliste mise en place avant la réalisation du prélèvement dans l'urgence de la situation clinique du patient.

L'interaction clinico-biologique est indispensable pour permettre au biologiste de répondre à la demande urgente du clinicien dans les étapes :

- **pré-analytique** avec les renseignements cliniques donnés par le prescripteur comme la symptomatologie clinique, les antibiotiques mis en place, les antécédents du patient, les orientations diagnostiques possibles, tout comme le respect des conditions de prélèvement avec le bon remplissage des tubes - conditionnant ainsi la suite de la prise en charge du liquide au sein du laboratoire.

- **analytique** avec l'analyse cytologique et microbiologique réalisées par le personnel compétent - permettant ainsi un rendu partiel l'examen direct au clinicien toujours dans le but d'optimiser la prise en charge du patient.
- **post-analytique** avec le rendu global du résultat, les prestations de conseils du biologiste, la communication des résultats urgents (par exemple le LCR) et l'orientation éventuelle vers des examens complémentaires.

Le biologiste médical joue donc un rôle central dans cette prise en charge globale du patient avec la collaboration clinico-biologique. Dès lors, la prise en charge rapide et adéquate de ces liquides au laboratoire conditionnera la bonne prise en charge du patient dans sa globalité.

Pour répondre à cette demande d'orientation diagnostic rapide, plusieurs analyses successives de ces liquides doivent être réalisées au sein du laboratoire de bactériologie¹, le plus rapidement possible (dégradation des leucocytes au-delà de 2h pour le LCR) : ^{1,2}

- **l'analyse macroscopique** : l'aspect du prélèvement orientera plus ou moins le diagnostic selon le liquide.
- **l'analyse microscopique** :
 - cytologique quantitative et qualitative :
 - quantitative : la numération des leucocytes-hématies (/mm³) au moyen d'une cellule de comptage. Les seuils de significativité changeant pour les différents liquides.
 - LCR** : 3-5 leucocytes/mm³ ^{1,2,3}
 - Liquide articulaire** : +/- 200 leucocytes/mm³ ^{3,6,9}
 - Les autres liquides** : 100 leucocytes/mm³ ³
 - qualitative : la formule leucocytaire par coloration de MGG (à réaliser en fonction de l'analyse cytologique quantitative) et la recherche des cristaux pour les liquides articulaires.
 - bactériologique :
 - observation des bactéries à l'examen direct par coloration de GRAM ou autres, quel que soit les résultats cytologiques et biochimiques.
 - mise en culture, identification et antibiogramme.

L'analyse biochimique du liquide biologique est réalisée en urgence au sein du laboratoire de biochimie.

En *Annexe 5 (page 94)*, se trouvent pour l'ensemble des liquides biologiques étudiés, les procédures applicables au sein du laboratoire de bactériologie du CHU AMIENS-PICARDIE.

B. Techniques de références

Actuellement, l'analyse microscopique (cytologique et l'examen direct bactériologique) des liquides d'épanchement (LCR, liquide articulaire, liquide pleural, liquide d'ascite, liquide péricardique) est réalisée par des techniques manuelles.

Comme décrit précédemment, afin de réaliser la prise en charge standard du liquide, plusieurs techniques manuelles sont mises en œuvre au sein du laboratoire de bactériologie : ^{1,2}

- pour la cytologie :
 - quantitative : le décompte manuel en cellule de comptage.
 - qualitative : la coloration de MGG (*et l'état frais pour observer les microcristaux des liquides articulaires*).
- pour l'examen direct bactériologique : la coloration de GRAM.

1. Analyse cytologique quantitative

Elle est effectuée par un système manuel appelé hématimètres (cellules de comptage) à usage unique comme les KovaSlide® utilisées au laboratoire du CHU d'Amiens.^{2,4,23} Les KovaSlide® regroupent sur le même support 10 cellules de comptage. Chaque cellule contient une grille de comptage des éléments (leucocytes/hématies). La lecture est simple et se trouve facilitée par la grille. Néanmoins elle peut présenter certains inconvénients :

- Le faible volume de liquide étudié : 1 μl (1mm^3).
- La variabilité inter-opérateur par l'approximation quantitative des éléments : lorsque la cellularité du liquide est élevée, l'opérateur ne compte pas entièrement la grille de comptage : il compte un petit carré ou une ligne et multiplie ensuite par le facteur multiplicatif correspondant, donné dans la notice du fournisseur en *Annexe 6 (page 95)*. Cela entraîne une baisse de la précision du comptage.

2. Analyse cytologique qualitative

Elle consiste à colorer les cellules d'un liquide après un frottis ou après une cyto-centrifugation dans le but de connaître avec précision la nature des éléments présents lors de l'analyse cytologique quantitative.² On détermine alors la présence de cellules polynuclées et la présence de cellules mononuclées. La coloration de référence est celle de May-Grünwald-

Giemsa (MGG). Elle permet de colorer les noyaux des cellules en bleu, le cytoplasme en rose et les bactéries en bleu. Nous utilisons le Kit RAL diagnostic® qui présente l'avantage d'être rapide et simple d'utilisation.

3. Examen direct bactériologique

Il consiste à mettre en évidence les bactéries dans le liquide avant sa mise en culture. De nombreuses techniques existent avec ou sans coloration. La technique utilisée au laboratoire est la coloration de GRAM, la technique de référence reconnue en bactériologie. Cet examen oriente sur la famille ou le genre bactérien en fonction la capacité de la bactérie à se décolorer (Bactéries GRAM négatif) ou non (Bactéries GRAM positif) à l'alcool. Elle permet également d'apprécier la forme de la bactérie.²

Cet examen permet de mettre en place, de modifier ou d'adapter une antibiothérapie initiale. Les principaux inconvénients de cette méthode sont le manque de sensibilité (un GRAM n'est positif qu'à partir de 10^4 UFC/ml²) et la compétence du personnel.

En résumé, les techniques manuelles utilisées actuellement sont des techniques de référence mais présentent les inconvénients des techniques manuelles, comme :

- l'importante variabilité inter-opérateur entraînant une reproductibilité non satisfaisante.
- la formation initiale et continue du personnel.
- le temps d'analyse (Time consuming), la rigueur et la patience de la lecture.

La mise en place de techniques automatisées dans un laboratoire de bactériologie permet d'optimiser et d'améliorer les techniques manuelles. Elles présentent les avantages suivants : ^{2,24}

- standardisation des résultats avec une meilleure reproductibilité.
- amélioration du délai de rendu du résultat et donc de la prise en charge du patient.
- traçabilité accrue.
- rationalisation du flux de travail permettant le redéploiement le personnel pour l'analyse d'autres examens urgents ou nécessitant une expertise supplémentaire ou dans le développement d'activité nouvelles et innovantes.

Il est donc utile de connaître les performances ainsi que les limites de l'automate et d'en assurer une maîtrise des risques optimale pour orienter le prélèvement vers la technique la plus adaptée : manuelle ou automatisée.

C. Techniques automatisées

Les techniques automatisées pour la cyto bactériologie urinaire sont déjà bien implantées en France dans les laboratoires de biologie médicale. Les études disponibles montrent de bonnes performances analytiques de la cytologie automatisée² avec des techniques d'analyse d'image comme l'IQ Elite® de Iris Diagnostic, LabUMat-Urised de 77 Elektronika®^{25,26} ou le Cobas 6500 de Roche®^{27,28} ; aussi avec la détection laser par cytométrie de flux après marquage des cellules par des fluorochromes comme avec l'UF1000²⁹, l'UF5000³⁰ ou encore l'UF4000 couplée à son analyseur d'image UD-10³¹ de Sysmex®. Ces études suggèrent la supériorité technique de ces automates dans le décompte cellulaire pour les urines sans alarmes et sans trop forte turbidité.

L'automatisation de la cytologie des liquides biologiques a été développée il y a plus de 40 ans dans le domaine de l'hématologie avec différents automates. De nombreuses études ont également montrées de bonnes performances analytiques cytologiques dans l'analyse des liquides biologiques en hématologie avec la détection des cellules tumorales de la ligne XE ou XN de Sysmex®^{32,33,34}, de Siemens®, de Beckman® ou d'Abbott®³⁵.

Actuellement, peu d'automates ont été développés pour la cytologie des liquides dans le domaine de la bactériologie médicale. En effet, l'analyse bactériologique des liquides biologiques est associée à des étapes cytologiques complexifiant ainsi le processus d'automatisation.² L'hétérogénéité cytologique des liquides biologiques a aussi retardé la mise en place de système automatisé en bactériologie. Plusieurs études ont été réalisées sur le passage du LCR sur l'UF100 de Sysmex®³⁶ et sur l'UF1000 de Sysmex®³⁷ montrant ainsi une grande utilité dans la prise en charge du LCR au sein du laboratoire. Quelques autres études ont montré l'utilité du mode liquide biologique de l'UF1000 de Sysmex® pour les liquides d'épanchement.^{38,39} D'autres études ont été également publiées pour l'IQ Elite® de Iris Diagnostic pour les liquides d'épanchement.⁴⁰

Ces études montrent de belles perspectives d'utilisation des automates d'urine (et notamment de Sysmex®) pour l'analyse cytologique des liquides biologiques.

L'UF4000 de chez Sysmex® propose un module liquide biologique en plus du module urine.

Les performances du module urine ont permis son intégration dans le flux du laboratoire permettant l'automatisation générale du prélèvement d'urine de la cytologie urinaire (UF4000) à l'ensemencement (chaîne automatisée de BD-Kiestra®).

La mise en place du module liquide biologique de cet automate viserait à intégrer les liquides biologiques à l'automatisation quasi-complète de son analyse bactériologique.

D. L'UF4000 : sa technologie, son principe, son fonctionnement

L'UF4000 développé par Sysmex Scorp® est un analyseur quantitatif automatisé de particules.^{41,42,43}

1. Caractéristiques de l'appareil

L'UF4000 présente deux modes : un mode *Urine* comprenant 17 paramètres et un mode *Liquide biologique* comprenant 9 paramètres. Les 9 paramètres rendus par l'automate sont : les leucocytes (WBC), les hématies (RBC), le compte et le pourcentage de cellules mononuclées (MN# et MN%), le compte et le pourcentage de cellules polynuclées (PN# et PN%), les cellules épithéliales (EC), le compte total de cellules nucléées (TNC) et les bactéries (BACT).

Les volumes analysés sont différents selon les modes. Le tableau 2 illustre celui du mode liquide biologique.

Mode liquide biologique	
Cadence de traitements des échantillons	15 échantillons/heure
Volume minimum requis	600 µl
Volume d'aspiration (d'analyse)	450 µl
Volume mort	150 µl

Tableau 2 : Volumes du mode liquide biologique

L'analyseur, l'UF4000, est relié à un logiciel Sysmex® appelé U-WAM permettant une gestion complète des données d'analyses et des résultats ainsi que le paramétrage d'alarmes, de commentaires et de règles de validation.

2. Technologie et principe de fonctionnement

La technologie mise en œuvre par Sysmex® est la fluorocytométrie en flux. La fluorocytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer dans une suspension

cellulaire, les caractéristiques individuelles de chaque particule (leur taille, leur forme, leur complexité cellulaire) à l'aide d'un composé fluorescent (un fluorochrome). Cette technique vise à obtenir une analyse détaillée des cellules d'un liquide.

Étapes de l'analyse au sein de l'UF4000

- **1^{ère} étape** : dilution et coloration du liquide avec les fluorochromes CR (de cœur) et SF (de surface).
- **2^{ème} étape** : le liquide est injecté dans la flow-cell entouré par un liquide de gaine étirant la suspension pour que les particules soient alignées les unes après les autres.
- **3^{ème} étape** : une tâche de faisceau laser est pointée sur les particules passant une à une dans la flow-cell. Quatre signaux lumineux émanent pour chaque particule :
 - lumière diffusée vers l'avant (FSC : Forward Scattered)
 - lumière diffusée sur le côté (SSC ou SS : Side Scattered light)
 - lumière diffusée latérale dépolarisée (DSS : Depolarised Side Scattered light)
 - lumière fluorescente latérale (SFL ou FL : Side Fluorescence light)
- **4^{ème} étape** : un système optique transforme les lumières émises en signaux électriques puis en « formes d'ondes / empreintes ».
- **5^{ème} étape** : chaque forme d'ondes de chaque signal est analysée par un microprocesseur afin de classer et compter la particule.
- **6^{ème} étape** : création d'un diagramme de dispersion appelé scattergramme.

L'intégralité de la description des étapes de l'analyse se situe en *Annexe 7 (page 96)* ainsi que les images et les explications des diagrammes de dispersion visualisés à l'UF4000.

E. Normes et exigences pour la qualité en bactériologie médicale

Dans l'optique d'une utilisation en routine de ce module liquide biologique, il est nécessaire de vérifier et de confirmer que les exigences spécifiées par le fournisseur, Sysmex Scorp®, sont satisfaisantes dans nos conditions réelles d'utilisation.⁴¹ Cette vérification de méthode est exigée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) selon la norme NF EN ISO 15189.⁴⁴

Pour cela, plusieurs documents COFRAC ont été utilisés :

- les documents opposables : la norme NF EN ISO 15189⁴⁴ ainsi que les référentiels du COFRAC, notamment le SH REF 02 relatant les exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.⁴⁵

- les documents d'information comme le SH INF 50⁴⁶ permettant de définir notre portée d'accréditation : la BM MG07.
- les documents non opposables avec les guides techniques d'utilisation (SH GTA 04)⁴⁷ permettant de donner des précisions pour la bonne vérification d'une méthode et de répondre aux exigences normatives sur des sujets techniques particuliers.

La vérification de méthode et toutes les expériences effectuées ont été réalisées en accord avec les données du groupe qualité microbiologie QUAMIC⁴⁸, des procédures internes au laboratoire (*CHUPROC0378*), des recommandations pour la vérification des performances d'une méthode⁴⁹ ainsi que du guide d'utilisation pour la vérification de méthode de Sysmex®.⁵⁰ En vue de l'ajout de l'analyse sur la liste des analyses accréditées au COFRAC, la fiche de vérification du laboratoire d'une méthode de biologie médicale (*CHUFO0497*) a été complétée selon le document COFRAC SH FORM 43.⁵¹

F. Objectifs et buts

Le premier objectif de cette thèse est la vérification de méthode de ce module liquide biologique en démontrant ses performances et en les vérifiant in situ.

Le deuxième objectif de cette thèse est d'apporter des données microbiologiques dans la littérature sur les éléments encore peu connus pour l'UF4000, en particulier pour la détection des bactéries pour le mode liquide biologique.

Le troisième objectif de cette thèse est d'intégrer cet automate au flux de travail du laboratoire :

- Choix entre une méthode automatisée ou manuelle en fonction du liquide biologique analysé.
- Création d'algorithmes décisionnels pour la prise en charge de chaque liquide au sein du laboratoire en fonction des données cytologiques et microbiologiques obtenues sur l'automate.

Ces trois objectifs permettront ainsi de mettre en évidence les différents avantages et les inconvénients de cette méthode automatisée.

III. MATERIELS ET METHODES

A. Pré-requis : Modalités de vérification

La vérification de méthode effectuée relève d'une portée flexible standard A : son utilisation suit les recommandations du fournisseur. Elle appartient à une méthode reconnue : l'automate est marqué CE.

Le processus analytique des liquides biologiques est un processus complexe. Il comprend une analyse cytologique selon deux méthodes :

- **méthode quantitative** : dénombrement des leucocytes et hématies avec formule leucocytaire en fonction du nombre de leucocytes.
- **méthode qualitative** : présence ou non de bactéries et de cristaux à l'examen direct (pour les liquides articulaires).

Une analyse bactériologique est ensuite réalisée : l'identification des bactéries en culture et l'antibiogramme.

L'UF4000 en mode liquide biologique permet de réaliser un dénombrement à la fois des leucocytes, hématies, cellules épithéliales et bactéries en unités/ μ l et de rendre une formule leucocytaire en pourcentage (%). Notre vérification de méthode est donc une **méthode quantitative**.

Les paramètres vérifiés sont listés dans le tableau suivant :

Critères	Critères à évaluer selon le SH GTA 04	Critères évalués ou non in situ pour la thèse
Fidélité : Répétabilité et Reproductibilité	Oui	✓ Effectué
Justesse / Exactitude (approche)	Oui	✓ Effectué à posteriori : CEQ cytologie urinaire**
Incertitudes / Facteurs de variabilité et leur évaluation	Oui	✓ Effectué : maîtrise des 5M + calcul de l'incertitude
Comparaison de méthode	Oui	✓ Effectué
Limite de détection	Non	✓ Effectué***
Intervalle de mesure : LQ et LL*	Bibliographie	✓ Effectué***
Contamination entre échantillons	Bibliographie	✓ Effectué***
Intervalle de référence	Bibliographie	Documents Sysmex® et bibliographie**
Interférences (lipémie, hémoglobine, bilirubine, médicaments)	Bibliographie	Documents Sysmex® et bibliographie**
Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués...)	Bibliographie	Documents Sysmex® et bibliographie**
Robustesse	Bibliographie	Documents Sysmex® et bibliographie**
Spécificité analytique	Non	✓ Effectué : création de seuils pour les bactéries
Sensibilité diagnostic	Non	✓ Effectué : création de seuils pour les bactéries
Variabilité inter-opérateur	Non applicable	✗ Non effectué : méthode automatisée

Tableau 3 : Critères à évaluer pour cette méthode quantitative d'une portée flexible standard A selon le guide technique SH GTA 04 ⁴⁷

Légende

* *LQ* : Limite de quantification / *LL* : Limite de linéarité.

** *Données non étudiées mais renseignées dans le guide utilisateur de Sysmex®.*⁴¹

*** *En plus des critères à évaluer obligatoirement selon le SH GTA 04 pour cette vérification de méthode, nous choisissons de vérifier in situ la limite de détection, la limite de quantification, la limite de linéarité, la contamination inter-échantillons par manque de bibliographie à ce sujet. En plus, dans la partie comparaison de méthode, nous complétons l'étude par une étude des bactéries.*

Afin d'effectuer cette vérification de méthode pour les liquides biologiques, nous réalisons trois groupes de liquides : le groupe *Liquide céphalorachidien LCR*, le groupe *Liquide articulaire* et le groupe *Autres liquides* comprenant à lui seul : le liquide d'ascite, le liquide pleural, le liquide péricardique.

Ces trois groupes de liquides ont été constitués pour différentes raisons : ils ont été triés par rapport à :

- **leur matrice** : les matrices d'aspect similaires sont regroupées ensembles.
- **leur seuil décisionnel en leucocytes** entraînant la réalisation d'une formule leucocytaire : pour le groupe *LCR*, le seuil est de 10 leucocytes, pour le groupe *Liquide articulaire* le seuil est de 200 leucocytes et le groupe *Autres liquides* le seuil est de 100 leucocytes.
- **leur aspect macroscopique** : le LCR est un liquide plutôt fluide, le liquide articulaire plutôt visqueux et les liquides d'ascite, pleuraux, péricardiques sont de même aspect intermédiaire, plus ou moins visqueux.

L'étude a duré 4 mois (du 17 septembre 2019 au 17 janvier 2020) permettant la réalisation de la vérification de méthode in situ et des expériences supplémentaires.

L'ensemble des liquides biologiques ont été passés sur l'automate dans le mode **STAT BF** selon les recommandations fournisseurs. Ce mode réservé aux liquides biologiques, permet de les passer en mode Frontal c'est à dire par devant l'automate dans des cupules dédiées.

Il existe deux autres modes, cette fois-ci dédiés exclusivement aux passages des urines : le mode **RACK** permettant un passage des urines sur un rack automatisé (mode passeur) et le mode **STAT URI** permettant un passage des urines urgentes en mode frontal. La différence entre le mode STAT BF et les modes RACK ou STAT URI est le nombre de rinçages successifs entre le passage de deux échantillons. En mode STAT BF, l'automate effectue deux rinçages, en mode RACK, il effectue un seul rinçage.

En mode STAT BF, chaque cupule (volume = 4ml) est passée une à une manuellement et nécessite notre intervention afin de la disposer sur son support. Le volume minimal recommandé par le fournisseur est de 600 µl (1^{er} trait sur la cupule). L'ensemble des cupules passées pour ces expériences ont donc été remplies jusqu'au 1^{er} trait.

Chaque échantillon primaire a bien été homogénéisé avant mise dans la cupule et chaque cupule a été préparée extemporanément sous PSM avant passage sur l'appareil. Toutes les manipulations des liquides ont été réalisées par des pipettes plastiques et micropipettes automatiques.

Toutes les dilutions effectuées au cours de cette étude ont été réalisées dans de l'eau physiologique à 0,85% de NaCl de par sa similitude d'osmolarité avec les liquides biologiques. Le tube d'eau physiologique étant de 9 ml, il a été assez utile et facile de l'utiliser pour effectuer des dilutions au 1/10^{ème}.

Par ailleurs, les liquides biologiques utilisés pour toute la vérification de méthode et les expériences supplémentaires étaient des liquides biologiques issus de la routine, techniqués en première intention selon la méthode manuelle puis conservés au frais à 5°C +/- 3°C ou à température ambiante pour la suite de nos expériences. Ces derniers ont été prélevés dans les tubes stériles selon le manuel de prélèvement du CHU d'Amiens en vigueur et en accord avec les données du REMIC.¹

L'automate UF4000 a été contrôlé par des maintenances préventives quotidiennes pendant toute la durée de l'étude. Ces maintenances sont utilisées pour le passage de routine des urines. L'utilisation du mode liquide biologique (STAT BF) ne requiert pas de maintenance supplémentaire. Le passage des échantillons de l'étude a été encadré par le passage des contrôles de niveau haut et bas (CIQ) selon le tableau des maintenances préventives validant aussi le passage des échantillons de routine. A la fin de chaque longue expérience (exemple répétabilité, linéarité etc.), une série de contrôles a été repassée afin de valider notre expérience.

Les dates, les durées, les contrôles, les réactifs, et l'eau physiologique ont été relevés pour chaque expérience. Les versions des logiciels utilisés pour la l'UF4000 et l'UWAM sont respectivement la version 0021 et 0015.

B. Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre les indications d'une valeur mesurée obtenues par des mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées. Elle fournit une indication sur les erreurs aléatoires, dues au hasard. La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont deux évaluations différentes de la fidélité.

1. Répétabilité

La répétabilité permet de caractériser, dans des conditions optimales, la meilleure performance possible de l'UF4000 et, ainsi, de vérifier le bon fonctionnement du système en routine.

Nous avons réalisé des essais de répétabilité sur les trois groupes de liquides analysés : le groupe *LCR*, le groupe *Liquide articulaire* et le groupe *Autres liquides*.

Parmi ces trois groupes, la répétabilité est réalisée sur trois paramètres : les leucocytes, les hématies et les bactéries.

Pour chaque paramètre nous réalisons trois niveaux de concentration au minimum : haut, intermédiaire (proche du seuil décisionnel) et bas. Pour certains paramètres, nous réalisons en plus, si le liquide analysé le permet, deux niveaux de concentrations (très haute et/ou très basse) afin de vérifier cette répétabilité à des concentrations extrêmes en restant dans les limites de linéarité renseignées par le fournisseur. Nous mesurons la moyenne (m), l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) pour chaque série après saisie des données sur le logiciel Excel.

Les analyses de chaque répétabilité pour chaque liquide et chaque paramètre sont réalisées selon les conditions standardisées : même opérateur, même instrument, même lot de contrôles, même lot de réactifs, même calibration. Pour cela, 20 cupules d'échantillon contenant la matrice sont lancées en mode STAT BF consécutivement pour chaque groupe, chaque paramètre et chaque niveau. Chaque cupule est utilisée une seule fois et est préparée extemporanément après homogénéisation du liquide.

Pour le groupe LCR (Leucocytes-haut niveau de concentration, Hématies-haut niveau de concentration, Bactéries-très haut niveau de concentration), 15 cupules au lieu de 20 ont été analysées pour cause de volume d'échantillon insuffisant. De plus, la période d'étude n'a pas permis l'étude d'un LCR contenant plus de 200 leucocytes/ μ l.

Nous réalisons des pools de liquides pour atteindre un volume suffisant (minimum 20 x 600µL = 12ml) et pour avoir les niveaux de concentrations cibles en Leucocytes, Hématies et Bactéries. De même, nous réalisons aussi dans certains cas des dilutions de pools de liquides devenus trop concentrés pour être dans les concentrations cibles ou de liquides de volume trop faibles pour réaliser l'intégralité de la répétabilité.

Pour le groupe *Liquide articulaire*, l'ensemble des liquides ou des pools de liquides sont dilués au minimum au 10^{ème} afin de limiter la viscosité des liquides. Cette grande viscosité entraîne un risque de bouchage de l'aiguille d'aspiration.

La répétabilité est réalisée dans un délai le plus court possible : en mode STAT BF, la capacité de traitement des échantillons est de 15 échantillons/heure par l'appareil. De ce fait les répétabilités suivantes sont réalisées en 1h30 minimum.

En *Annexe 8 (page 103)* se trouve un schéma récapitulatif de la répétabilité.

2. Reproductibilité / Fidélité intermédiaire

Nous avons choisi de réaliser des essais de reproductibilité en utilisant les contrôles internes de qualité (CIQ). En effet, le manque de stabilité des liquides biologiques dans le temps ne permet pas de réaliser convenablement cette expérience avec des échantillons patients.

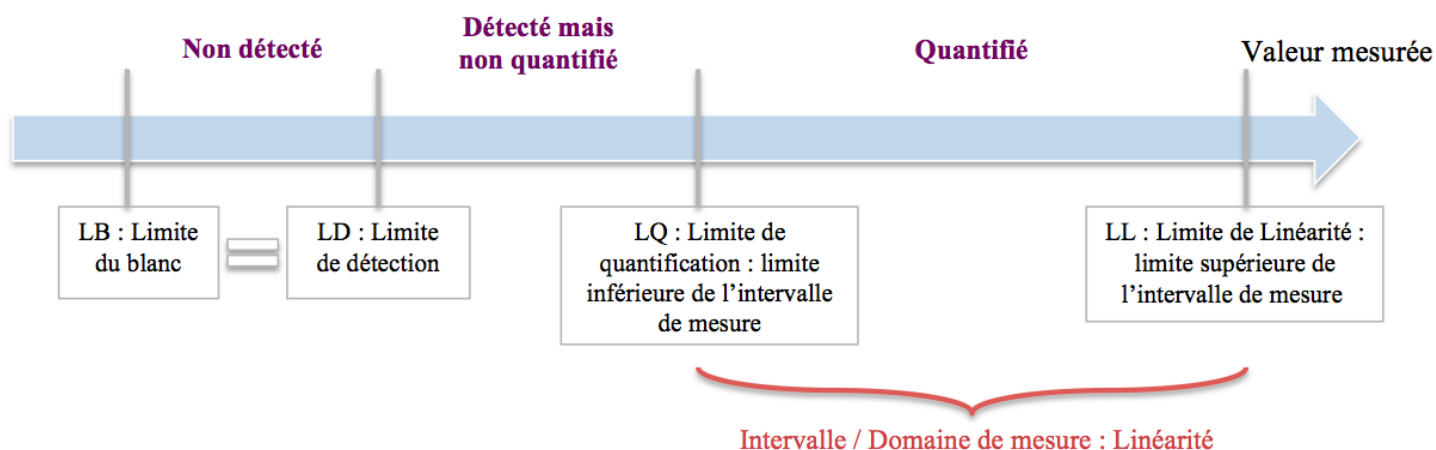
L'objectif de ces essais de fidélité intermédiaire est de vérifier, en faisant varier le temps ou l'opérateur par exemple, que le résultat rendu par l'appareil reste le même avec un coefficient de variation inférieur à celui donné par le fournisseur. On connaît ainsi la variabilité analytique d'une méthode.

Deux types de contrôles (CIQ) sont utilisés : un contrôle de niveau BAS (L) et un contrôle de niveau HAUT (H). Ces deux niveaux de contrôles sont passés 2 fois minimum par jour par le même opérateur ou par un opérateur différent pendant 42 jours successifs (du 27/09/2019 au 08/11/2019). Ce rythme de passage permet d'encadrer les résultats obtenus pour les échantillons de routine et ceux de nos expériences. Nous mesurons, pour contrôle, la moyenne (m), l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) pour l'ensemble des valeurs des contrôles passés sur l'UF4000 pour chaque paramètre par le logiciel U-WAM de Sysmex.

Selon les recommandations du fournisseur, ces contrôles sont passés en mode STAT dans une cupule comme un liquide biologique. Le niveau bas est analysé le premier.

Ces contrôles servent à la fois à la matrice urine et la matrice liquide biologique : ils valident le bon fonctionnement des photomultiplicateurs (capteurs) au sein de l'UF4000.

C. Etendue de mesure



1. Limite de détection (LD)

Nous avons calculé la limite de détection de l'automate. C'est la plus petite concentration qui peut être détectée avec un risque acceptable (souvent 5%) mais non quantifiée pour un échantillon de patient.

Déterminer la limite de détection permet de connaître la valeur à partir de laquelle on peut affirmer avec un risque donné, que la substance est présente dans l'échantillon. Elle est essentielle pour ne pas communiquer une valeur qui n'est pas significative sur le plan analytique. Elle est définie pour un risque évalué à 5% par la formule :

$$LD = 3 s(y_{\text{blanc}})$$

Où $S(y_{\text{blanc}})$ = écart-type des valeurs mesurées

Nous avons appliqué cette formule par le calcul de la moyenne (m) et de l'écart-type (ET) des concentrations obtenues pour chaque paramètre après saisie des données sur le logiciel Excel.

Pour cela, 30 cupules ont été passées successivement en mode STAT BF contenant un blanc c'est à dire de l'eau physiologique à 0,85% de volume minimal recommandé par le fournisseur (600 μ l). Cette expérience a duré 2 heures et a été réalisée après maintenance hebdomadaire (rinçage par l'UFCellClean) et journalière.

2. Limite de quantification (LQ)

Nous avons aussi déterminé la limite de quantification de l'automate. C'est la plus petite valeur rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue. C'est cette plus petite valeur qui peut être quantifiée et fournie pour un échantillon de patient.

Nous avons déterminé la limite de quantification pour les leucocytes, les hématies et les bactéries. Pour cela, comme première technique, nous avons choisi de prendre un pool de liquide d'ascite par argument de fréquence et de volume nécessaire (15ml). Nous l'avons dilué par de l'eau physiologique à 0,85% pour arriver au seuil de leucocytes (environ 100 leucocytes/ μ l). A partir de ce mélange, nous avons effectués 6 dilutions en cascade pour arriver à la valeur la plus basse possible. Chaque dilution est mesurée 10 fois. Au total, 70 cupules sont passées successivement sur l'automate. L'expérience dure 5 heures.

Nous mesurons la moyenne (m), l'écart-type (ET), le coefficient de variation (CV) et le taux de récupération (TR) en % pour chaque série de dilution après saisie des données sur le logiciel Excel. La concentration pour laquelle on obtient CV inférieur ou égal à la limite acceptable définie pour ce niveau de concentration correspond à la limite de quantification.

Par manque de précision de la première technique lors de notre expérience, nous vérifions les résultats obtenus avec la deuxième technique de calcul de la limite de quantification :

$$\mathbf{LQ = 10 s(y_{blanc})}$$

Où $S(y_{blanc})$ = écart-type des valeurs mesurées

Nous avons appliqué cette formule par le calcul de la moyenne (m) et de l'écart-type (ET) des concentrations obtenues pour la limite de détection pour chaque paramètre après saisie des données sur le logiciel Excel.

3. Linéarité

Nous avons réalisé des essais de linéarité sur les trois groupes de liquides analysés : le groupe *LCR*, le groupe *Liquide articulaire* et le groupe *Autres liquides*.

Pour chaque groupe, la linéarité des valeurs des leucocytes et des hématies est vérifiée. Nous n'avons pas réalisé de linéarité pour les bactéries. D'autres expériences sont utiles pour déterminer cette linéarité.

Pour cela et suivant les recommandations fournisseur, on réalise deux niveaux de concentration pour chaque paramètre de chaque groupe : le **haut** niveau de concentration

(10000 leucocytes ou hématies/ μl) et le **bas** niveau de concentration (1000 leucocytes ou hématies/ μl). A partir de ces deux niveaux de concentration, on réalise des dilutions pour avoir une gamme de concentration linéaire allant de 0 élément/ μl à 10000 éléments/ μl . Pour le groupe LCR, on réalise l'analyse de la linéarité des leucocytes jusqu'à 100/ μl (bas niveau de concentration) faute de liquide disponible pour l'analyse sur le haut niveau de concentration.

L'objectif de ces essais de linéarité est de vérifier si les résultats rendus dans la plage donnée par le fournisseur (2 à 10000 pour les leucocytes/ μl et 15 à 99999 pour les hématies/ μl) sont justes et fiables. On définira alors l'intervalle de mesure.

Pour réaliser les dilutions, nous utilisons des pools de différents liquides que nous diluons par de l'eau physiologique à 0,85% ou nous partons de liquides très concentrés en leucocytes et/ou hématies que nous diluons ensuite de la même manière. Afin de ne pas réaliser de dilution en cascade qui occasionnerait un biais, chaque dilution est réalisée en partant toujours de la solution initiale de bas ou haut niveau de concentration afin de ne pas biaiser l'expérience. Pour le groupe *Liquide articulaire*, l'ensemble des liquides ou des pools de liquides sont dilués au minimum au 10^{ème} afin de limiter la viscosité des liquides.

Les cupules sont passées successivement sur l'UF4000 en commençant toujours par le point le plus bas de la gamme. Chaque point de la dilution est analysé en triple, la médiane (y) des trois valeurs obtenues pour chaque dilution (x) est calculée pour chaque paramètre d'après le logiciel Excel. Les résultats sont obtenus sous forme de graphique où l'on obtient l'équation de la droite $y = ax + b$ et le coefficient de corrélation (R^2). Le coefficient de corrélation détermine l'intensité d'une relation linéaire entre deux variables quantitatives.

La linéarité est réalisée dans un délai le plus court possible (cadence de 15 échantillons/heure pour l'UF4000). Dès lors le passage d'un bas ou haut niveau de concentration pour chaque paramètre est réalisé en 1h30 minimum.

En *Annexe 9 (page 104)* se trouve un schéma récapitulatif de la linéarité.

D. Contamination

1. Contamination cellulaire

Les essais de contamination cellulaire inter-échantillons ont été effectués pour les leucocytes et les hématies. A la suite du passage d'une cupule sur l'UF4000 en mode STAT, une

moindre quantité d'éléments doit passer dans les cupules successives de ce même mode. Cette expérience a pour but de paramétrer une alarme sur l'UF4000 et/ou de programmer un rinçage supplémentaire pour anticiper ce risque de contamination.

Pour cela, après rinçage de l'appareil, nous avons passé un échantillon à cellularité élevée (Leucocytes / Hématies) trois fois consécutivement suivi d'un échantillon à cellularité basse (Leucocytes / Hématies) trois fois consécutivement aussi. Cette expérience est répétée cinq fois afin d'obtenir une moyenne.

H1 → H2 → H3 → B1 → B2 → B3

Afin de calculer le pourcentage de contamination cellulaire nous appliquons la formule qui suit :

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

Où mH = moyenne de tous les hauts niveaux leucocytes
mB1 = moyenne des bas niveaux leucocytes 1^{ère} valeur mesurée
mB3 = moyenne des bas niveaux leucocytes 3^{ème} valeur mesurée

Nous choisissons de prendre des liquides dans le groupe *Autre liquides* par arguments de fréquence des tubes et de volume suffisant. Nous réalisons des pools de liquides d'ascite et de pleuraux, que nous avons par la suite dilués dans de l'eau physiologique à 0,85% pour être dans les concentrations cibles et à des volumes suffisants.

Chaque essai de contamination s'effectue en deux heures minimum.

En *Annexe 10 (page 105)* se trouve un schéma récapitulatif de la contamination cellulaire.

2. Contamination microbienne

Nous avons réalisé cet essai de contamination microbienne dans le mode STAT BF, comme en condition réelle par passage successif de différentes cupules. Pour cela, nous passons sur l'automate une cupule de liquide avec une forte concentration en bactéries (> 1000 bactéries/μl) suivi de deux cupules contenant respectivement deux échantillons d'eau physiologique à 0,85%. Nous passons ce trio vingt fois de suite soit au total 60 passages.

Parallèlement, pour chaque cupule passée sur l'automate (aussi bien le liquide biologique que les eaux physiologiques), des ensemencements sur géloses sont réalisés afin de vérifier la positivité (liquide biologique) et la stérilité de la culture (eau physiologique). Pour cela, la cupule contenant l'échantillon ou l'eau physiologique est passée sur l'automate puis le reste de l'échantillon estensemencé sur trois géloses différentes avec une ose de 10μl.

Nous choisissons comme liquide biologique analysé, un liquide d'ascite par arguments de fréquence et de volume de liquide disponible. Nous le diluons par de l'eau physiologique à 0,85% pour être dans la concentration cible et voulue en bactérie.

Les cupules sontensemencées sur les milieux suivants : une gélose sang columbia en aérobie, une gélose sang columbia en anaérobie et une gélose sang cuit PVX.

Nous incubons ces géloses dans les étuves ReadA Compact de la WCA BD Kiestra® respectivement en aérobiose, en anaérobiose et sous CO2 pendant 5j à 35°C.

Nous appliquons le même protocole d'incubation que pour un liquide d'ascite de routine soit 5 jours d'incubation. Le module informatique de lecture de la WCA BD®, le ReadA Browser, réalise des photos des cultures à différentes heures de l'incubation. Ces photos de culture seront utilisées par la suite pour compter et comparer les différentes colonies pour les différentes cupulesensemencées.

Nous relevons aussi le nombre de bactéries/µl détecté par l'UF4000 pour chaque passage d'échantillon. Cela permet ainsi de voir la correspondance du résultat du nombre de bactérie/µl de la cupule et le résultat en culture.

Nous avons scindé l'expérience en deux parties (passage de 60 échantillons = 4h). Nous réalisons donc deux manipulations de 2h chacune.

En *Annexe 11 (page 106)* se trouve un schéma récapitulatif de la contamination microbienne.

E. Les incertitudes / les facteurs de variabilité et leur évaluation

Une analyse de risque a été réalisée selon la méthode des 5M. Afin d'analyser les incertitudes et les facteurs de variabilité, nous avons procédé à l'analyse des 5M comme recommandé dans la mise en place d'une vérification de méthode selon le SH GTA 04⁴⁷ du COFRAC.

L'incertitude de mesure a été aussi calculée pour les leucocytes et les hématies dans les deux techniques comparées : manuelle (cellule de KOVA) et automatisée (UF4000) à différentes concentrations. Pour cela, et selon les recommandations du SH GTA 14⁵³ et de Sysmex Scorp®, la méthode « intra-laboratoire CIQ + Matériaux de Référence » du document COFRAC SH GTA 14 a été utilisée. L'évaluation de l'incertitude de mesure des valeurs des leucocytes à différents seuils permettra d'apporter une aide à l'interprétation de la valeur obtenue en méthode manuelle ou automatisée.

Méthode manuelle

L'évaluation de l'intervalle de précision de la mesure est calculée à partir de U. Il est basé sur le calcul des **EEQ de cytologie manuelle** (BP 191 et 192) ayant respectivement 18 et 21 personnes.

Méthode automatisée

L'évaluation de l'intervalle de précision de la mesure est calculée à partir de U. Il est basé sur le calcul des **CIQ haut et bas** utilisés pour le calcul de la reproductibilité.

Formules appliquées

U1 (%) = CV reproductibilité obtenu avec les **CIQ haut et bas / avec les EEQ**

$$U2 (\%) = \frac{\text{biais entre les deux méthodes}(\%)}{\sqrt{3}}$$

$$\text{Biais} (\%) = \frac{(\text{valeur du CIQ obtenue}) - (\text{valeur du CIQ attendue})}{\text{valeur du CIQ attendue}} \times 100$$



$$U(c) (\%) = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2}$$

$$U (\%) = 2U(c)$$

F. Comparaison de méthode

Nous avons réalisé des essais de comparaison de méthode pendant toute la période d'analyse des liquides biologiques : du 17 septembre 2019 au 17 janvier 2020. La comparaison de méthode consiste à évaluer la justesse d'une méthode par rapport à la méthode de référence.

Les essais de comparaison sont effectués sur les trois groupes de liquides : le groupe *LCR*, le groupe *Liquide articulaire* et le groupe *Autres liquides*.

Pour chaque groupe de liquides, nous comparons différents paramètres rendus par l'appareil UF4000 par rapport aux techniques actuelles utilisées au sein du CHU d'Amiens Picardie. Nous comparons donc une méthode automatisée à plusieurs méthodes manuelles.

Les paramètres comparés sont :

- le décompte hématies/leucocytes UF4000 versus cellule de KOVA.
- la formule leucocytaire (% polynucléaires, % cellules mononuclées) UF4000 versus coloration de MGG.
- le décompte de bactérie UF4000 versus résultat coloration de GRAM versus résultat de culture.

Tous les liquides biologiques des trois groupes destinés à la routine ont été analysés sauf les échantillons :

- de volume insuffisant (selon les recommandations du fournisseur).
- contenant des morceaux qui seraient susceptibles de boucher l'aiguille d'aspiration de l'UF4000.

- coagulés ou trop visqueux rendant impossible l'aspiration du prélèvement par l'aiguille de l'UF4000.

Au total, **699 liquides biologiques** ont été analysés sur l'UF4000 : **184 LCR**, **171** liquides articulaires et **344** autres liquides dont 151 liquides d'ascite, 179 liquides pleuraux et 14 liquides péricardiques.

1. Modèles statistiques : Comparaison H/L et %MN/%PN

Afin d'analyser nos données, plusieurs tests et représentations statistiques ont été utilisés :

- test de différence : on cherche à savoir si les différences observées entre les deux méthodes sont statistiquement significatives. Pour cela, avant d'appliquer un test, nous cherchons à savoir si nos échantillons suivent une loi normale. Pour vérifier la normalité de notre échantillon, nous appliquons le **test de Shapiro et Wilk**.
 - si notre échantillon suit une loi normale, nous appliquons le **test t de Student pour les échantillons appariés**.
 - si notre échantillon ne suit pas une loi normale, nous appliquons le **test des rangs signés de Wilcoxon pour les échantillons appariés**.
- tests de concordance : on cherche à savoir si les deux méthodes donnent des résultats concordants.
 - nous utilisons tout d'abord la **droite de régression de Passing Bablok** permettant de savoir s'il existe une relation linéaire entre les deux méthodes (test de linéarité, coefficient de corrélation proche de 1) ainsi que la présence de différences systématiques et proportionnelles.
 - ensuite, nous utilisons classiquement la **représentation de Bland-Altman**⁵² permettant de comparer les moyennes des deux méthodes à leurs différences. Il en est déduit de cette représentation : la moyenne des différences représentant les erreurs systématiques (le biais) des méthodes, l'écart-type des différences, les limites d'agrément permettant de voir les valeurs se trouvant dans cet intervalle, la droite de régression donnant une information sur la tendance des données.

Pour la partie comparaison H/L, l'ensemble de ces tests statistiques sont appliqués à/aux :

- l'ensemble des valeurs
- les valeurs se trouvant dans la zone de linéarité de l'UF4000
- les valeurs se trouvant dans la zone de linéarité ET sans valeurs aberrantes (**test de Grubbs**)

- test logarithmique : meilleure visualisation des différences entre les deux méthodes.

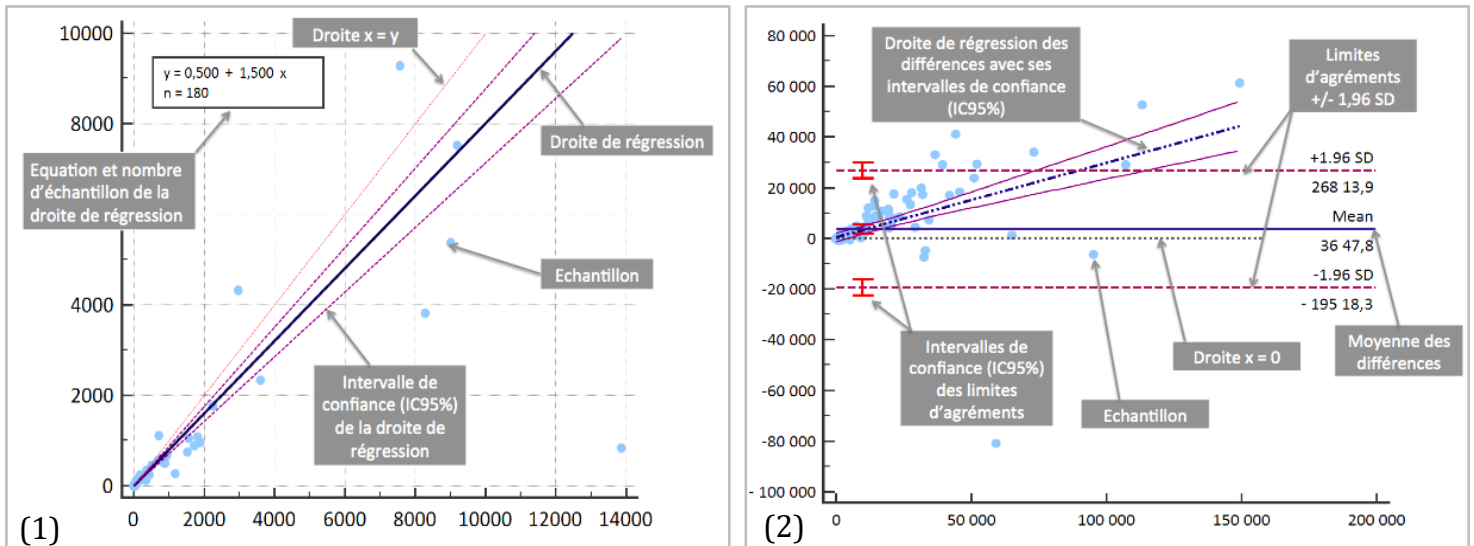


Figure 1 : Représentations de Passing Bablok (1) et de Bland Altman (2)

L'ensemble des tests et représentations statistiques ont été réalisés par le logiciel Medcalc® Version 19.2.0. La représentation logarithmique a été réalisée d'après le logiciel Excel®.

2. Comparaison du décompte leucocytes/hématies (H/L)

Nous utilisons pour méthode de référence, la microscopie optique par la cellule de KOVASLIDE®. Elle est utilisée au laboratoire pour rendre ce décompte hématies / leucocytes pour les liquides biologiques. Les objectifs de cette expérience sont de voir s'il existe une corrélation entre la technique manuelle et la technique automatisée et d'avoir une absence de différence d'interprétation entre les deux décomptes. Ceci pouvant permettre l'utilisation en routine de l'automate pour la numération cellulaire.

Un delta maximum de 10 minutes est réalisé entre les deux techniques afin de limiter la dégradation des éléments et de rendre un résultat le plus juste possible. L'ensemble des échantillons analysés couvrent de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré en routine.

Après le premier décompte de routine rendu par le technicien, le liquide biologique est récupéré dans un délai le plus court possible (< 4h dans la majorité des cas) puis passé sur l'UF4000 en mode STAT BF. L'automate effectue son décompte. Parallèlement, le liquide biologique est analysé en cellule de KOVA à l'aide d'un microscope au grossissement 200 ou 400. L'ensemble des cellules de KOVA est lu par la même personne afin d'éliminer la variabilité inter-opérateur.

Pour le groupe *liquide articulaire*, une dilution au dixième dans de l'eau physiologique à 0,85% est effectuée pour diminuer la viscosité du liquide. Le décompte leucocytes/hématies de l'automate ainsi que celui effectué par la cellule de KOVA a donc été re-multiplié par le facteur de dilution. Les incertitudes du rendu des résultats autour de la valeur du seuil décisionnel sont également analysées.

Parmi les 699 liquides biologiques passés, nous n'avons pris en compte que les liquides ayant des numérations effectuées à la fois en KOVA et à l'UF4000 (**numérations comparables**).

Sont donc exclues, les numérations effectuées :

- en semi-quantitatif à la cellule de KOVA : quand le liquide est hémorragique (>10000 hématies/ μ l) ou purulent (>100000 leucocytes/ μ l).
- en « Numération impossible » à la cellule de KOVA : quand le liquide est hémorragique, purulent ou coagulé.
- en « **** » par l'UF4000 : quand le liquide dépasse la plage d'affichage de l'UF4000.

Ces dernières représentent donc les **numérations non comparables**.

Au total de notre comparaison de méthode H/L après exclusion des numérations non comparables, nous analysons donc :

- pour la comparaison des leucocytes Cellule de KOVA – UF4000 : 632 liquides
- pour la comparaison des hématies Cellule de KOVA – UF4000 : 549 liquides

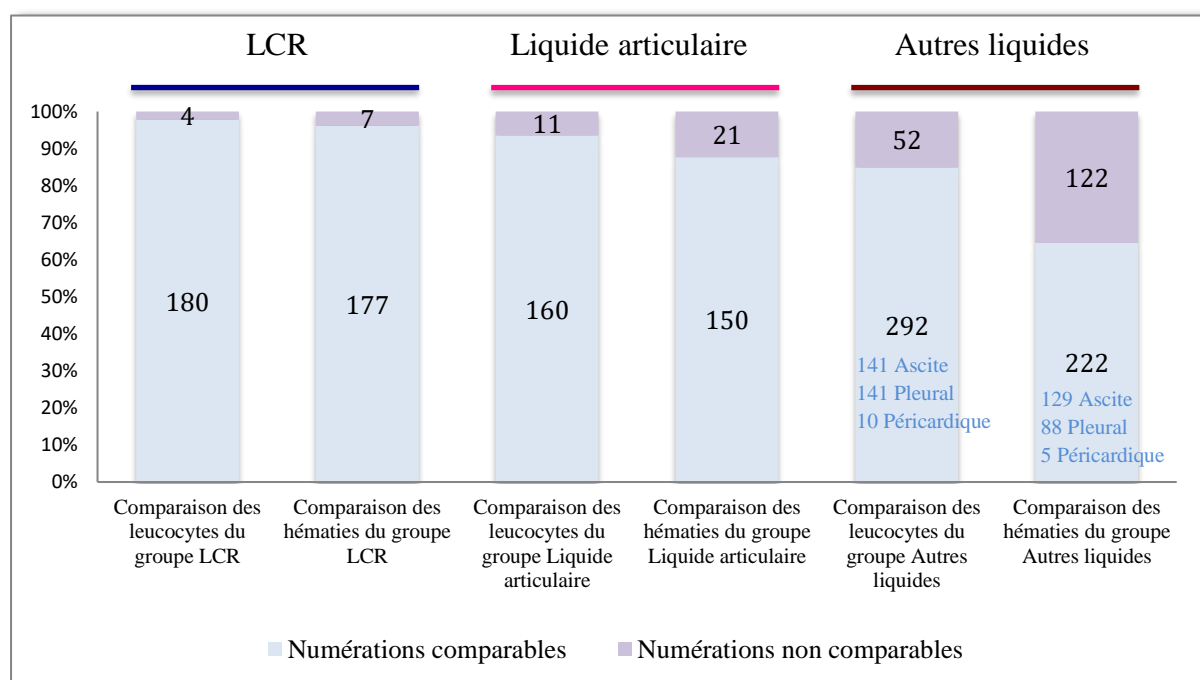


Figure 2 : Nombre de liquides comparables dans le décompte leucocytes / hématies

3. Comparaison de la formule leucocytaire

La formule leucocytaire effectuée par la coloration de MGG avec le Kit RAL® (méthode manuelle) et la formule effectuée par l'UF4000 (méthode automatisée) sont comparées. La formule leucocytaire est rendue sous forme de pourcentage (%) de cellules polynucléées et de pourcentage (%) de cellules mononucléées. Parmi les cellules polynucléées, nous incluons les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires basophiles. Et parmi les cellules mononucléées, nous incluons les lymphocytes et les monocytes.

La formule leucocytaire est effectuée selon le nombre de leucocytes/ μ l trouvés en cellule de KOVA. Si le nombre de leucocytes/ μ l est inférieur au seuil décisionnel, alors la formule leucocytaire est rendue en semi-quantitatif ou n'est pas effectuée (LCR). Si le résultat est supérieur au seuil décisionnel, la formule leucocytaire est alors effectuée. (*Annexe 5 page 94*)

Au total, parmi les 699 liquides biologiques passés sur l'UF4000, nous avons comparé :

- pour le groupe *LCR*, **17** formules leucocytaires.*
- pour le groupe *Liquide articulaire*, **93** formules leucocytaires.*
- pour le groupe *Autres liquides*, **200** formules leucocytaires.*

**Partie Résultats page 50.*

La coloration des lames au MGG a été effectuée lors de la prise en charge de routine du liquide biologique par des techniciens habilités.

Afin de comparer les formules, nous procédons comme suit :

- 1) dans un premier temps, nous comparons la formule rendue par le technicien à celle rendue par l'automate. Entre ces deux formules existent un délai pré-analytique. Si ces deux formules sont concordantes, le résultat est pris en compte pour l'étude et il n'y a pas de deuxième lecture.
- 2) si ces deux formules sont discordantes, la lame est reprise par moi-même pour une deuxième lecture et lue en aveugle. Si ma formule est concordante avec celle de l'UF4000 alors le résultat est pris en compte.
- 3) si ces dernières sont discordantes alors nous analysons ces différences.

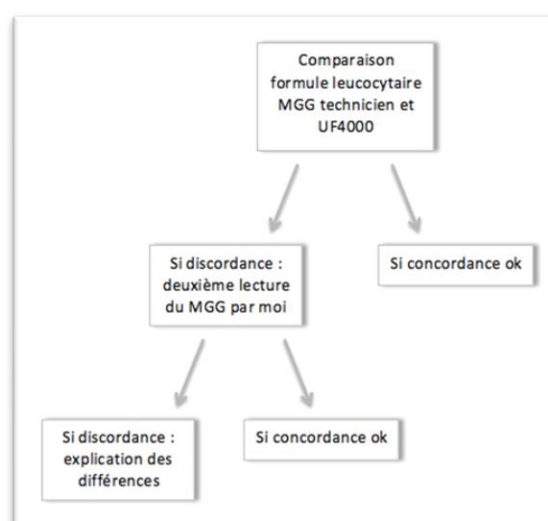
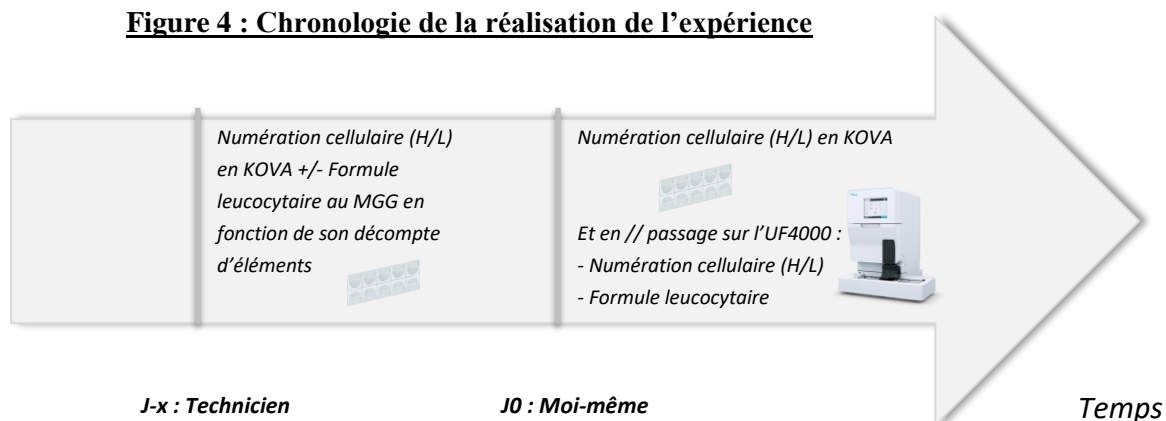


Figure 3 : Algorithme d'étude des formules leucocytaires

Figure 4 : Chronologie de la réalisation de l'expérience



L'objectif de cette expérience est double :

- étudier la corrélation des formules dans les deux techniques : manuelle et automatisée dans le but de remplacer ou de compléter la technique manuelle.
- standardiser les résultats du semi-quantitatif quand le décompte de leucocyte se trouve inférieur au seuil décisionnel.

4. Comparaison des bactéries

Nous comparons le décompte de bactérie/ μ l rendu par l'UF4000 à deux méthodes manuelles : la coloration de GRAM et la culture. Nous étudions également la relation entre le GRAM et la culture.

La coloration de GRAM permet de mettre en évidence la présence de bactéries à l'examen direct. Elle est effectuée par le technicien dans le colorateur Aerospray® lors de la prise en charge du prélèvement de routine. La culture d'un liquide biologique permet de mettre en évidence la bactérie et la réalisation d'un antibiogramme le cas échéant.

La comparaison vise à aboutir à un seuil à partir du ou desquels il y a une forte probabilité d'avoir une coloration de GRAM positive et/ou une culture positive et en deçà duquel il y a peu de probabilité d'avoir un GRAM et une culture positive.

L'automate, l'UF4000, est capable de compter les bactéries dans un liquide biologique et de les classer en deux groupes : les bactéries GRAM + et les bactéries GRAM -. Nous cherchons aussi dans cette partie à étayer la sensibilité de l'automate à distinguer ces deux classes.

Les objectifs de cette expérience sont :

- étudier la corrélation entre le nombre de bactéries à l'UF4000 et le résultat de la coloration de GRAM et de la culture.

- établir un seuil décisionnel en bactéries à l'UF4000 pour chaque groupe de liquide permettant d'aboutir, in fine, à un algorithme décisionnel de prise en charge d'un liquide biologique.
- établir un ou des critère(s) d'alerte(s) de positivité d'un liquide en culture avec le nombre de bactéries à l'UF4000.
- rendre la présence de bactéries dans un liquide biologique de façon plus précoce et de façon plus sensible qu'un GRAM.

Pour rappel, la coloration de GRAM est effectuée normalement pour tous les liquides sauf les LCR où elle n'est réalisée que lorsque le nombre de leucocytes est $>10/\mu\text{l}$. Chaque prélèvement est en outre,ensemencé.

Un résumé du nombre de GRAM et de cultures réalisés parmi les 699 liquides biologiques passés sur l'UF4000 est présenté ci-après.

	LCR	Liquide Articulaire	Autres liquides
GRAM	19*	171	343**
CULTURE	184	171	343**

Tableau 4 : Nombre de liquides analysés pour les bactéries

* *Détails dans la partie Résultats page 57.*

** *Sur 344 Autres liquides, 1 seul liquide n'a pas étéensemencé et donc n'a pas été pris en compte pour cette étude.*

IV. RESULTATS

Toutes les valeurs fournisseur de Sysmex Scorp® sont issues du guide utilisateur UF4000 de Sysmex®.⁴¹

A. Fidélité

1. Répétabilité

Objectif : avoir un *CV expérience* inférieur au *CV fournisseur* ou inférieur à 10% si absence de CV renseigné par le fournisseur.

Les CV fournisseur sont renseignés en *Annexe 12 (page 107)*. Ils sont applicables à tous les liquides biologiques. Sysmex® ne différencie pas les différents liquides biologiques comme dans les expériences qui suivent. De plus, leur seuil de décision clinique n'est pas le même que celui retenu pour notre étude.

a) Leucocytes

Groupe de Liquides	Niveau de concentration en Leucocytes (Unités/μl)	Nombre (N)	Moyenne (unités/μl)	Ecart-type (unités/μl)	CV obtenu (%)	CV fournisseur	Conclusion
LCR	Haut (200L/μl)	15	212,36	20,98	9,88	10%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (10L/μl)	20	12,25	1,66	13,58	15%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (5L/μl)	20	3,39	0,96	28,28	30%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Liquide articulaire	Très haut (10000L/μl)	20	11218,88	244,93	2,18	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Haut (3000L/μl)	20	2766,32	204,90	7,41	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Intermédiaire (200L/μl)	20	177,45	11,03	6,21	10%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (30L/μl)	20	32,79	3,16	9,63	15%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Très bas (2L/μl)	20	2,1	0,80	38,22	30%	CV obtenu > CV fournisseur : ACCEPTABLE
Autres liquides	Très haut (2000L/μl)	20	2090,18	48,79	2,33	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Haut (500L/μl)	20	554,06	20,19	3,64	10%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (100L/μl)	20	87,56	6,08	6,94	15%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (20L/μl)	20	28,89	1,65	5,70	30%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME

Leucocytes : la répétabilité pour les trois groupes de liquides est conforme. Les CV obtenus restent inférieurs aux CV fournisseurs et/ou inférieurs à 10%. Pour les trois groupes de liquides, les CV obtenus ont tendance à augmenter dans les bas niveaux de concentration (<10% dans les hauts niveaux). Dans le groupe *Autres liquides* l'ensemble des CV reste inférieur à 10%. Dans le groupe *Liquide articulaire*, à très bas niveau de concentration, le CV obtenu est supérieur au CV fournisseur : ceci reste acceptable et n'entraîne pas d'impact sur le rendu des résultats et sur le patient puisque notre seuil de *positivité* est de 200 leucocytes/ μ l. => **REPETABILITE DES LEUCOCYTES CONFORME.**

b) Hématies

Groupe de Liquides	Niveau de concentration en Hématies (Unités/ μ l)	Nombre (N)	Moyenne (unités/ μ l)	Ecart-type (unités/ μ l)	CV obtenu (%)	CV fournisseur	Conclusion
LCR	Très haut (3000H/ μ l)	20	2804,78	158,60	5,65	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Haut (200H/ μ l)	15	196,24	23,03	11,74	30%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (50H/ μ l)	20	60,10	6,84	11,39	40%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (20H/ μ l)	20	25,09	4,36	17,38	50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Liquide articulaire	Très haut (30000H/ μ l)	20	37607,86	6711,11	17,85	Pas de CV fournisseur	CV obtenu > 10% : ACCEPTABLE
	Haut (500H/ μ l)	20	457,77	20,14	4,40	30%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (40H/ μ l)	20	40,88	6,11	14,95	40%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (10H/ μ l)	20	7,94	2,36	29,74	50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Autres liquides	Très haut (63000H/ μ l)	20	64579,38	1109,72	1,72	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Haut (4000H/ μ l)	20	4563,18	120,67	2,64	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Intermédiaire (100H/ μ l)	20	78,68	6,88	8,75	30%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (30H/ μ l)	20	36,77	6,94	18,88	40%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME

Hématies : la répétabilité pour les trois groupes de liquides est conforme. Les CV obtenus restent inférieurs aux CV fournisseurs et/ou inférieurs à 10%. Tout comme les leucocytes, les CV obtenus ont tendance à augmenter dans les bas niveaux de concentrations. Pour le groupe *Liquide articulaire*, le CV obtenu avec le très haut niveau de concentration n'est pas conforme mais acceptable. A cette concentration, le résultat sera rendu « supérieur à », il n'y aura donc pas d'impact clinique pour le patient. => **REPETABILITE DES HEMATIES CONFORME.**

c) **Bactéries**

Groupe de Liquides	Niveau de concentration en Bactéries (Unités/ μ l)	Nombre (N)	Moyenne (unités/ μ l)	Ecart-type (unités/ μ l)	CV obtenu (%)	CV fournisseur	Conclusion
LCR	Très haut (3000B/ μ l)	15	2228,11	842,91	37,83	Pas de CV fournisseur	CV obtenu > 10% : ACCEPTABLE
	Haut (100B/ μ l)	20	41,64	3,65	8,76	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (20B/ μ l)	20	20,74	3,28	15,81	Entre 20% et 50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (5B/ μ l)	20	3,54	1,25	35,43	50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Liquide articulaire	Très haut (99000B/ μ l)	20	95656,96	3101,87	3,24	Pas de CV fournisseur	CV obtenu < 10% : CONFORME
	Haut (300B/ μ l)	20	275,43	11,43	4,15	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (100B/ μ l)	20	85,39	7,09	8,30	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (20B/ μ l)	20	18,69	4,62	24,73	Entre 20% et 50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Très bas (5B/ μ l)	20	5,00	1,62	32,38	50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Autres liquides	Très haut (800B/ μ l)	20	814,24	82,66	10,15	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Haut (100B/ μ l)	20	73,47	6,24	8,49	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Intermédiaire (20B/ μ l)	20	28,11	4,33	15,39	Entre 20% et 50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
	Bas (5B/ μ l)	20	6,06	1,78	29,39	50%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME

Bactéries : la répétabilité pour les trois groupes de liquides est conforme. Les CV obtenus restent inférieurs aux CV fournisseurs et/ou inférieurs à 10%. Les CV obtenus ont tendance à augmenter dans les concentrations extrêmes (très hautes ou très basses). Pour le groupe *LCR*, le CV obtenu à très haut niveau de concentration est non conforme mais reste acceptable malgré une concentration en bactéries se trouvant dans la gamme de linéarité signalée par le fournisseur. En effet, il est observé une dégradation des éléments au cours de l'expérience, la concentration en bactérie initiale se divisant par plus de la moitié au cours du temps. Ce phénomène de dégradation des bactéries n'est pas observé avec les autres liquides biologiques. La répétabilité à ce niveau de concentration n'a pu être refaite faute de LCR en quantité suffisante et disponible pour cette expérience. => **REPETABILITE DES BACTERIES CONFORME.**

2. Reproductibilité / Fidélité intermédiaire

Objectif : avoir un *CV expérience* inférieur au *CV fournisseur*. Les CV fournisseur sont renseignés en *Annexe 12 (page 107)*.

	Nombre de passages (N)	Moyenne (unités/ μ l)	Ecart-type (unités/ μ l)	CV obtenu (%)	CV fournisseur	Conclusion
Niveau Bas UK0067						
Leucocytes (40/ μ l)	105	41,2	3,03	7,3	15%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Hématies (40/ μ l)	105	38,6	2,69	6,9	40%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Bactéries (200/ μ l)	105	201,6	15,29	7,5	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Niveau Haut UK0067						
Leucocytes (800/ μ l)	103	793,9	23,40	2,9	10%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Hématies (200/ μ l)	103	205	6,47	3,1	30%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME
Bactéries (800/ μ l)	103	811,8	39,05	4,8	20%	CV obtenu < CV fournisseur : CONFORME

Les CV obtenus pour les niveaux bas et haut sont inférieurs aux CV fournisseurs et sont tous inférieurs à 10%. La fidélité intermédiaire est conforme et est très satisfaisante.

B. Etendue de mesure

1. Limite de détection (LD)

Objectif : vérifier la limite de détection fournie par Sysmex® : avoir une *LD expérience* inférieure et en concordance avec celle fournie par le fournisseur.

	LD expérience $LD = 3s(y_{\text{blanc}})$	LD fournisseur = Limite du blanc
Leucocytes	0,26/ μ l	1/ μ l
Hématies	2,54/ μ l	2/ μ l
Bactéries	0,44/ μ l	1/ μ l

Les limites de détection obtenues sont inférieures à celle fournies par le fournisseur à part celle des hématies où l'on dépasse de 0,54/ μ l. Les valeurs inférieures à cette limite n'ont pas de signification biologique. Elles seront traduites comme « inférieur à la limite de détection ». Nous prendrons donc les LD expérimentales comme limite.

2. Limite de quantification (LQ)

Objectif : vérifier la limite de quantification fournie par Sysmex® : Avoir une *LQ expérience* inférieure et/ou en concordance avec celle donnée par le fournisseur.

	LQ expérimentale (technique des dilutions)	LQ expérience LQ = 10s(y _{blanc})	LQ fournisseur	Choix de la LQ
Leucocytes	1,23 < LQ < 5,22/μl	0,86/μl	2/μl	2/μl
Hématies	2,98 < LQ < 14,65/μl	8,48/μl	15/μl	10/μl
Bactéries	4,53/μl	1,46/μl	5/μl	5/μl

La limite de quantification calculée par la formule est plus précise que celle expérimentale.

Pour les trois paramètres, les deux techniques sont en concordance avec celle du fournisseur :

- **pour les leucocytes**, la LQ calculée ne se trouve pas dans l'intervalle de celle expérimentale. La valeur fournisseur se trouvant dans l'intervalle expérimental, nous retenons la valeur du fournisseur comme limite de quantification.
- **pour les hématies**, la LQ calculée se trouve dans l'intervalle de celle expérimentale. La valeur fournisseur étant supérieure à celle expérimentale et calculée, nous retiendrons un seuil de 10 hématies comme limite de quantification.
- **pour les bactéries**, la LQ expérimentale est en concordance avec celle du fournisseur. Celle calculée est beaucoup moins importante. Nous retiendrons la valeur fournisseur par mesure de précaution.

3. Linéarité

Objectif : avoir une linéarité dans le domaine d'analyse : avoir un coefficient de corrélation (R^2) de la droite proche de 1 et en concordance avec celui renseigné par le fournisseur.

	Domaine de linéarité / de mesure	Coefficient de corrélation R^2
Leucocytes		
Valeurs Fournisseur	2 à 10000/μl	0,9983
LCR	0 à 100/μl	0,9837
Liquide articulaire	0 à 1000/μl	0,9928
	1000 à 10000/μl	0,9984
	0 à 10000/μl	0,9986
Autres liquides	0 à 1000/μl	0,9996
	1000 à 10000/μl	0,9999
	0 à 10000/μl	0,9999
Hématies		
Valeurs Fournisseur	15 à 99999/μl	0,9998
LCR	0 à 1000/μl	0,9991
	1000 à 10000/μl	0,9976
	0 à 10000/μl	0,9983
Liquide articulaire	0 à 1000/μl	0,9973
	1000 à 10000/μl	0,9989
	0 à 10000/μl	0,9978
Autres liquides	0 à 1000/μl	0,9999
	1000 à 10000/μl	0,9998
	0 à 10000/μl	0,9998
Bactéries		
Valeurs Fournisseur	5 à 10000/μl	0,9991
	Non vérifiée	

Les valeurs de tous les coefficients de corrélation sont proches de 1 aussi bien pour les leucocytes que pour les hématies.

Leucocytes

L'ensemble des coefficients de corrélation obtenus sont proches de celui renseigné pour le fournisseur et proches de 1. La linéarité obtenue pour les deux groupes *Liquide Articulaire* et *Autres liquides* est même meilleure que celle donnée par le fournisseur. Pour ces deux groupes de liquides, la linéarité est conforme et fiable pour les leucocytes de 0 à 10000/ μ l.

Pour la linéarité du groupe *LCR*, on observe un écart de 0,01 expliqué par la faible gamme de dilution réalisée de 0 à 100 Leucocytes/ μ l lors de l'expérience. Nous ne pouvons qu'affirmer que la linéarité est conforme et fiable jusque 100 leucocytes/ μ l. Au-delà de 100 leucocytes/ μ l, aucune conclusion ne peut être effectuée même si la linéarité pour les autres groupes est excellente. Pour les analyses de routine, nous considérerons que la quantification des leucocytes sera linéaire de 2 (limite de quantification) à 10000/ μ l leucocytes quel que soit la nature du liquide biologique. Au-delà de 10000/ μ l leucocytes, nous diluerons dans de l'eau physiologique à 0,85% afin de pouvoir être dans la zone de linéarité.

Par la suite, une vérification de la linéarité au-delà de 10000 leucocytes / μ l avec un liquide pleural a été vérifiée ($R^2 = 0,9959$). La linéarité est satisfaisante même au-delà de cette limite fournisseur. En outre, seulement 14 liquides sur l'ensemble des liquides testés disposaient d'une numération >10000/ μ l leucocytes (14/699 = 2%). Par précaution et manque d'analyses supplémentaires, nous nous tiendrons à cette limite fournisseur de 10000 leucocytes / μ l.

Hématies

L'ensemble des coefficients de corrélation obtenus sont proches de celui renseigné pour le fournisseur et proches de 1. La linéarité obtenue pour les deux groupes *LCR* et *Liquide articulaire* est légèrement moins proche de 1 que celle du fournisseur mais reste très satisfaisante. La linéarité du groupe *Autres liquides* est la même que celle du fournisseur. Pour les trois groupes de liquides, la linéarité est donc conforme et fiable pour les hématies de 0 à 10000/ μ l.

Par ailleurs, le fournisseur va plus loin en affirmant que la linéarité pour les hématies est valable jusque 99999 hématies/ μ l. Nous n'avons pas montré cette linéarité (de 10000 à 99999 hématies/ μ l) par absence de différence dans le rendu du résultat.

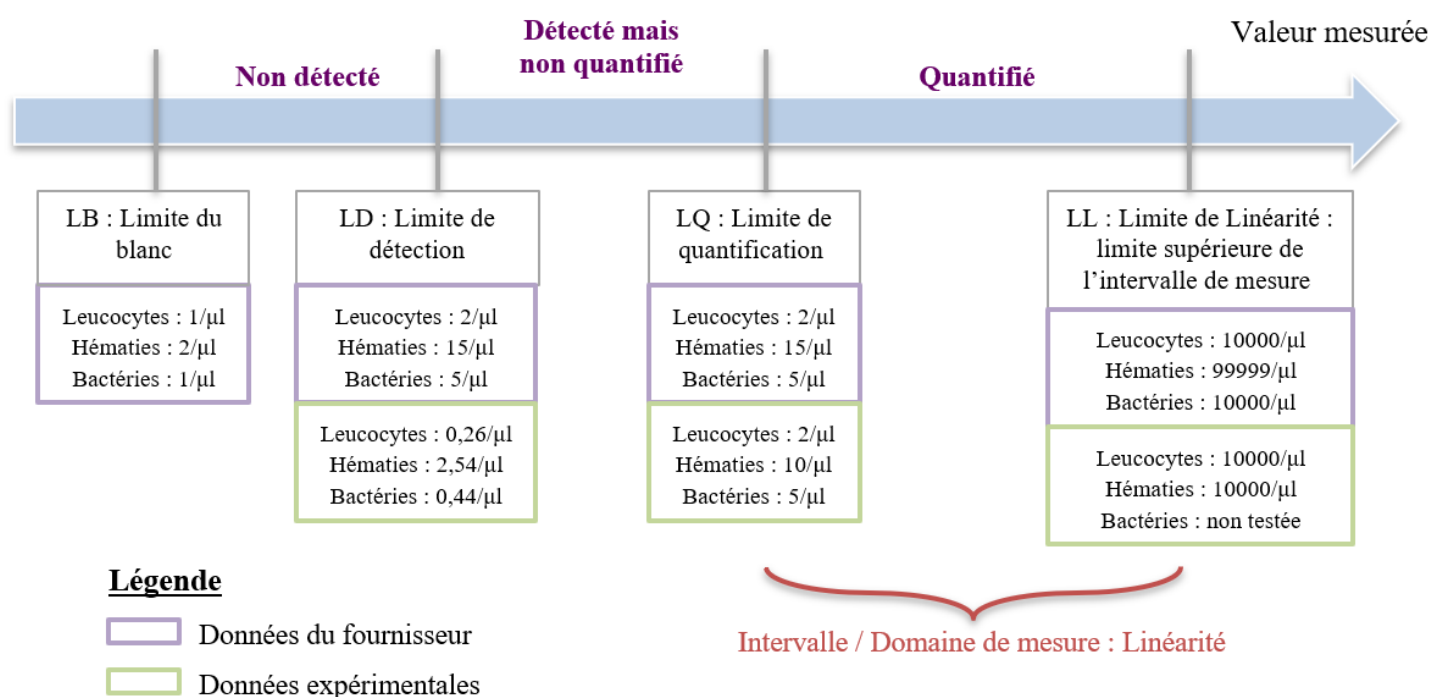
Pour les analyses de routine, nous considérerons que les hématies seront linéaires de 10 (limite de quantification choisie) à 10000/ μ l hématies. Au-delà de 10000/ μ l hématies, nous

considérerons que le prélèvement est hémorragique et, dans ce cas, nous rendrons le résultat en semi-quantitatif >10000/ μ l hématies.

Bactéries

Nous n'avons pas réalisé d'étude de la linéarité sur les bactéries, nous prendrons pour les analyses de routine les données du fournisseur (linéarité de 5 à 10000/ μ l bactéries).

4. Conclusion sur l'étendue de mesure



Lors du rendu des résultats en routine, il faut prendre garde à la plage d'affichage. L'UF4000 peut rendre des concentrations pouvant ne pas se trouver dans le domaine de linéarité (*Annexe 12 (page 107)*).

C. Contamination

1. Contamination cellulaire

Objectif : avoir une contamination cellulaire en concordance avec celle renseignée par le fournisseur et/ou inférieure à celle du fournisseur.

	Pourcentage (%) de contamination	Condition d'analyse
Leucocytes		
Valeurs fournisseur	0,05% ou moins	Echantillon à 10000 L/ μ l
Résultat obtenu	0,035%	
	Inférieure à celle du fournisseur : CONFORME	
Hématies		
Valeurs fournisseur	0,005% ou moins	Echantillon à 99999 H/ μ l
Résultat obtenu	0,00546% soit 0,006% par arrondi	
	Limite supérieure à celle du fournisseur : ACCEPTABLE	

En *Annexe 13 (page 108)*, se trouve le détail des calculs effectués.

Pour les leucocytes, le résultat de contamination cellulaire est inférieur à la contamination exprimée par le fournisseur. Le résultat est donc conforme.

Pour les hématies, le résultat de contamination obtenu est légèrement supérieur à la contamination exprimée par le fournisseur si le résultat est arrondi. Le résultat est acceptable car négligeable : à la suite du passage d'un échantillon contenant plus de 10000 hématies/ μ l, environ 1 hématie de cet échantillon est susceptible de passer dans l'échantillon qui suit. Ceci est totalement négligeable et n'a pas d'impact clinique.

2. Contamination microbienne

Objectifs :

- avoir une contamination microbienne en concordance avec celle renseignée par le fournisseur
- avoir une concentration en bactéries sur l'UF40000 des eaux physiologiques inférieure à la limite de quantification du fournisseur
- ne pas avoir de cultures positives des eaux physiologiques

RESULTATS CONTAMINATION MICROBIENNE			
Nombre d'échantillons	60 passages : 1 liquide biologique suivi de 2 eaux physiologiques répété 20 fois		
Bactéries à l'UF4000	Liquide biologique N = 20	TOUS POSITIFS	De 2361 à 7290 bactéries/ μ l
	Eaux physiologiques N = 40	TOUS NEGATIFS	De 0 à 0,8 bactéries/ μ l
Culture	Liquide biologique N = 20	TOUTES POSITIVES	Nombreuses colonies en culture
	Eaux physiologiques N = 40	TOUTES NEGATIVES Sauf 4	Pas de bactéries en culture sauf 4 géloses contenant 1 seule colonie

En Annexe 14 (page 108), se trouve quelques images des résultats.

L'ensemble des géloses ensemencées avec le liquide biologique sont positives en culture et ont une concentration en bactéries supérieure à 2000/μl sur l'UF4000.

L'ensemble des géloses ensemencées avec l'eau physiologique sont négatives en culture (sauf quatre d'entre elles présentant une seule colonie) et ont une concentration en bactéries inférieure ou égale à 0,8/μl sur l'UF4000. Cette concentration étant inférieure à la limite de quantification des bactéries du fournisseur (5 Bactéries/μl), ce résultat est donc considéré comme égal à 0 bactéries/μl. Il n'y a donc pas de contamination microbienne inter-échantillons dans le mode liquide biologique jusque 7000 bactéries/μl.

Par la suite, et pour vérification, nous avons réalisé un essai de contamination avec plus de 10000 bactéries/μl. Les cultures sont négatives et les décomptes de bactéries à l'UF4000 restent inférieurs à la limite de quantification.







Nous concluons donc qu'il n'y a pas de contamination microbienne inter-échantillons dans le mode liquide biologique jusque 10000 bactéries/μl. Au-delà de 10000 bactéries/μl, nous préconisons un rinçage supplémentaire. En routine, les échantillons peuvent donc être passés en 1^{er} sur l'appareil pour effectuer le décompte cellulaire puis être ensemencés par la suite de façon manuelle ou automatisée.

D. Evaluation de l'incertitude de mesure

Objectif : connaître l'incertitude de mesure (IM) de la technique manuelle (KOVA) et de la technique automatisée (UF4000).

	Incertitude bas niveau de concentration	Incertitude niveau intermédiaire de concentration	Incertitude haut niveau de concentration
Leucocytes			
Automate : UF4000	Pour 40 leucocytes/μl U(%) = 15 %	-	Pour 800 leucocytes/μl U(%) = 6 %
Manuel : Cellule de KOVA	Pour 7 leucocytes/μl U(%) = 88,78 %	Pour 35 leucocytes/μl U(%) = 56,86 %	Pour 375 leucocytes/μl U(%) = 58,38 %
Hématies			
Automate : UF4000	Pour 40 hématies/μl U(%) = 14,38 %	-	Pour 800 hématies/μl U(%) = 6,84 %
Manuel : Cellule de KOVA	Pour 25 hématies/μl U(%) = 72,76 %	-	Pour 260 hématies/μl U(%) = 44,76 %

Cas des leucocytes

	Incertitude de mesure (L/ μ l) Seuil à 10 leucocytes/ μ l	Incertitude de mesure (L/ μ l) Seuil à 100 leucocytes/ μ l	Incertitude de mesure (L/ μ l) Seuil à 200 leucocytes/ μ l
LCR	8,5  11,5 IM = 15 %		
	1,1  18,9 IM = 89 %		
Liquide articulaire			IM = 15 % 170  230
			IM = 58 % 84  316
Autres liquides		85  115 IM = 15 %	
		43  157 IM = 57 %	

Légende

 IM de l'UF4000
 IM de la KOVA

L'incertitude de mesure de l'automate est beaucoup moins importante que celle obtenue par la cellule de KOVA. Il est important de connaître l'incertitude de mesure pour l'interprétation de la comparaison de méthode des leucocytes pour les valeurs seuils.

E. Comparaison de méthode

1. Comparaison leucocytes/hématies

Rappel : dans cette partie, nous évoquons le domaine de linéarité pour chaque groupe de liquides. Ce domaine de linéarité est celui de l'automate et non pas celui de la KOVA.

Domaine de linéarité des leucocytes : 2 à 10000 leucocytes/ μ l

Domaine de linéarité des hématies : 15 à 99999 hématies/ μ l

Les valeurs des leucocytes dans le domaine de linéarité pour le groupe *Liquide articulaire* peuvent aller jusque 100000/ μ l : les résultats utilisés ont été re-multipliés par le facteur de dilution. En réalité, lors du passage sur l'automate, ils étaient dans la gamme de linéarité.

Pour les hématies, seules les études avec les tests statistiques ont été réalisées. Aucun seuil n'est admis pour la significativité des hématies dans les liquides biologiques.

a) Résultats des tests statistiques pour les 3 groupes de liquides

L'ensemble des données brutes et des représentations (Passing Bablok, Bland Altman et logarithmique) sont représentées en *Annexes 15 à 20 (pages 109 à 114)*.

Résumé des tests statistiques pour les trois groupes de liquides dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes

	LCR	Liquide articulaire	Autres liquides
Leucocytes			
Biais / Erreur systématique entre les deux méthodes ?	Oui léger de 1,82 leucocytes/μl La cellule de KOVA compte légèrement plus de leucocytes que l'UF4000.	Oui : biais de 3574 leucocytes/μl La cellule de KOVA compte plus de leucocytes que l'UF4000. Ce biais est sans conséquences : il est observé dans les hautes valeurs en leucocytes.	Oui : biais de 310 leucocytes/μl La cellule de KOVA compte plus de leucocytes que l'UF4000. Ce biais est sans conséquences : il est observé dans les valeurs hautes.
Erreur proportionnelle entre les deux méthodes ?	Oui : plus les valeurs des leucocytes augmentent, plus la différence des mesures entre les deux méthodes augmente.	Oui : plus les valeurs des leucocytes augmentent, plus la différence des mesures entre les deux méthodes augmente.	Oui : plus les valeurs des leucocytes augmentent, plus la différence des mesures entre les deux méthodes augmente.
Relation linéaire ?	Oui moyenne R = 0,51	Oui forte R = 0,97	Oui forte R = 0,94
Nombre de points en dehors des limites d'agrément	N = 2 → Sans impact clinique → Supérieur au seuil décisionnel	N = 8 → Sans impact clinique → Supérieur au seuil décisionnel	N = 10 → Sans impact clinique → Supérieur à 1000 leucocytes/ μ l
Hématies			
Biais / Erreur systématique entre les deux méthodes ?	Oui : biais de 251 hématies/μl La cellule de KOVA compte plus d'hématies que l'UF4000.	Oui : biais de 3130 hématies/μl La cellule de KOVA compte plus d'hématies que l'UF4000.	Oui : biais de 490 hématies/μl La cellule de KOVA compte plus d'hématies que l'UF4000.
Erreur proportionnelle entre les deux méthodes ?	Oui : plus les valeurs des hématies augmentent, plus la différence des mesures entre les deux méthodes augmente.	Oui : plus les valeurs des hématies augmentent, plus la différence des mesures entre les deux méthodes augmente.	Oui : plus les valeurs des hématies augmentent, plus la différence des mesures entre les deux méthodes augmente.
Relation linéaire ?	Oui forte R = 0,97	Oui forte R = 0,91	Oui forte R = 0,96
Nombre de points en dehors des limites d'agrément	N = 3 → Sans impact clinique	N = 4 → Sans impact clinique	N = 11 → Sans impact clinique

b) Concordances / Discordances pour les leucocytes

(1) LCR

- Tableau de concordance (N = 180)

Nous regardons la concordance entre le dénombrement des leucocytes par l'UF4000 et la cellule de KOVA (seuil décisionnel à 10 leucocytes/ μ l).

Automate UF4000				Total
Microscope Cellule de KOVA		Négatif leucocytes <10/ μ l	Positif leucocytes >10/ μ l	
	Négatif leucocytes <10/ μ l	156	6	162
	Positif leucocytes >10/ μ l	1	17	18
Total		157	23	180

Taux de discordance : **3,9%**
Taux de concordance : **96,1%**
Taux de concordance Fournisseur : 80%
Faux négatif : 1
Faux positifs : 6

Il y a donc une très bonne concordance entre les deux méthodes. Le taux de concordance obtenu est supérieur à celui notifié par le fournisseur. Afin de connaître l'impact clinique de ces 7 discordances, nous relevons pour chaque discordance le résultat de la culture et des interférences possibles pouvant expliquer ces différences.

- Etude des discordances pour les leucocytes - Impact clinique (N = 7)

Parmi les **6 faux positifs**, 5 d'entre eux contenaient beaucoup d'hématies (>300 hématies/ μ l) pouvant sous-estimer le décompte des leucocytes à la KOVA et 1 d'entre eux contenait des débris pouvant gêner le décompte des leucocytes à la KOVA ou gêner l'UF4000 dans sa distinction débris/leucocytes.

Seul **un faux négatif** a été retrouvé : il y a peu de différence en leucocytes entre les deux méthodes (12/ μ l en KOVA et 7/ μ l à l'UF4000). On est autour de la valeur du seuil.

Toutes les cultures sont restées négatives, il n'y a donc pas d'impact sur le patient.

- Tableau de concordance autour de la valeur du seuil de 10 leucocytes/ μ l

Limite de sélection : 6 à 17 éléments/ μ l par l'UF4000 (N = 20 (11% de l'échantillon)).

Automate UF4000				Total
Microscope Cellule de KOVA		Négatif leucocytes <10/ μ l	Positif leucocytes >10/ μ l	
	Négatif leucocytes <10/ μ l	9	6	15
	Positif leucocytes >10/ μ l	1	4	5
Total		10	10	20

Taux de discordance : **35%**
Taux de concordance : **75%**
Faux négatif : 1
Faux positifs : 6

Les échantillons discordants sont les mêmes que ceux précisés précédemment. Il n'y a pas d'impact clinique.

En conclusion, une concordance de 96,1% est observée entre les deux méthodes. Cette concordance diminue pour les valeurs proches du seuil. Toutes les discordances peuvent être expliquées. Il y a donc une bonne corrélation dans le décompte des leucocytes pour le LCR

entre la méthode manuelle (KOVA) et la méthode automatisée (UF4000). La comparaison est donc conforme.

(2) Liquide articulaire

- Tableau de concordance (N = 160)

Nous regardons la concordance entre le dénombrement des leucocytes par l'UF4000 et la cellule de KOVA (seuil décisionnel à 200 leucocytes/ μ l).

Automate UF4000				Total
Microscope Cellule de KOVA		Négatif leucocytes <200/ μ l	Positif leucocytes >200/ μ l	
	Négatif leucocytes <200/ μ l	40	5	45
	Positif leucocytes >200/ μ l	3	112	115
Total		43	117	160

Taux de discordance : 5%
Taux de concordance : 95%
Taux de concordance Fournisseur : 80%
Faux négatifs : 3
Faux positifs : 5

Il y a donc une bonne concordance entre les deux méthodes. Le taux de concordance obtenu est supérieur à celui notifié par le fournisseur. Afin de connaître l'impact clinique de ces 8 discordances, nous relevons pour chaque discordance les résultats de culture et interférences possibles pouvant expliquer ces différences.

- Etude des discordances pour les leucocytes - Impact clinique (N = 8)

Pour **3 échantillons**, la présence de nombreuses hématies à la KOVA (>10000 hématies/ μ l) semble avoir un impact sur le rendu des leucocytes : le décompte de leucocytes à la KOVA est plus approximatif. De plus pour un de ces 3 échantillons, le deuxième décompte réalisé 25 minutes plus tôt par le technicien est en accord avec le résultat de l'UF4000.

Pour **3 autres échantillons**, la présence de débris en KOVA et la présence de cristaux à l'état frais semblent légèrement interférer dans le décompte des leucocytes. Sur 2 de ces échantillons, le décompte technicien 7h et 3h plus tôt respectivement est en accord avec le résultat de la KOVA : la présence de débris et/ou de cristaux semblerait interférer avec le rendu du résultat de l'automate. Par contre, pour 1 de ces échantillons, le deuxième décompte réalisé 1j et 4h30 plus tôt par le technicien est en concordance avec le décompte automate.

Pour **2 échantillons**, il n'y a pas de différence, le résultat se trouvant au seuil.

En conclusion, il n'y a pas eu d'impact clinique de ces différences : l'ensemble des cultures est resté négatif et nous sommes loin des seuils de significativité pour les arthrites septiques.

- Tableau de concordance autour de la valeur du seuil de 200 leucocytes/ μ l

Limite de sélection : 160 à 270 éléments/ μ l par l'UF4000 (N = 12 (7,5% de l'échantillon)).

Automate UF4000				Total
Microscope Cellule de KOVA		Négatif leucocytes <200/ μ l	Positif leucocytes >200/ μ l	
	Négatif leucocytes <200/ μ l	3	2	5
	Positif leucocytes >200/ μ l	2	5	7
Total		5	7	12

Taux de discordance : **33%**

Taux de concordance : **67%**

Faux négatifs : 2

Faux positifs : 2

Les 4 échantillons discordants n'ont pas d'impact clinique comme expliqué précédemment.

En conclusion, une concordance de 95% est observée entre les deux méthodes. Cette concordance diminue pour les valeurs proches du seuil. Toutes les discordances peuvent être expliquées. Il y a donc une bonne corrélation dans le décompte des leucocytes pour le liquide articulaire entre la méthode manuelle (KOVA) et la méthode automatisée (UF4000). La comparaison est donc conforme.

(3) Autres liquides

- Tableau de concordance (N = 292)

Nous regardons la concordance entre le dénombrement des leucocytes par l'UF4000 et la cellule de KOVA (seuil décisionnel à 100 leucocytes/ μ l).

Automate UF4000				Total
Microscope Cellule de KOVA		Négatif leucocytes <100/ μ l	Positif leucocytes >100/ μ l	
	Négatif leucocytes <100/ μ l	60	7	67
	Positif leucocytes >100/ μ l	20	205	225
Total		80	212	292

Taux de discordance : **9,2%**

Taux de concordance : **90,8%**

Taux de concordance Fournisseur : 80%

Faux négatifs : 20

Faux positifs : 7

Il y a donc une bonne concordance entre les deux méthodes. Le taux obtenu est supérieur à celui notifié par le fournisseur. Afin de connaître l'impact clinique de ces 27 discordances, nous relevons pour chaque discordance les résultats de culture et interférences possibles pouvant expliquer ces différences.

- Etude des discordances pour les leucocytes - Impact clinique (N = 27)

Pour **7 échantillons**, la présence de nombreuses hématies à la KOVA (>1000 hématies/ μ l) peut être une explication quant à l'imprécision du décompte réalisé par la méthode manuelle.

Pour **4 échantillons**, aucune interférence n'a été retrouvée hormis peut-être une erreur de lecture à la cellule de KOVA. Le deuxième décompte venant appuyer cette hypothèse : leur résultat est similaire à celui rendu par l'UF4000.

Pour les **autres échantillons**, il n'y a pas de différences majeures. L'ensemble des discordances se trouvent dans les valeurs proches du seuil de 100 leucocytes/ μ l. Le décompte technicien venant souvent appuyer l'erreur de lecture ou l'imprécision de lecture de la cellule de KOVA (retrouvée aussi dans la partie liquide articulaire). En effet, la plupart des décomptes de leucocytes réalisés par les techniciens sont en concordances avec le résultat de l'UF4000. Ceci étant, aucun impact clinique n'a été relevé puisque l'ensemble des cultures est resté négatif.

- Tableau de concordance autour de la valeur du seuil de 100 leucocytes/ μ l

Limite de sélection : 80 à 150 éléments/ μ l par l'UF4000 (N = 56).

	Automate UF4000			Total
		Négatif leucocytes <100/ μ l	Positif leucocytes >100/ μ l	
Microscope Cellule de KOVA	Négatif leucocytes <100/ μ l	9	4	13
	Positif leucocytes >100/ μ l	10	33	43
Total		19	37	56

Taux de discordance : **26,8%**

Taux de concordance : **73,2%**

Faux négatifs : 10

Faux positifs : 4

Les échantillons discordants n'ont pas d'impact clinique comme expliqué précédemment.

En conclusion, une concordance de 90,8% est observée entre les deux méthodes. Cette concordance diminue pour les valeurs proches du seuil. Toutes les discordances peuvent être expliquées. Il y a donc une bonne corrélation dans le décompte des leucocytes pour le groupe Autres liquides entre la méthode manuelle (KOVA) et la méthode automatisée (UF4000). La comparaison est donc conforme.

2. Comparaison %PN / %MN de la formule leucocytaire

a) Résultats des tests statistiques pour les 3 groupes de liquides

L'ensemble des données brutes et des représentations (Passing Bablok et Bland Altman) sont représentées en *Annexes 21, 22, 23 (pages 115 à 117)*.

Résumé des tests statistiques pour les trois groupes de liquides

	LCR	Liquide articulaire	Autres liquides
Biais / Erreur systématique entre les deux méthodes ?	Oui : biais de 20% L'UF4000 compte plus de %PN que la KOVA.	Oui : biais de 6% environ L'UF4000 compte plus de %PN que la KOVA.	Oui : biais de 16% environ L'UF4000 compte plus de %PN que la KOVA.
Erreur proportionnelle entre les deux méthodes ?	Oui	Oui	Oui
Relation linéaire ?	Oui moyenne : R = 0,57	Oui forte : R = 0,81	Non : R = 0,57
Nombre de points en dehors des limites d'agrément	N = 1	N = 7	Nombreux

b) *Concordances / Discordances pour les formules leucocytaires*

(1) LCR

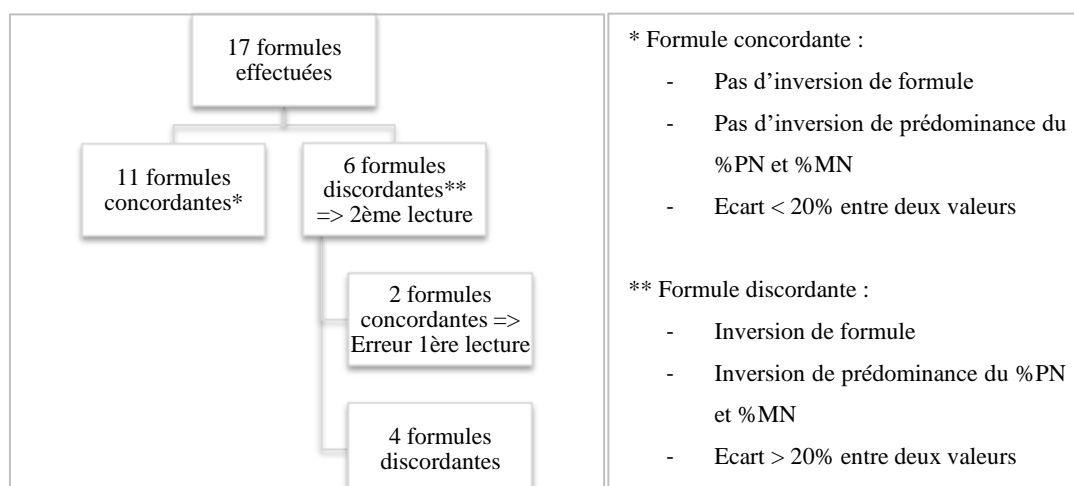
- Choix des échantillons : Explication des formules leucocytaires réalisées

N total du groupe LCR = 184		
N = 162 < 10 leucocytes/μl à la cellule de KOVA*	N = 3	Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 10 leucocytes/μl ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl
	N = 159	Formules non effectuées / lames non réalisées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 10 leucocytes/μl
N = 18 > 10 leucocytes/μl à la cellule de KOVA*	N = 14	Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 10 leucocytes/μl
	N = 4	Formules non effectuées / lames non réalisées : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 10 leucocytes/μl ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl pour 3 des 4 échantillons
N = 4 Numération leucocytaire impossible*		Formules non effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Liquide trop hémorragique pour rendre une formule leucocytaire en manuel ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl

* Lecture en KOVA par moi-même en parallèle du passage sur l'UF4000

En conclusion, nous comparons **17 formules** pour le groupe LCR.

- Etude des concordances



Taux de concordance des formules à la 1^{ère} lecture : **64,7%**

Taux de concordance des formules à la 2^{ème} lecture : **76,5%**

- Etude des formules discordances – Impact clinique (N = 4)

Pour **1 échantillon**, les deux lectures du MGG en manuel montrent une prédominance de cellules mononuclées contrairement à l'UF4000 qui donne une formule panachée. Le prélèvement n'est pas hémorragique. La culture est néanmoins restée négative.

Pour les **3 autres échantillons**, les deux lectures du MGG en manuel montrent une prédominance de cellules mononuclées et l'UF4000 montre une prédominance de cellules polynuclées. Il y a inversion de formule. Parmi ces 3 échantillons, un seul était hémorragique : la formule leucocytaire sanguine a été relevée, on y retrouve 86% PN et 14% MN. Toutes les cultures sont restées négatives sauf pour un des 3 échantillons qui était positif à *Staphylococcus aureus*. La formule prédominée par les cellules polynuclées seraient plus concordante en cas d'infection du LCR.

En conclusion, une concordance de 76,5% est observée entre les deux méthodes. Les discordances pourraient être expliquées par une mauvaise différenciation des nuages. Il y a une bonne corrélation entre la méthode manuelle (MGG) et la méthode automatisée (UF4000).

(2) Liquide articulaire

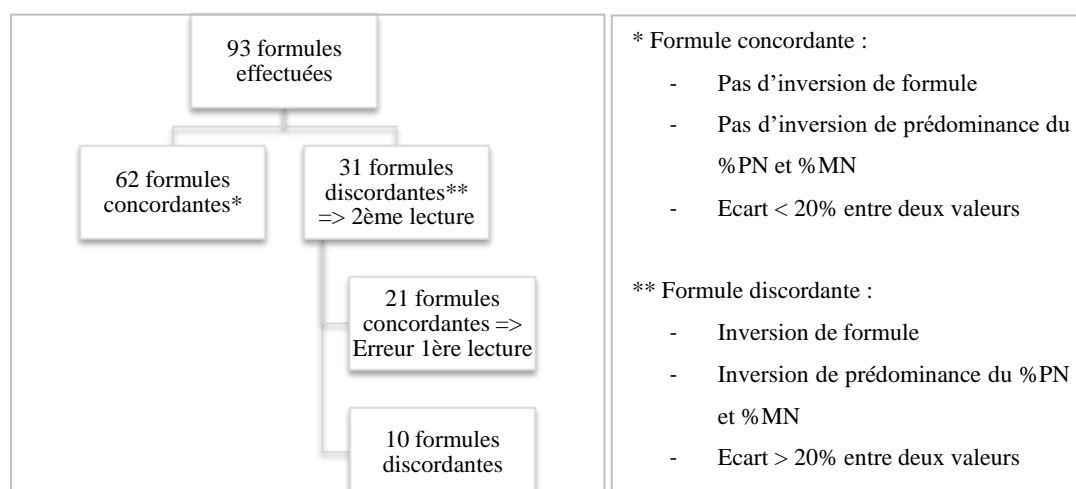
- Choix des échantillons : Explication des formules leucocytaires réalisées

N total du groupe <i>Liquide articulaire</i> = 171		
N = 44 < 200 leucocytes/ μ l à la cellule de KOVA*	N = 12	Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ N = 6 décomptes leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 200 leucocytes/μl ▪ N = 6 décomptes leucocytes en KOVA par le technicien en routine et par l'UF4000 < 200 leucocytes/μl : ces formules n'auraient donc pas dû être effectuées
	N = 31	Formules non effectuées , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 200 leucocytes/μl
	N = 1	Formule non effectuée , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Formules impossibles en KOVA par le technicien en routine (trop hémorragique)
N = 116 > 200 leucocytes/ μ l à la cellule de KOVA*	N = 81	Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 200 leucocytes/μl
	N = 35	Formules non effectuées , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ N = 5 décomptes leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 200 leucocytes/μl ▪ N = 30 formules impossibles en KOVA par le technicien en routine (trop hémorragiques)
N = 11 Numération leucocytaire impossible*		Formules non effectuées , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Liquide trop hémorragique pour rendre une formule leucocytaire

* Lecture en KOVA par moi-même en parallèle du passage sur l'UF4000

En conclusion, nous comparons **93 formules** pour le groupe *Liquide Articulaire*.

- Etude des concordances



Taux de concordance des formules à la 1^{ère} lecture : **66,7%**

Taux de concordance des formules à la 2^{ème} lecture : **89,2%**

- Etude des formules discordances – Impact clinique (N = 10)

Parmi les 10 discordances sont relevées :

- **3 différences majeures par inversion de formule (%PN > 80% à l'UF4000)**. Les deux lectures du MGG mettent en évidence une prédominance de cellules mononuclées et l'UF4000 montre l'inverse. Il n'est pas montré de causes évidentes pour ces discordances. Les hématies ne semblent pas être en cause puisque ces discordances s'observent avec des échantillons contenant de 0 à 7900 hématies/ μ l. Pour le prélèvement hémorragique, la formule leucocytaire sanguine montre une prédominance de cellules polynuclées. L'analyse anatomopathologique des liquides articulaires est en accord avec celle de l'UF4000 pour 2/3 des échantillons. Les cultures sont toutes négatives.
- **1 différence majeure par inversion de formule (%PN > 80% au MGG)**. Les deux formules réalisées au MGG montrent une prédominance de cellules polynuclées tandis que l'UF4000 met en évidence plus de cellules mononuclées. L'échantillon n'est pas hémorragique et la culture est négative. L'analyse anatomopathologique n'a pas été réalisée, il est donc impossible de conclure sur la formule la plus juste.
- **3 différences mineures (formule panachée – prédominance d'un %)**. Les deux lectures du MGG mettent en évidence une formule panachée tandis que l'UF4000 montre une formule à prédominance large de cellules polynuclées. Les échantillons ne

sont pas hémorragiques et la culture est négative. L'analyse anatomopathologique des liquides articulaires est en accord avec celle de l'UF4000 pour 2/3 des échantillons.

- **3 différences mineures (Ecart de % >20% entre les deux méthodes).**

Pour 2/3 des échantillons, les formules des deux méthodes montrent la même prédominance de cellules polynuclées mais avec des écarts > 20%. Ces différences ne relèvent pas d'erreurs majeures. Pour le premier de ces 2 échantillons, le liquide n'est pas hémorragique et la culture reste négative. Son analyse anatomopathologique montre une prédominance de cellules polynuclées en concordance avec le pourcentage donné par l'UF4000. Pour le deuxième de ces 2 échantillons, le liquide est hémorragique et sa culture est positive après enrichissement à *Staphylococcus aureus*. Son analyse anatomopathologique n'a pas été effectuée.

Pour 1/3 des échantillons, la formule des deux méthodes montre la même prédominance de cellules mononuclées avec un écart de pourcentage. Le MGG décèle plus de cellules mononuclées que l'UF4000. L'échantillon n'est pas hémorragique et la culture reste négative. L'analyse anatomopathologique montre une réaction lymphocytaire abondante, ce qui est en concordance plutôt avec la formule des MGG.

La plupart des discordances peuvent être expliquées et l'analyse cytologique d'anatomopathologie permet de souvent confirmer la formule rendue par l'UF4000 sauf dans deux cas.

En conclusion, une concordance de 89,2% est observée entre les deux méthodes. Les discordances peuvent être expliquées. Il y a une bonne corrélation entre la méthode manuelle (MGG) et la méthode automatisée (UF4000). La comparaison est donc satisfaisante.

(3) Autres liquides

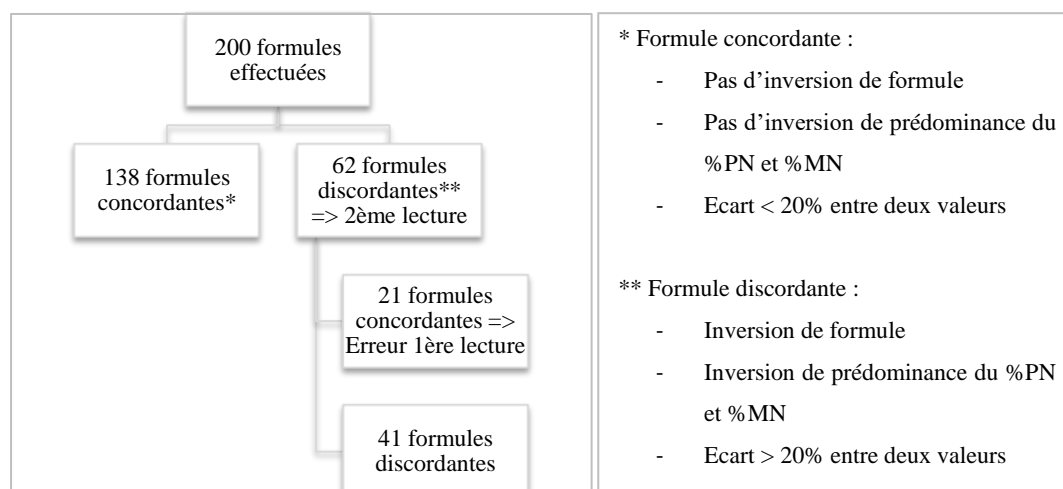
• Choix des échantillons : Explication des formules leucocytaires réalisées

N total du groupe <i>Autres liquides</i> = 344	
N = 67 < 100 leucocytes/μl à la cellule de KOVA*	N = 21 Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> N = 11 décomptes leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 100 leucocytes/μl N = 10 décomptes leucocytes en KOVA par le technicien en routine et par l'UF4000 < 100 leucocytes/μl : ces formules n'auraient donc pas dû être effectuées
	N = 46 Formules non effectuées , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 100 leucocytes/μl
N = 225 > 100 leucocytes/μl à la cellule de KOVA*	N = 169 Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 100 leucocytes/μl
	N = 56 Formules non effectuées , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> N = 14 décomptes leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 100 leucocytes/μl N = 42 formules impossibles en KOVA par le technicien en routine (trop hémorragiques)
N = 52 Numération leucocytaire impossible*	N = 10 Formules effectuées car : <ul style="list-style-type: none"> Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 100 leucocytes/μl
	N = 42 Formules non effectuées , résultat rendu en semi-quantitatif car : <ul style="list-style-type: none"> Liquide trop hémorragique pour rendre une formule leucocytaire

* Lecture en KOVA par moi-même en parallèle du passage sur l'UF4000

En conclusion, nous comparons **200 formules** pour le groupe *Autres liquides*.

- Etude des concordances



Taux de concordance des formules à la 1^{ère} lecture : **69%**

Taux de concordance des formules à la 2^{ème} lecture : **79,5%**

- Etude des formules discordances – Impact clinique (N = 41)

Parmi les différences, sont relevées :

- **27 différences majeures par inversion de formule (% PN > 80% à l'UF4000).** Les deux lectures du MGG montrent une prédominance de cellules mononuclées et l'UF4000 montre complètement l'inverse avec une large prédominance de cellules polynuclées (>80%) :
 - cette inversion de formule s'observe pour des valeurs en leucocytes <1000/ μ l.
 - la plupart des formules sanguines en rapport avec les liquides hémorragiques montrent physiologiquement une prédominance de cellules polynuclées.
 - les formules des 4 liquides réalisées en hématologie confortent le résultat de la formule manuelle (MGG).
 - seule une culture positive à *Pseudomonas aeruginosa* a été retrouvée. Ce résultat serait en concordance avec la formule de l'UF4000 prédominée par les cellules polynuclées.
- **6 différences majeures par inversion de formule (% PN < 80% à l'UF4000).** L'UF4000 rend un résultat inverse de la formule réalisée au MGG mais avec un pourcentage de PN < 80%. Les mêmes observations peuvent être émises que celles-ci-dessus. Une seule culture positive a été retrouvée à *Escherichia coli* : là aussi la

formule de l'UF4000 à prédominance de cellules polynuclées serait plus en concordance avec une culture positive.

- **2 différences mineures (formule panachée – prédominance d'un %).** L'UF4000 rend une formule panachée contre une légère prédominance d'un pourcentage au MGG et vice-versa. Ces 2 différences s'observent aussi pour les valeurs faibles en leucocytes. Ils sont tous les deux hémorragiques. Les cultures restent tout de même négatives. Ce ne sont pas de différences majeures.
- **6 différences mineures (Ecart de % >20% entre les deux méthodes).** Les deux méthodes montrent la même prédominance mais avec un léger écart. Ces différences n'ont pas d'impact clinique. Ces échantillons sont dans la plupart des cas hémorragiques. Une seule culture positive à *Streptococcus sp* est observée. Les deux formules montrant une prédominance de cellules polynuclées, aucun impact clinique n'est relevé.

Il est donc observé 20,1% de formules discordantes. Aucune explication n'a été retrouvée chez les patients. L'étude des diagrammes de dispersion montrent que les deux nuages de points, correspondant aux % PN et % MN, ne sont pas bien différenciés.

En conclusion, une concordance de 79,5% est observée entre les deux méthodes. Les discordances ne peuvent pas toutes être expliquées. La corrélation entre la méthode manuelle (MGG) et la méthode automatisée (UF4000) n'atteint pas l'objectif attendu.

c) Etude des résultats semi-quantitatifs pour le groupe Liquide articulaire et Autres liquides

Le groupe LCR n'est pas concerné par cette étude. En effet, il n'y a pas de rendu de résultat en semi-quantitatif dans cette étude.

Liquide articulaire

Nombre de résultats en semi-quantitatif : 77
Taux de concordance* entre le résultat en semi-quantitatif et la formule de l'UF4000 : **55,8%**

Autres liquides

Nombre de résultats en semi-quantitatif : 144
Taux de concordance* entre le résultat en semi-quantitatif et la formule de l'UF4000 : **47,9%**

* Concordance :

- Formule donnant le même rapport de prédominance de %MN ou de %PN
- Pas d'inversion de formule

Pour les deux groupes, la moitié des résultats rendus ne sont pas en corrélation avec ceux de l'UF4000.

3. Comparaison des bactéries

a) LCR

- Choix des échantillons : explication des GRAM réalisés

N total du groupe LCR = 184		
N = 162 < 10 leucocytes/ μ l à la cellule de KOVA*	N = 3	GRAM effectués car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 10 leucocytes/μl ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl
	N = 159	GRAM non effectués / lames non réalisées car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 10 leucocytes/μl
N = 18 > 10 leucocytes/ μ l à la cellule de KOVA*	N = 14	GRAM effectués car : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine > 10 leucocytes/μl
	N = 4	GRAM non effectués / lames non réalisées : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Décompte leucocytes en KOVA par le technicien en routine < 10 leucocytes/μl ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl pour 3 des 4 échantillons
N = 4 Numération leucocytaire impossible*	N = 2	GRAM effectués : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Formules impossibles en KOVA par le technicien en routine (trop hémorragiques) ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl
	N = 2	GRAM non effectués : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Formules impossibles en KOVA par le technicien en routine (trop hémorragiques) ▪ Décompte leucocytes par l'UF4000 > 10 leucocytes/μl

* Lecture en KOVA par moi-même en parallèle du passage sur l'UF4000

En conclusion, nous comparons **19 GRAM** et **184 cultures** pour le groupe LCR.

Parmi les 184 échantillons :

- 150 d'entre eux ont moins de 5 bactéries/ μ l (**81,5%** de notre échantillon) :
 - 5 GRAM effectués => négatifs
 - 150 cultures effectués => négatives
- 34 d'entre eux ont plus de 5 bactéries/ μ l (**18,5%** de notre échantillon)

Nous choisissons de ne présenter sous forme de tableau que les échantillons présentant plus de 5 bactéries/ μ l (limite de quantification du fournisseur). Notre tableau se résume donc à 34 échantillons (N = 34).

Tableau 5 : Tableau des bactéries pour le LCR

Numéro de prélèvement	Bactéries UF4000 par ordre croissant	Résultat du GRAM	Résultat de la culture	GB KOVA mon décompte	GB UF4000	Formule MGG vérifiée par moi-même		Formule UF4000		ASPECT / COULEUR
						%PN	%MN	%PN	%MN	
149	5	NR*	Négative	4	9	non faite		10	90	clair
150	5	NR*	Négative	1	5	non faite		85	15	clair
168	5	NR*	Négative	1	5	non faite		21	79	clair
98	5,3	NR*	Négative	10	12	non faite		10	90	hématique
173	5,3	NR*	Négative	2	0	non faite		0	100	clair
88	6	R : PDB**	Négative	6	15	5	95	100	0	hématique
42	6,1	NR*	Négative	1	9	non faite		84	16	rosé
56	6,1	NR*	Négative	1	3	non faite		50	50	clair + débris KOVA
36	6,5	NR*	Négative	0	3	non faite		0	100	clair
26	7,3	NR*	Négative	1	4	non faite		53	47	clair
106	7,3	NR*	Négative	1	4	non faite		39	61	clair
14	7,7	NR*	Négative	2	4	non faite		56	44	rosé
25	7,7	NR*	Négative	2	4	non faite		0	100	clair
80	8,5	R : PDB**	Négative	36	56	31	69	97	3	clair
159	9	NR*	Négative	3	4	non faite		0	100	clair
111	9,4	NR*	Négative	1	3	non faite		0	100	clair
164	10	NR*	Négative	1	3	non faite		42	58	légèrement jaune
133	13	R : PDB**	Négative	111	97	80	20	97	3	jaunâtre
75	16	NR*	Positive : <i>Staphylococcus epidermidis</i> après enrichissement	0	6	non faite		56	44	rosé
123	17	NR*	Négative	14	29	non faite		97	3	rosé
17	21	NR*	Négative	imp	116	non faite		99	1	hémorragique
19	23	NR*	Négative	imp	22	non faite		73	27	hématique
148	26	R : PDB**	Négative	5	10	75	25	98	2	rosé
121	29	R : PDB**	Négative	130	79	28	72	39	61	trouble léger
45	32	R : PDB**	Négative	200	420	89	11	99,5	0,5	hémorragique
79	34	NR*	Négative	10	17	non faite		97	3	hématique
107	48	Réalisé : Très nombreux CG+ en amas	Positive : Assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>	100	87	22	78	98	2	trouble léger
154	54	R : PDB**	Négative	imp	50	non faite		99	1	hemorragique
103	67	Réalisé : Nombreux CG+ en diplocoques	Négative avec commentaire "patient sous antibiotique"	3960	899	90	10	91	9	trouble
30	87	R : PDB**	Négative	480	405	90	10	99,6	0,4	hémorragique
118	153	R : PDB**	Négative	IMP	103	non faite		46	54	hemorragique
85	1380	R : PDB**	Négative	4410	2616	95	5	89	11	trouble
78	3770	Réalisé : Rares CG+	Positive : Assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>	140	230	2	98	10	90	trouble
68	18750	R : PDB**	Positive : Rares <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1890	1321	89	11	92	8	orange + trouble

Seuil de 10 bactéries/ μ l

*NR : Non réalisé

**R : PDB : Réalisé : Pas de bactéries

- Comparaison : Bactéries à l'UF4000 – GRAM

Plus le nombre de bactérie augmente à l'UF4000, plus la fréquence de réalisation des GRAM est importante et plus leur positivité est fréquente :

Pour les 3 GRAM positifs (**en orange**) : l'UF4000 rend respectivement 48, 67 et 3770 bactéries/ μ l.

→ Grande hétérogénéité du nombre de bactéries par rapport au GRAM.

→ Décompte semi-quantitatif des CG+ visualisés au GRAM ne correspond pas au décompte de bactéries à l'UF4000 (ex : très nombreux CG+ au GRAM pour un décompte à l'UF4000 de 48 bactéries/μl).

Pour les autres GRAM effectués et revenus négatifs à la lecture (**en rose**), l'UF4000 rend jusqu'à 18750 bactéries/μl avec une culture positive.

→ Grande hétérogénéité du nombre de bactéries par rapport au GRAM.

La corrélation GRAM – Bactéries à l'UF4000 n'est pas évidente. Nous utiliserons la culture pour permettre de mieux évaluer la corrélation.

Comparaison : GRAM – Culture (N = 19)

	GRAM		Total
	Négatif	Positif	
Culture			
Négatif	15	1	16
Positif	1	2	3
Total	16	3	19

Sensibilité = 66,7%
 Spécificité = 93,8%
 VPP = 66,7%
 VPN = 93,8%

La sensibilité de la coloration de GRAM n'est pas très bonne mais la VPN est excellente. L'échantillonnage est également faible.

Seulement 3 GRAM ont été rendus positifs (**en orange**) : sur ces 3 GRAM, 2 sont rendus positifs en culture (échantillons **107** et **78 en violet**) et 1 négatif en culture (échantillon **103 en violet**) mais accompagné d'un commentaire biologiste alertant que le patient était sous antibiothérapie et donc que la culture était de façon normale, négative.

Sur les 16 GRAM négatifs (**en rose**), 1 seule culture est positive à rares *Pseudomonas aeruginosa* (échantillon **68**). Le manque de sensibilité du GRAM pourrait être une explication.

Sur les 4 cultures positives (**en violet**), 1 d'entre elle avait un GRAM négatif (échantillon **68**) ; l'autre n'a pas eu de GRAM (<10 leucocytes/μl : échantillon **75**). La positivité de cette dernière culture peut être remise en question : cette culture étant positive à un Staphylocoque à coagulase négative et obtenue après enrichissement est sûrement due à une contamination du bouillon d'enrichissement ou lors du prélèvement.

- Comparaison : Bactéries à l'UF4000 – Culture

Pour les 4 cultures positives (**en violet**), le nombre de bactéries/μl à l'UF4000 est de minimum 16. Si l'on considère la culture de l'échantillon **75** comme une contamination, le nombre de bactéries/μl à l'UF4000 pour une culture positive est de minimum 48 bactéries/μl.

Pour les 180 cultures négatives, l'UF4000 compte jusque 1380 bactéries/ μ l. Là aussi on observe une grande hétérogénéité du nombre de bactéries à l'UF4000.

Avec ces données, nous essayons d'établir un seuil de significativité en bactéries dans le LCR par rapport à la culture. Les objectifs de ce seuil :

- avoir le moins de faux négatif possible => avoir une bonne sensibilité mais tout en gardant une spécificité convenable.
- avoir une bonne valeur prédictive négative => pour exclure un LCR négatif.
- avoir une meilleure sensibilité et VPN que le GRAM dans le but de positionner l'UF4000 en 1^{ère} place dans la prise en charge des LCR.

Etude des différents seuils

	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Seuil de 5 bactéries/μl	100%	83,3%	11,8%	100%
Seuil de 10 bactéries/μl	100%	92,2%	22,2%	100%
Seuil de 20 bactéries/μl	75%	94,4%	23,1%	99,4%

Le seuil de 10 bactéries/ μ l semble être un bon compromis entre la sensibilité, la spécificité et la VPN. Les résultats sont meilleurs que ceux obtenus avec la coloration de GRAM.

Le seuil de 20 bactéries/ μ l aurait été aussi un bon compromis, la culture du faux négatif résultant sûrement d'une contamination. Pour étayer le diagnostic d'infection bactérienne, la présence ou non de bactéries n'est pas suffisante. Il faut prêter attention à deux autres paramètres : les leucocytes et la formule leucocytaire.

L'interprétation de l'ensemble de ces trois éléments permettront d'étayer le diagnostic.

- Leucocytes – Bactéries à l'UF4000

D'après le tableau, nous voyons qu'à partir de 10 bactéries/ μ l, l'ensemble des échantillons sauf 2 (échantillons **164** et **75**) ont un décompte de leucocytes à l'UF4000 > 10/ μ l (**en bleu**). Ceci conforte l'idée d'un seuil à 10 bactéries/ μ l.

A l'inverse, un échantillon >10 leucocytes/ μ l (obtenu à la KOVA ou à l'UF4000) n'a pas forcément des bactéries >10/ μ l. Sur 24 décomptes leucocytaires >10/ μ l à la KOVA ou à l'UF4000, 50% ont moins de 10 bactéries/ μ l et 50% ont plus de 10 bactéries/ μ l.

L'interprétation des deux paramètres en même temps (leucocytes / bactéries à l'UF4000) est donc nécessaire.

- Formule leucocytaire – Bactéries à l'UF4000

Plus le nombre de bactéries augmente, plus les formules leucocytaires sont prédominées par des cellules polynuclées (**en vert**). Ce qui serait en concordance avec une infection bactérienne du LCR.

Dans le tableau, nous remarquons également que beaucoup de LCR avec un décompte de bactéries $>10/\mu\text{l}$ et un décompte de leucocytes $>10/\mu\text{l}$ n'ont pas eu de formule réalisée en manuel pour cause de prélèvement hémorragique ou autre cause. L'UF4000 lui a été capable de réaliser ces formules et l'ensemble de ces formules montrent une prédominance de cellules polynuclées.

L'idée d'un seuil de 10 bactéries/ μl est donc en concordance avec les tendances des formules leucocytaires.

- Contexte clinique

Le contexte clinique et thérapeutique des patients aux LCR présentant plus de 10 bactéries à l'UF4000/ μl (N = 18) a été examiné.

Nous observons que :

- **44%** (N = 8) des LCR >10 leucocytes/ μl avec prédominance de cellules polynuclées et des cultures négatives étaient issus de patients ayant une antibiothérapie antérieure à la ponction de LCR. Ces LCR avaient tous une hyperprotéinorachie.
- **22%** (N = 4) des LCR sont positifs à des virus (VZV, HHV6, Enterovirus) avec une prédominance de cellules polynuclées à la formule.
- **17%** (N = 3) des LCR ont une méningite bactérienne. Les deux LCR positifs à *Staphylococcus aureus* avaient une biochimie du LCR normale. Le LCR positif à *Pseudomonas aeruginosa* avait une hyperprotéinorachie.
- **17%** (N = 3) des LCR n'ont pas d'étiologie retrouvée mais avaient un nombre de leucocytes légèrement $<10/\mu\text{l}$. Deux étaient issus d'un même patient avec suspicion d'hydrocéphalie, aucun examen biochimique n'a été effectué sur ces 2 LCR.

Le dernier LCR venait d'un patient en état de mal épileptique. La PCR multiplex réalisée était négative. Ce LCR présentait une légère hyperprotéinorachie à 0,98 g/l.

- Diagrammes de dispersion des 4 cultures positives

Les diagrammes sont présentés en *Annexe 25 (page 118)*. A partir de 1000 bactéries/ μl , le diagramme de dispersion des bactéries peut s'observer. Une concordance culture –

diagramme de dispersion est observée : il dévie vers le haut pour les bactéries GRAM + et dévie vers le bas pour les bactéries GRAM –.

En conclusion, pour l'interprétation du nombre de bactéries du LCR à l'UF4000, le nombre de leucocytes initial, la formule leucocytaire, le nombre de bactéries et la clinique du patient doivent être pris en compte. Le seuil de *bactériorachie* de 10 bactéries/ μl semble être le meilleur compromis.

b) *Liquide articulaire*

Tous les liquides ont été dilués au 1/10^{ème}. Les chiffres de décompte des bactéries présentés dans cette partie, correspondent donc au résultat du liquide dilué.

Parmi les 171 liquides articulaires :

- 12 d'entre eux possédaient moins de 5 bactéries/ μl : les 12 GRAM et cultures étaient négatifs.
- 159 d'entre eux ont plus de 5 bactéries/ μl (limite de quantification).

- Comparaison : Bactéries à l'UF4000 – GRAM

Parmi les 171 liquides articulaires, ont été visualisés :

- 8 GRAM positifs à CG+ : le 1^{er} GRAM positif s'observe à partir de 122 bactéries/ μl à l'UF4000. Les résultats de l'UF4000 vont jusqu'à 27357 bactéries/ μl .
- 163 GRAM négatifs : le décompte de bactéries à l'UF4000 s'étend de 1,2 à 3394 bactéries/ μl .

Comme pour le groupe *LCR*, plus le nombre de bactéries augmente à l'UF4000, plus la fréquence de positivité des GRAM est importante. De plus, tous les GRAM étaient positifs avec des CG+ et pourtant l'appellation semi-quantitative des CG+ visualisés au GRAM ne correspond pas au décompte de bactéries à l'UF4000.

La corrélation GRAM – Bactéries à l'UF4000 n'est pas évidente et concordante. La culture sera utilisée comme méthode de référence pour permettre une meilleure comparaison.

- Comparaison : GRAM – Culture (N = 171)

	GRAM		Total	
	Négatif	Positif		
Culture	Négatif	156	0	156
	Positif	7	8	15
Total		163	8	171

Sensibilité = 53,3%

Spécificité = 100%

VPP = 100%

VPN = 95,7%

La sensibilité du GRAM n'est que de 53,3% pour notre étude. Par contre, la spécificité est très bonne.

D'après le tableau ci-dessus, 15 cultures sont revenues positives sur les 171 échantillons analysés. Sur les 8 GRAM positifs, tous sont revenus positifs en culture. Par contre, 7 cultures positives avaient un GRAM négatif. Les cultures étaient positives aussi bien à des bactéries GRAM + et GRAM -.

- Comparaison : Bactéries à l'UF4000 – Culture

Sur les 171 cultures effectuées, 15 cultures sont revenues positives. Le nombre de bactéries/μl à l'UF4000 est de minimum 10,2 et s'étend jusque 27357 bactéries/μl. Pour les 156 cultures négatives, le nombre de bactéries/μl à l'UF4000 varie de 1,2 à 3394 bactéries/μl. Il y a donc une grande hétérogénéité des valeurs à l'UF4000 pour les cultures rendues négatives et/ou positives.

Avec ces données, nous essayons d'établir un seuil de significativité en bactéries dans le liquide articulaire par rapport à la culture. Les objectifs sont les mêmes que ceux du groupe LCR.

Etude des différents seuils

	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Seuil de 10 bactéries/μl	100 %	13,5 %	10 %	100 %
Seuil de 30 bactéries/μl	93,3 %	49,4 %	15,1 %	98,7 %
Seuil de 50 bactéries/μl	80 %	60,9 %	16,4 %	96,9 %
Seuil de 100 bactéries/μl	80 %	77,6 %	25,6 %	97,6 %

Il est impossible de conclure quant à un seuil de significativité des bactéries. En prenant, par exemple, un seuil de 100 bactéries/μl, 20% des échantillons sont susceptibles d'avoir une culture positive. Si nous prenons, par ailleurs, un seuil de 10 bactéries/μl comme le groupe LCR, nous ne passerons jamais à côté d'une culture positive mais la présence de bactéries ne voudra, en aucun cas, prédire la positivité de la culture. D'autant plus que la fréquence d'un décompte > 10 bactéries/μl est assez courante pour les liquides articulaires (150/171 = 88%). La présence ou non de bactéries n'est pas suffisante pour établir un seuil. Il faut prêter attention à deux autres paramètres : les leucocytes et la formule leucocytaire. L'interprétation de l'ensemble de ces trois éléments permettrait d'étayer un diagnostic infectieux.

- Leucocytes – Bactéries à l'UF4000

D'après nos données, nous observons qu'à partir de 30 bactéries/μl, l'ensemble des échantillons ont un décompte de leucocytes supérieur à 200/μl en prenant en compte la dilution (N = 93/171) c'est-à-dire environ **54%**. Par contre, **42%** des liquides ayant moins de 30 bactéries/μl ont aussi des leucocytes > 200/μl.

De nombreuses cultures positives ont des disparités en termes de décompte de leucocytes et de bactéries. Il est par exemple observé :

- une culture positive à quelques Staphylocoques à coagulase négative pour un décompte de leucocytes à 300/ μ l et un décompte de bactéries à 10,2/ μ l.
- et une culture positive à très rares quelques Staphylocoques à coagulase négative pour un décompte de leucocytes à 20000/ μ l et un décompte de bactéries à 2933/ μ l.

Il est donc difficile de conclure même en associant le nombre de bactérie et les leucocytes.

- Formule leucocytaire – Bactéries à l'UF4000

D'après nos données, on observe que plus le nombre de bactéries à l'UF4000 augmente, plus la tendance de la formule leucocytaire est en faveur d'une prédominance de cellules polynuclées.

Si nous prenons, par exemple, le seuil de 30 bactéries/ μ l, **79%** des formules sont prédominées par des cellules polynuclées au-delà de 30 bactéries/ μ l. Ce pourcentage augmente évidemment avec le seuil.

L'ensemble des cultures positives avait une formule prédominée par les cellules polynuclées. La formule leucocytaire n'est pas le meilleur moyen pour différencier les infections articulaires. En effet, dans les arthrites réactionnelles ou microcristallines, la formule est souvent prédominée par les polynucléaires. Donc on ne pourra pas non plus conclure avec l'aide de la formule leucocytaire.

- Contexte clinique

Nous relevons qu'à partir de 1000 bactéries/ μ l, la susceptibilité d'avoir une culture positive est importante : 62% de nos échantillons avaient une culture positive (8 échantillons sur 13 liquides contenant plus de 1000 bactéries/ μ l).

Nous avons cherché à savoir pourquoi la culture était restée négative pour 5 d'entre eux : elles étaient issues de patients ayant eu une antibiothérapie préalable.

- Diagrammes de dispersion des 15 cultures positives

Les diagrammes sont présentés en *Annexe 26 (page 119)*. A partir de 1000 bactéries/ μ l, le diagramme de dispersion des bactéries est réellement observable. Une concordance nombre de bactéries à l'UF4000 – diagramme de dispersion est observée : plus le nombre de bactéries augmente plus le nuage est important. Les nuages de points correspondants aux Streptocoques (sauf *Streptococcus pneumoniae*) semblent plus dévier vers le haut que les

autres nuages des autres bactéries (Staphylocoques). La différence entre les nuages des GRAM + et – ne peut pas être visualisée ici, un seul Bacille GRAM – est obtenu en culture est a moins de 100 bactéries/μl.

En conclusion, d’après nos données, il est difficile de conclure quant à un seuil de bactéries significatif même en associant de décompte de leucocytes et la formule leucocytaire. Dans nos attentes, un seuil de *bactériosynovie* de 10 ou de 30 bactéries/μl pourrait être retenu.

c) *Autres liquides*

L’ensemble des 343 autres liquides ont un décompte minimal de 5 bactéries/μl à l’UF4000.

- Comparaison : Bactéries à l’UF4000 – GRAM

D’après nos données, parmi les 343 autres liquides, ont été visualisés :

- 13 GRAM positifs à des CG+ et des BG- : le 1^{er} GRAM positif s’observe à partir de 32 bactéries/μl à l’UF4000. Les résultats de l’UF4000 s’étendent jusqu’à 99999 bactéries/μl.
- 330 GRAM négatifs : le décompte en bactéries de l’UF4000 varie de 5 à 8210 bactéries/μl.

Comme pour les autres groupes, plus le nombre de bactéries augmente à l’UF4000, plus la fréquence de positivité des GRAM est importante. De plus, les GRAM étaient tous positifs à des CG+ et pourtant l’appellation semi-quantitative des CG+ visualisés au GRAM ne correspond pas au décompte de bactéries à l’UF4000.

La corrélation GRAM – Bactéries à l’UF4000 n’est pas évidente et concordante. La culture sera utilisée comme méthode de référence pour permettre une meilleure comparaison.

- Comparaison : GRAM – Culture (N = 343)

	GRAM		Total
	Négatif	Positif	
Culture	318	0	318
	11	13	24
Total	329	13	343

Sensibilité = 54%
Spécificité = 100%
VPP = 100%
VPN = 96,7%

La sensibilité du GRAM n’est que de 54% pour notre étude. Par contre, la spécificité est excellente ainsi que la VPN.

D’après le tableau ci-dessus, 24 cultures sont revenues positives sur les 343 échantillons analysés (soit 7% environ). Sur les 13 GRAM positifs, tous sont revenus positifs en culture.

Par contre, 11 cultures positives avaient un GRAM négatif. Les cultures étaient positives aussi bien à des bactéries GRAM + et GRAM -.

- Comparaison : Bactéries à l'UF4000 – Culture

Pour les 24 cultures positives des 343 effectuées, le nombre de bactéries/ μl à l'UF4000 est de minimum 32. Il s'étend aussi jusque 99999 bactéries/ μl .

Pour les 319 cultures négatives, ce seuil débute à 5 bactéries/ μl et s'allonge jusque 8210 bactéries/ μl . Il y a une grande différence entre le minimum et le maximum de bactéries à l'UF4000 pouvant donner une culture positive.

Avec ces données, nous essayons d'établir un seuil de significativité en bactéries par rapport à la culture. Les objectifs sont les mêmes que ceux des autres groupes.

Etude des différents seuils

	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Seuil de 30 bactéries/μl	100 %	17 %	8,3 %	100 %
Seuil de 50 bactéries/μl	87,5 %	30,4 %	8,6 %	97 %
Seuil de 100 bactéries/μl	75 %	51 %	10,6 %	96,5 %
Seuil de 200 bactéries/μl	58,3 %	73 %	14 %	95,9 %

Il est impossible de conclure quant à un seuil de significativité des bactéries. Tout dépend ce que l'on veut que l'UF4000 détecte. Si nous prenons un seuil de 30 bactéries/ μl , on ne passera pas à côté de faux négatifs mais la spécificité n'est pas bonne. Par contre si nous choisissons un seuil de 100 bactéries, on risque de passer à côté de 25% des cultures positives, ce qui peut impacter la décision thérapeutique probabiliste.

La présence ou non de bactéries n'est pas suffisante pour établir un seuil. Il faut effectuer une interprétation globale avec les leucocytes et la formule leucocytaire afin d'étayer un diagnostic infectieux ou non.

- Leucocytes – Bactéries à l'UF4000

D'après nos données, plus le nombre de bactéries augmente plus le nombre de leucocytes est important. A partir de 150 bactéries/ μl , l'ensemble des échantillons ont un décompte de leucocytes supérieur au seuil de significativité du laboratoire : 100/ μl à un échantillon près.

Tout comme les liquides articulaires, il y a une grande disparité entre le nombre de leucocytes et les bactéries à l'UF4000 pour une culture positive.

Par exemple :

- Une culture positive à très rares *Staphylococcus aureus* pour un décompte de leucocytes à 90/ μl et un décompte de bactéries à 91/ μl .
- Et une culture positive à très rares *Staphylococcus aureus* pour un décompte de leucocytes à 3600/ μl et un décompte de bactéries à 1145/ μl .

Il est donc difficile de conclure même en associant le nombre de bactérie et les leucocytes.

- Formule leucocytaire – Bactéries à l'UF4000

Il n'y a pas de prédominance majeure des cellules polynuclées pour un décompte important en bactéries. Par exemple, à partir de 100 bactéries/ μl , environ 50% des formules sont prédominées par des cellules mononuclées. Par contre, pour les 24 cultures positives, 23 d'entre elles ont une formule prédominée par des cellules polynuclées. La formule leucocytaire ne semble pas être reliée à la concentration en bactéries.

- Contexte clinique

A partir de 1000 bactéries/ μl , la susceptibilité d'avoir une culture positive est importante : 41% de nos échantillons avaient une culture positive (9 échantillons sur 22 liquides contenant plus de 1000 bactéries/ μl). 13 échantillons sont revenus négatifs en culture, nous avons étudiées les différentes étiologies :

- 10 d'entre eux avaient reçu une antibiothérapie préalable à la ponction pouvant ainsi expliquer la négativité des cultures.
- chez 3 d'entre eux, une origine néoplasique du liquide a été retrouvée sans antibiothérapie.

- Diagrammes de dispersion des 24 cultures positives

Les diagrammes sont présentés en *Annexe 27 (page 120)*. A partir de 1000 bactéries/ μl , le diagramme de dispersion des bactéries est réellement interprétable. Une concordance nombre de bactéries à l'UF4000 – diagramme de dispersion est observée : plus le nombre de bactéries augmente plus le nuage est important. Les nuages de points correspondant aux GRAM – et + sont différents et semblent en concordance avec les données du fournisseur. Les nuages de points correspondants aux Streptocoques (et ici avec *Streptococcus pneumoniae*) semblent plus dévier vers le haut que ceux des Staphylocoques.

En conclusion, d'après nos données il est difficile de conclure quant à un seuil de bactéries significatif même en associant de décompte de leucocytes et la formule leucocytaire. Dans nos attentes, le seuil de 30 bactéries/ μl pourrait être retenu.

V. Discussion

L'intégration et l'utilisation en routine de l'UF4000 au sein du laboratoire nécessite, selon les recommandations du COFRAC, une vérification in situ de la méthode analytique utilisée. Cette étude a donc permis de vérifier les performances analytiques de cette méthode ainsi que sa comparabilité avec des méthodes manuelles. Les avantages et les inconvénients du module liquide biologique de l'UF4000 ont également été relevés.

L'ensemble des données analysées et discutées permettront une prise en charge optimisée du liquide biologique et une intégration optimale de cet appareil dans le laboratoire.

A. Vérification de la méthode in situ

1. Fidélité

En premier lieu, nous avons testé la fidélité de l'automate.

La répétabilité obtenue pour les leucocytes, hématies et bactéries est très satisfaisante et conforme pour les trois groupes de liquides. Pour le groupe *Autres liquides*, aucune non-conformité n'est observée et la plupart des coefficients de variation sont inférieurs à 10%. Pour les autres groupes, quelques non-conformités sont relatées sans impact clinique : ces dernières s'observent soit dans des valeurs extrêmes (très bas niveau de concentration en leucocytes ou le très haut niveau de concentration en hématies), soit elles sont dues à une dégradation des éléments pendant l'expérience qui a duré le plus souvent, plus d'une heure.

Au vu des coefficients de variation obtenus lors de nos expériences, l'UF4000 semble être plus fidèle dans les hautes concentrations en leucocytes, hématies et bactéries. Ceci est en concordance avec les études actuelles sur le mode liquide biologique et urine^{30,54} et avec les CV donnés par le fournisseur qui baissent dans les valeurs hautes.

En outre, la comparaison des CV obtenus à ceux du fournisseur Sysmex® est discutable. En effet, les CV cibles donnés par Sysmex® correspondent au module liquide biologique de façon générale et ne différencient pas la nature du liquide biologique passé sur l'automate. La notion de « CV à concentration faible » par exemple pour les leucocytes de Sysmex® est normalement différente pour un LCR d'un liquide pleural. De même, la notion de « CV au niveau de décision clinique » change en fonction de la nature du liquide biologique : un LCR aura un seuil en leucocytes significatif beaucoup plus bas que celui d'un liquide articulaire par exemple.

Afin de comparer les CV obtenus de la façon la plus juste possible, nous avons utilisé les CV fournisseur correspondant au nombre d'éléments trouvés lors des expériences et non pas les

CV fournisseur correspondant à la « concentration faible » ou « au niveau de décision clinique ». De plus, quand le nombre d'éléments du CV fournisseur ne correspondait pas au nombre d'éléments obtenus lors de l'expérience, nous avons choisi de prendre comme comparatif les CV avec le nombre d'éléments le plus proche ou, de façon arbitraire, 10% quand aucun CV n'était renseigné pour le nombre d'éléments obtenu.

Le coefficient de variation de 15% pour la concentration au seuil décisionnel en leucocytes (10 leucocytes) pour le groupe LCR est discutable. Ce dernier se confirme aussi dans une autre étude.⁵⁴ L'automate aurait une variation de +/- 1,5 leucocyte(s) à ce seuil, ce qui pourrait potentiellement impacter la prise en charge générale du LCR au sein du laboratoire.

La reproductibilité, réalisée par le passage des contrôles internes, s'est avérée très satisfaisante et l'ensemble des CV obtenus se révèlent être tous inférieurs à 10%. Les CV obtenus pour les niveaux hauts en éléments sont moins importants que ceux des niveaux bas^{30,54} tout comme ceux observés pour le mode liquide biologique de l'UF1000.^{38,39,57} Ceci confirme la tendance observée des CV pour la répétabilité. La fidélité de l'automate est donc optimale pour son utilisation en routine et donc meilleure que son prédécesseur, l'UF1000.^{29,38,39}

2. Etendue de mesure

En deuxième lieu, nous avons vérifié l'étendue de mesure de l'appareil. La détermination de la limite de quantification et de linéarité permettront d'établir les seuils quantitatifs et semi-quantitatifs de rendu de résultat.

Les limites de détection calculées pour les leucocytes, hématies et bactéries sont en concordance avec celles émises par le fournisseur, à l'exception des hématies où une différence de 0,54 hématies est constatée. Les limites de détection trouvées restent tout de même inférieures à celles retrouvées dans la bibliographie actuelle pour le même module de cet automate^{54,56} ou d'autres automates³⁹ : ceci n'a pas d'impact sur le rendu du résultat puisque la limite de détection ne sera pas rendue pour un patient.

Les limites de quantification se révèlent aussi proches de celles du fournisseur et de la littérature pour ce même module.^{54,56} Nos données sont plus précises que celles émises pour l'UF1000³⁹ même si notre méthode expérimentale reste moins précise que celle calculée.

La méthode expérimentale a été difficile à réaliser en termes de temps (expérience durant 5h) et de la variation des éléments au cours de l'expérience. Il a été donc difficile de réaliser des dilutions justes pour correspondre exactement aux CV fournisseur et d'en déduire de la façon la plus précise, la limite de quantification pour chaque élément. La limite de quantification calculée, elle, se basant sur l'écart-type du « blanc », rend un résultat chiffré souvent inférieur

à la fourchette émise de la LQ dans la méthode expérimentale. Nous avons défini les 3 limites de quantification en nous basant à la fois sur celles du fournisseur mais aussi sur celles obtenues par la méthode calculée et expérimentale. Si les éléments d'un liquide biologique sont inférieurs à leurs limites de quantification respectives, le résultat sera rendu « inférieur à la limite de quantification ». Ce résultat non quantitatif pourra de façon simple être paramétré lors de la transmission du résultat de l'UF4000 au logiciel de validation biologique. Enfin, la limite de quantification de chaque élément pourrait être également notifiée au médecin prescripteur.

Les expériences de linéarité soulignent le rendu de résultats fiables pour les leucocytes dans et au-delà du domaine de linéarité du fournisseur.^{30,56} Cette bonne linéarité était aussi observée avec le module liquide biologique de l'UF1000.³⁸

Par précaution, un résultat supérieur à la limite de la plage d'analyse (10000 leucocytes/ μ l) sera dilué. Pour le groupe *LCR*, nos expériences de linéarité se sont arrêtées à 100 leucocytes/ μ l. D'autres expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de vérifier la linéarité au-dessus de cette concentration. Pour le rendu des résultats, nous considérerons qu'ils sont fiables jusque 10000 leucocytes/ μ l grâce aux données obtenues pour le LCR dans la littérature,⁵⁴ grâce aux données obtenues pour les autres liquides lors de nos expériences et de leur moindre fréquence au quotidien. La linéarité des hématies a été démontrée pour une partie du domaine d'analyse (jusque 10000 hématies/ μ l). La pertinence de vérification et de rendu de résultat d'un liquide biologique contenant plus de 10000 hématies/ μ l est mineure ; en effet, un résultat supérieur à cette limite sera rendu comme « >10000 hématies/ μ l ». Il faut néanmoins prêter attention au domaine d'affichage de l'UF4000 : il affiche des résultats bien au-delà des limites de linéarité fixées. Un système d'alarme pourrait être envisagé sur l'UF4000 quand les limites supérieures de linéarités sont dépassées. Suite à cette alarme, pour les leucocytes, le technicien procédera à une dilution. Pour les hématies, un paramétrage sera effectué pour transmettre le résultat en semi-quantitatif.

L'analyse de l'étendue de mesure a permis de vérifier la fiabilité de nos résultats ainsi que de cadrer les résultats analytiques rendus. L'utilisation en routine de cet appareil rendra des résultats fiables dans le domaine de linéarité vérifié.

3. Contamination

En troisième lieu, nous avons testé la contamination inter-échantillons de l'automate. C'est un élément indispensable dans l'utilisation en routine de l'automate.

La contamination cellulaire obtenue avec les expériences est satisfaisante. Pour les hématies, nous l'avons catégorisée comme « satisfaisante » : seule 0.5 hématie se transfère

d'un échantillon à 10000 hématies/ μl à un autre : ceci est totalement négligeable et n'a pas d'impact clinique pour le patient. Les autres données obtenues sur le même automate en module urine³⁰ ou sur d'autres automates en module liquide biologique^{38,39,59} sont en concordance avec notre pourcentage de contamination.

Pour les leucocytes, le résultat est conforme par rapport aux données fournisseur et aux résultats bibliographiques d'autres automates⁵⁹ mais il est cliniquement discutable. En effet, à la suite d'un passage d'un échantillon de 10000 leucocytes/ μl , 3,5 leucocytes sont susceptibles de passer dans l'échantillon suivant. Ceci peut avoir un impact, notamment sur les liquides biologiques se trouvant à la limite de leur seuil décisionnel, comme par exemple, les LCR. Un LCR contenant 7 leucocytes n'aura ni formule leucocytaire, ni GRAM dans l'état actuel de nos procédures. Si ce LCR fait suite, sur la machine, à un liquide articulaire contenant par exemple, plus de 10000 leucocytes/ μl , il aura donc 10,5 leucocytes : il ne sera donc pas pris en charge de la même manière. Nous proposons donc deux solutions suite au passage d'un liquide très concentré en leucocytes (> 10000 leucocytes/ μl) :

- le technicien lance un rinçage de l'automate directement après le passage de ce liquide très concentré (ce rinçage dure 5 à 10 minutes).
- le technicien passe une cupule d'eau physiologique comme un patient afin de nettoyer l'ensemble du système (durée : 5 minutes).

Dans tous les cas, il est nécessaire d'entreprendre une action. Ces deux techniques ont déjà fait leur preuve pour corriger la contamination microbienne avec le module urine.⁵⁸ De plus, un système d'alarme est également possible sur l'UF4000 dès lors qu'un liquide très concentré est passé, une alarme sur l'UWAM® est déclenchée alertant le technicien à entreprendre cette action. Cette contamination cellulaire leucocytaire n'a pas été retrouvée dans la littérature pour le groupe LCR⁵⁴ ou sur le module liquide biologique de l'UF1000.^{38,39}

La contamination microbienne testée avec des liquides biologiques contenant jusque 10000 bactéries/ μl est très satisfaisante. L'ensemble des eaux physiologiques passées sur l'automate après un liquide fortement concentré en bactéries donne des résultats inférieurs à la limite de quantification du fournisseur. De même, les cultures de ces eaux physiologiques sont toutes restées négatives à l'exception de quatre géloses. Pour ces quatre géloses présentant une seule colonie bactérienne, nous soupçonnons une contamination des géloses après ensemencement. En effet, plusieurs arguments peuvent appuyer notre hypothèse : l'automate ne détecte aucune bactérie (0 bactéries/ μl) pour les quatre eaux physiologiques, une seule boîte de culture parmi les trois ensemencées pour les quatre eaux physiologiques est positive à une colonie, la colonie n'apparaît pas sur le dépôt du prélèvement au sein de la gélose, les cultures des autres eaux physiologiques faisant suite à un liquide biologique bien

plus concentré en bactéries (par exemple : 7000 bactéries/ μ l) sont négatives, et enfin, l'aspect macroscopique de la colonie ne correspond pas à l'aspect macroscopique des colonies observées sur les cultures du liquide biologique positif. Nous aurions dû réaliser une identification par spectrométrie de masse des colonies sur les 4 géloses suspectes : cette identification aurait été comparée à l'identification des colonies des cultures positives des liquides biologiques. Par manque de réactivité, elle n'a malheureusement pas été réalisée.

Les recommandations de Sysmex® concernant la contamination microbienne sont de 0,05%. Ce pourcentage n'a pas pu être calculé avec notre technique de détermination de contamination microbienne, technique de détermination qui est aussi recommandée par Sysmex® et le guide SH GTA 14 du COFRAC. La société Sysmex® n'a pas su expliquer cette méthode de détermination avec le pourcentage.

Nous avons également montré l'absence de contamination microbienne au-dessus de 10000 bactéries/ μ l. Au-delà de cette concentration, nous préconisons, par principe, un rinçage supplémentaire ou le passage d'une cupule d'eau physiologique avant le passage d'un autre échantillon.⁵⁸ Un système d'alarme peut aussi être envisagé.

Ces données de contamination cellulaire et microbienne autoriseraient le passage initial du liquide biologique sur l'automate avant l'ensemencement. Cette notion est intéressante pour la mise en place d'algorithmes décisionnels de prise en charge des liquides biologiques. En effet, selon les prélèvements, le choix des géloses à ensemercer pourrait s'effectuer avec les données obtenues de l'UF4000 (leucocytes ? Bactéries ? Formule leucocytaire ?).

En résumé de ces trois points de vérification de méthode analytique, l'UF4000 montre de bonnes performances pour le mode liquide biologique. Ces données attestent du bon fonctionnement de l'automate in vivo.

B. Comparaison de méthode

Nous avons comparé, pour un ensemble d'échantillons de patients (N=699), les résultats rendus par l'automate à différentes techniques manuelles de référence. Ces essais de comparaison de méthode permettent de réaliser si notre appareil tend à rendre des résultats justes par rapport aux autres techniques et donc de pouvoir appréhender son utilisation en routine. Ces essais permettent également d'apprécier les avantages et les inconvénients de cette machine. Nous discuterons de ces données de comparaison par groupes de liquides.

L'interprétation de l'ensemble de la comparaison de méthode pour chaque groupe de liquide doit se faire en accord avec l'incertitude de mesure de chaque technique : comme la comparaison du nombre de leucocytes et d'hématies où leurs incertitudes ont été calculées précédemment. Chaque résultat de chaque méthode doit être interprété avec cette incertitude de mesure et notamment toutes les valeurs proches du seuil décisionnel. L'incertitude de mesure de la méthode manuelle est toujours plus élevée que celle automatisée et ces dernières sont toutes deux plus élevées dans les valeurs basses en éléments. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette importante incertitude de mesure pour la cellule de KOVA, comme la grande variabilité inter-opérateur à la distinction des cellules, un grand nombre de leucocytes ou d'hématies pouvant gêner la lecture de la cellule, le faible volume étudié, et le comptage d'éléments extrapolé (comptage des cellules sur 1 ligne ou 1 petit carré puis multiplication par un facteur multiplicatif adapté selon la notice fournisseur). Il est donc important d'avoir à l'esprit cette incertitude. Dans l'exploitation des résultats de l'UF4000 et de sa potentielle utilisation en routine, deux notions peuvent être envisagées : la première étant la notion de « zone grise » pour toutes les valeurs se trouvant au seuil, indiquant ici un résultat douteux et à repasser, peu valable dans la pratique courante en bactériologie ; la deuxième étant la notification au prescripteur de cette zone d'incertitude pour les valeurs au seuil en lui rendant par exemple, le résultat plus ou moins l'incertitude calculée pour la valeur obtenue. Ces deux notions pourraient contribuer à l'amélioration du rendu de résultat par le laboratoire. Néanmoins, l'impact pour le patient reste moindre : un liquide articulaire correspondant à une arthrite septique aura un nombre de leucocytes bien au-delà du seuil décisionnel. Par contre, pour un LCR, une valeur en leucocytes supérieure au seuil pourrait influencer sa prise en charge en prenant également en compte les autres arguments biologiques et cliniques.

1. LCR

L'ensemble des données pour le groupe *LCR* tendent à utiliser l'UF4000 en routine.

La comparaison des éléments leucocytes/hématies est satisfaisante.

Pour les leucocytes, les tests statistiques utilisés révèlent une différence significative entre la méthode manuelle (cellule de KOVA) et la méthode automatisée (UF4000). Cette différence, également constatée pour l'ensemble de nos groupes de liquides est explicable par le fait qu'une méthode nécessitant l'œil humain est obligatoirement différente d'un système automatisé composé d'algorithmes informatiques. La relation linéaire entre les deux méthodes est bien présente même si le coefficient de corrélation est moyen ($R = 0,51$). Il

existe un biais significatif d'environ 2 leucocytes, comme connu dans la littérature⁵⁴, ce dernier étant négligeable entre deux méthodes. Il est également mis en évidence une erreur proportionnelle : la représentation logarithmique permet de visualiser cette erreur. A partir de 100 leucocytes, la différence des valeurs augmente entre les deux méthodes. Cette erreur, également souvent constatée pour les autres groupes de liquides analysés, peut en partie être expliquée par la diminution de la précision du comptage en cellule de KOVA lors de fortes concentrations en leucocytes : le décompte d'une ligne et/ou d'un carré est multiplié par un facteur multiplicatif, ce qui diminue la précision du décompte leucocytaire. Cette erreur proportionnelle a peu d'influence sur le rendu de résultat puisque le seuil décisionnel est à 10 leucocytes/ μl , bien en deçà de la dérive. L'automate tend à rendre des valeurs plus justes que la KOVA : son volume de liquide analysé et compté est 600 fois supérieur à celui de la KOVA.

L'analyse du tableau de concordance révèle un taux de concordance de 96% entre les deux méthodes pour un seuil de 10 leucocytes/ μl . Les discordances observées se situent autour de la valeur du seuil et sont dues aux incertitudes de mesures propres de chaque méthode. La présence de débris dans le LCR semble interférer avec le décompte de l'UF4000, nous préconisons donc de ne pas passer les liquides contenant des morceaux ou des débris. L'analyse du tableau de concordance à la valeur du seuil montre 75% de concordance, les 7 discordances visualisées sont les mêmes que vu précédemment, le pourcentage de concordance diminue juste par le nombre d'échantillons analysés qui est diminué. Dans tous les cas, les cultures sont restées négatives et il n'y a pas eu d'impact clinique.

Le seuil décisionnel de 10 leucocytes/ μl au sein du laboratoire peut être discutable. En effet, la plupart des références bibliographiques indiquent un seuil significatif à 5 leucocytes/ μl pour le LCR⁵⁴ et une formule leucocytaire interprétable à partir de 10 leucocytes/ μl . Avec l'UF4000, il serait peut-être intéressant de baisser notre seuil de significativité tout en sachant qu'à cette concentration, le coefficient de variation est bien supérieur à celui du seuil de 10 leucocytes/ μl et qu'il est proche de la limite de quantification du fournisseur. D'autres études seraient nécessaires pour appuyer cette idée.

Pour les hématies, les tests statistiques révèlent les mêmes tendances que celles observées avec les leucocytes. L'intensité de la relation linéaire et, quant à elle, plus forte ($R = 0,97$). Un biais d'environ 250 hématies est observé et accompagné d'une erreur proportionnelle. Ce biais n'est pas en concordance avec la bibliographie actuelle qui donne des valeurs plus basses.^{54,56} La dispersion des valeurs entre les méthodes s'observe à partir de 100 hématies : l'imprécision de comptage augmente avec le nombre d'éléments.

Pour les hématies, la précision de comptage a peu d'utilité : la prise en charge du patient ne diffère pas si le LCR contient 10 ou 100 hématies. L'UF4000 apporte seulement un résultat plus juste que la cellule de KOVA, de par son volume de liquide analysé mais aussi par sa précision de comptage lorsque le LCR est hématique ou hémorragique.

Nos données cytologiques pour le LCR sur l'UF4000 sont en concordance et même meilleures que celles obtenues avec l'UF1000.^{29,37,39}

La comparaison de la formule leucocytaire est sous réserve. Les analyses statistiques révèlent, aussi bien pour les cellules polynuclées et mononuclées, une différence significative entre le MGG et l'UF4000. Un biais de 20% est observé ainsi que la présence d'une erreur proportionnelle. Ce biais est en concordance avec la littérature actuelle.⁵⁶ Les deux méthodes restent tout de même statistiquement linéaires, d'intensité modérée ($R = 0,57$) et l'UF4000 détectant légèrement plus de cellules polynuclées que le MGG. Il est à noter que seulement 17 formules leucocytaires ont été comparées, la puissance des tests statistiques restant plus faible avec ce moindre nombre d'échantillons. Les données bibliographiques montrent quant à elle une bonne corrélation ($r = 0,99$) pour 16 échantillons comparés.⁵⁴

Une concordance de 76,5% entre les deux méthodes est visualisée. Les 4 discordances relevées mettent en évidence des inversions de formules en faveur d'une prédominance de cellules polynuclées à l'UF4000. Elles peuvent être expliquées soit par la dégradation des cellules mononuclées entre la réalisation du MGG et le passage sur l'UF4000, soit par une mauvaise différenciation des nuages de points dans les diagrammes de dispersion. Avec l'analyse des diagrammes de dispersion et suite à une note de Réactovigilance de Sysmex® avant l'analyse de nos données, il semblerait que ces différences soient dues à notre deuxième hypothèse. En effet, cette note de Réactovigilance relate la mauvaise différenciation des nuages de points des MN et des PN pour les faibles valeurs en leucocytes dans le mode STAT BF. Le problème viendrait de l'algorithme informatique de différenciation des nuages de points. Sans ce problème, la concordance serait de 94% entre nos deux techniques. Ces 4 discordances auraient eu potentiellement un impact clinique sur le patient : un LCR avec une formule prédominée par des cellules polynuclées et contenant plus de 10 leucocytes aurait orienté le clinicien vers une cause plutôt infectieuse. Si la correction du logiciel est effectuée, l'UF4000 semble apporter ses preuves pour la différenciation des cellules polynuclées des cellules mononuclées.

La comparaison des bactéries au cours de cette étude vise à mettre en place un seuil de *bactériorachie* significatif dans le LCR : le seuil ainsi choisi devra avoir une bonne

sensibilité, mais surtout une bonne valeur prédictive négative permettant ainsi d'exclure de façon certaine un LCR qui sera négatif. La présence de bactéries au-delà du seuil choisi devra alors alerter et entraîner la réalisation d'autres examens plus spécifiques ou d'une PCR. La réflexion générale doit tenir compte du nombre de leucocytes, de la formule leucocytaire, des résultats biochimiques et du contexte clinique.

En comparant le nombre de bactéries de l'automate et le résultat des GRAM, une grande hétérogénéité du nombre de bactéries à l'UF4000 est visualisée pour des GRAM rendus positifs et négatifs. Dans les GRAM positifs, un GRAM rendu avec une semi-quantification « rares » présente plus de bactéries à l'UF4000 qu'un GRAM rendu avec « très nombreux ». Ceci suggère soit la variabilité subjective dans la semi-quantification, soit une démultiplication dans le temps des bactéries entre la réalisation du GRAM et le passage sur l'UF4000 (qui a pu durer quelques jours), soit un décompte différent de l'UF4000 en fonction de la bactérie. Cette dernière idée, émise déjà dans le module urine,⁶⁴ est à prouver par d'autres expériences. La présence de bactéries ($>1000/\mu\text{l}$) à l'UF4000 et en culture avec des GRAM négatifs peut être expliquée par la faible sensibilité du GRAM à la détection des bactéries (positif à partir de 10^4 UFC/ml) mais aussi par la possibilité de démultiplication des bactéries entre la réalisation du GRAM et son passage sur l'UF4000. A partir de ces éléments de comparaison avec le GRAM, il n'a pas été possible d'établir un seuil de bactériorachie.

La comparaison du GRAM avec la culture a permis de calculer, avec nos données, les paramètres de sensibilité, spécificité, VPN et VPP du GRAM. La sensibilité avoisine les 67%. La VPN est quant à elle assez bonne et se trouve aux alentours de 94%. Ces données sont peut-être surestimées au vu du faible échantillonnage des GRAM réalisés (seulement 19). Le but de cette expérience est de définir ces pourcentages pour que le seuil de *bactériorachie* à choisir ait une meilleure sensibilité et VPN que le GRAM. La bactériorachie serait réalisée en premier ; si celle-ci est supérieure au seuil choisi, la réalisation du GRAM serait effectuée pour la visualisation de la forme de la bactérie, élément que l'UF4000 ne distingue pas.

La comparaison des bactéries de l'UF4000 avec la culture a permis d'établir le seuil de bactériorachie. Le seuil de bactériorachie présentant la meilleure sensibilité et la meilleure VPN correspond à **10 bactéries/ μl** : la sensibilité et la VPN sont de 100%. La spécificité est légèrement moins bonne que celle du GRAM mais, au vu de l'intégration de cette bactériorachie dans la prise en charge du LCR, le GRAM pourrait rattraper cette différence. Les données sur les leucocytes et les formules leucocytaires sont aussi en concordance avec le seuil choisi de 10 bactéries/ μl : la plupart présente plus de 10 leucocytes/ μl et sont prédominés par des cellules polynuclées. Ceci est également connu dans la littérature.⁵⁴

L'analyse du contexte clinique révèle que la plupart des cultures négatives observées avec plus de 10 bactéries/ μl , plus de 10 leucocytes/ μl , avec une hyperprotéïnorachie et avec la formule prédominée par les cellules polynuclées avaient eu une antibiothérapie préalable à l'analyse du LCR ; nous pouvons émettre l'idée que l'UF4000 détecterait les bactéries même mortes et donc non visibles à la culture. Concernant les LCR post-traitement : ils apparaîtraient comme positifs à l'UF4000 et au GRAM mais négatifs à la culture : cette alerte permettrait d'orienter le biologiste vers la réalisation de la PCR.

Une culture négative avec une bactériorachie peut aussi être visualisée par des LCR positifs à virus. Nous ne savons pas à l'heure actuelle si une interférence bactérie-virus existe à l'UF4000. D'autres études seraient nécessaires pour étayer cette idée. Néanmoins, la présence de bactéries supérieures au seuil, contenant plus de 10 leucocytes/ μl , ayant une formule prédominée par les cellules polynuclées et une culture négative doit faire penser à un virus. Dans ce cas, une PCR multiplex pourrait être proposée (analyse virologique).

La comparaison des bactéries de l'UF4000 avec la culture a aussi montré, comme vu avec les GRAM, la grande hétérogénéité des bactéries à l'UF4000 par rapport aux résultats de culture. Nous pensons que l'UF4000 compte différemment les bactéries GRAM + et les GRAM -. Nous observons que des cultures positives à rares Bacilles GRAM négatif avec un GRAM négatif ont un décompte en bactéries 5 fois plus important que des cultures positives à assez nombreux Cocci GRAM positif avec un GRAM positif. L'UF4000 compterait mieux les GRAM négatifs que les GRAM positifs. Ceci serait à confronter à d'autres études complémentaires.

De plus, la visualisation du caractère GRAM + ou GRAM - des bactéries sur les diagrammes de dispersion est constaté pour ce groupe de liquide à partir de 1000 bactéries/ μl . Cette donnée peut être aide à la lecture interprétative du GRAM.

Au vu de l'ensemble des données de comparaison de méthode pour le LCR, nous suggérons le passage du LCR sur l'UF4000. En *Annexe 28 (page 121)* se trouve une proposition d'un algorithme décisionnel pour la prise en charge du LCR avec l'UF4000. Cet algorithme est réalisé avec toutes les données obtenues pour le LCR : les leucocytes, la formule leucocytaire et la détection de bactérie. Une bactériorachie ne doit pas être interprétée seule. Le contexte clinique est toujours indispensable à la bonne prise en charge du LCR au sein du laboratoire. Cet algorithme apportera différents éléments (bactéries ? Formule à prédominance de %PN ?) lorsque la numération leucocytaire se trouvera dans la zone d'incertitude de l'automate. Ces derniers permettront d'avoir une réflexion globale et la réalisation ou non des examens complémentaires.

Le volume de LCR requis est le facteur limitant de cet algorithme. Bien souvent, les LCR sont de faibles volumes (< 1ml) : le passage sur l'UF4000 prenant 600µl, il ne restera que 400µl pour réaliser les examens supplémentaires comme la détection de l'antigène du pneumocoque et la mise en culture. Ce volume étant alors insuffisant, nous préconisons de ne faire aucun passage de LCR à moins de 1ml. Ceci étant, la récupération du fond de la cupule après prélèvement de l'automate pourrait être un axe d'amélioration pour les LCR.

Au-delà de 1ml, l'UF4000 offre de belles opportunités avec la possibilité d'apporter au clinicien un diagnostic présomptif beaucoup plus rapide qu'avec les méthodes manuelles.

2. Liquide articulaire

L'ensemble des données obtenues avec le liquide articulaire tendent aussi à l'utilisation de l'UF4000 en routine.

La comparaison du décompte des leucocytes et des hématies par la méthode manuelle et celle de l'UF4000 est satisfaisante.

Pour les leucocytes, les résultats statistiques sont satisfaisants. En effet, l'intensité de la relation linéaire est bonne ($R=0,97$) mais les deux méthodes présentent une différence significative avec un biais d'environ 3500 leucocytes et une différence proportionnelle. Sur les représentations graphiques, les valeurs se dispersent largement au-delà de 1000 leucocytes : il n'y aura donc pas d'impact clinique pour le patient puisque le seuil de significativité est beaucoup plus bas. Ce biais important pour les deux méthodes est dû à la différence obtenue entre les deux méthodes dans les valeurs hautes et non pas dans les valeurs basses. L'imprécision de comptage des leucocytes de la KOVA dans les liquides articulaires très concentrés pourrait être l'explication. De même, nous pouvons nous questionner sur l'impact de la dilution effectuée sur tous les liquides articulaires. Cette dernière a été effectuée aussi bien lors du comptage en cellule de KOVA ou du passage sur l'appareil. Le facteur multiplicatif de la dilution pourrait être différent entre la méthode manuelle et automatisée. D'autres études seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Tout comme les LCR, l'UF4000 prend un volume bien supérieur à la cellule de KOVA et compte l'intégralité du volume. En KOVA et surtout avec des liquides très concentrés, 1/100^{ème} de 1µl est compté, ce qui entraîne une marge d'imprécision importante.

En dehors des données statistiques, le test de concordance apporte 95% de concordances. Les 8 discordances observées se trouvent soit au seuil, soit sont dues à l'imprécision de la KOVA pour un échantillon hématique, soit sont dues à des erreurs automate quand le prélèvement

contient des débris ou des cristaux. La présence de débris ou de cristaux surestimerait la présence de leucocytes par rapport à la cellule de KOVA. Ceci est à étayer avec d'autres études. Le taux de concordance à la valeur du seuil est légèrement moins important mais n'entraîne pas d'impact clinique puisque l'ensemble des cultures sont restées négatives. Comme vu précédemment, il est important de prendre en compte l'incertitude de mesure de l'automate et la méthode manuelle pour l'interprétation. Les valeurs au seuil peuvent être expliquées par l'incertitude de mesure des deux éléments de comparaison étudié.

La comparaison des hématies montre aussi une différence significative entre les deux méthodes, avec un biais important de 3100 hématies et une erreur proportionnelle. Le biais est bien plus important que celui retrouvé dans d'autres études⁵⁶ mais peut être expliqué par les différentes causes d'incertitudes de comptage à la cellule de KOVA. Cependant, il y a bien une relation linéaire entre les deux méthodes et l'ensemble des représentations statistiques montrent une large dispersion des valeurs au-delà de 1000 hématies. Ceci n'aura donc pas d'impact sur le rendu du résultat.

Malgré des tests statistiques non satisfaisants, l'utilisation en routine de l'UF4000 pour la cytologie automatisée pour les liquides articulaires peut être envisagée : l'ensemble des différences n'ont pas eu d'impact sur le rendu du résultat du patient et ne changent pas le diagnostic retenu.

Les données de comparaison de la formule leucocytaire sont concluantes. Un taux de concordance de 89% est observé avec seulement 10 formules discordantes. Ces discordances sont expliquées. Les données des résultats anatomopathologique confortent le plus souvent les formules de l'UF4000. Seules 2 formules de l'UF4000 ne sont pas concluantes avec leur comparaison avec l'anatomopathologie, ces dernières peuvent être expliquées par le problème analytique de l'UF4000 de mauvaise différenciation des nuages dans les diagrammes de dispersion. Sans ce problème analytique, la concordance aurait été de près de 94%. Les données statistiques sont aussi concluantes : il y a un biais de 5% entre les méthodes et la relation linéaire est bien présente. Les deux méthodes présentent toujours une différence significative, bien qu'en réalité elle n'ait pas d'influence sur le rendu des résultats.

Les résultats des décomptes semi-quantitatifs ne sont pas concluants entre les deux méthodes. La subjectivité de l'opérateur lors de ce décompte biaise les résultats. Par exemple, s'il y a peu de leucocytes, le technicien aura tendance à sous-estimer le résultat semi-quantitatif du %PN ou du %MN. L'UF4000 pourrait donc apporter une expertise objective de la formule en semi-quantitatif pour les liquides avec une numération leucocytaire inférieure au seuil décisionnel. Les résultats seraient ainsi uniformisés. En *Annexe 24 (page 118)*, un

abaque est proposé. Une programmation du logiciel de l'UF4000 pourrait être envisagée afin de transmettre les résultats en semi-quantitatif à partir de résultats chiffrés pour les valeurs en leucocytes inférieures au seuil.

La comparaison des bactéries pour les liquides articulaires viserait à mettre en place un seuil en bactéries appelé *Bactériosynovie* à partir duquel il y aurait une forte probabilité d'avoir une culture positive (bonne sensibilité) et en-dessous duquel on serait certain d'avoir un liquide articulaire négatif (bonne VPN). La présence de bactéries au-delà de ce seuil entraînerait des examens directs supplémentaires comme la réalisation du GRAM ou des techniques de biologie moléculaire dans un algorithme décisionnel réfléchi à partir de l'ensemble des données sur les leucocytes, la formule leucocytaire et le contexte clinique. La définition de ce seuil a été compliquée à réaliser. De plus, il est à noter que les valeurs de seuil de *bactériosynovie* discutées dans cette partie ne prennent pas en compte la dilution au 10^{ème} (ici nous relevons les quantifications de liquides articulaires passés au 10^{ème}). En effet, on ne sait pas si un facteur multiplicatif (comme pour les leucocytes par exemple), s'applique à la valeur des bactéries. D'autres études seraient nécessaires pour étayer cette idée. Si ce facteur multiplicatif existe, il serait donc nécessaire de multiplier par 10 l'ensemble des valeurs des bactéries.

Nous avons comparé le nombre de bactéries à l'UF4000 et le GRAM. Tout comme le LCR, une grande hétérogénéité des valeurs est observée aussi bien avec les GRAM positifs que les GRAM négatifs. Les mêmes explications que celles du groupe *LCR* peuvent être émises. Ces éléments de variation importante n'ont pas permis l'orientation d'un seuil à partir duquel le GRAM serait positif.

La comparaison du GRAM avec la culture, a montré, à partir de nos données, une sensibilité d'environ 53% et une VPN de 96% pour le GRAM. Le seuil de bactériosynovie choisi doit avoir une meilleure sensibilité et VPN que le GRAM pour justement pallier au manque de sensibilité du GRAM. Dans l'algorithme décisionnel, le liquide articulaire serait passé en premier sur l'UF4000 et en fonction des résultats de bactériosynovie, le GRAM serait plus ou moins réalisé selon ce premier résultat.

La comparaison des bactéries de l'UF4000 et la culture a permis de définir différents seuils. Une grande dispersion des bactéries est observée pour des cultures négatives et positives. En appuyant nos données avec le nombre de leucocytes et la formule leucocytaire, les résultats n'ont pas été plus concluants. En effet, la présence de leucocytes au-delà du seuil avec une bactériosynovie > 10 ou 30, ne veut pas forcément dire « culture positive » ou la présence de cellules polynucléées avec des leucocytes et une bactériosynovie > 10 ou 30 ne

veut pas non plus dire « culture positive ». Par contre, lorsque l'automate détecte plus de 1000 bactéries/ μl , la probabilité d'avoir une culture positive est quasi de 100% et, si et seulement si, le patient n'a pas eu d'antibiothérapie au préalable. L'automate détecterait la présence de bactéries mortes, comme vu dans la partie LCR. Pour établir le seuil de bactériosynovie, il est utile de connaître les attentes du laboratoire de bactériologie. Ici dans notre laboratoire et notre idée d'algorithme pour une utilisation en routine de l'UF4000, le seuil de **10 bactéries/ μl** permettrait de ne pas passer à côté d'une culture positive (VPN = 100%, Sensibilité = 100%). Mais ce seuil ne voudra en aucun prédire une culture positive (Spécificité = 14%). Il permettrait aussi d'éliminer un faux positif à la culture (par contamination) : s'il y a moins de 10 bactéries/ μl , alors il y a 0% de chance d'avoir une culture positive.

La bactériosynovie >10 bactéries/ μl , la présence de leucocytes ($>200/\mu\text{l}$) et d'une formule leucocytaire prédominée par des cellules polynuclées serait en faveur d'une infection probable bactérienne. La présence de plus de 10 bactéries/ μl entraînerait la réalisation d'un GRAM, afin d'obtenir la forme de la bactérie, si cette dernière est présente. D'autres études seraient nécessaires pour étayer ce seuil. De plus, nous ne savons pas l'impact de la présence de cristaux dans le liquide articulaire sur le nombre de bactéries.

Enfin, avec les images des diagrammes de dispersion obtenues, nous pouvons observer qu'il y a une différence entre les nuages des GRAM + : les nuages des streptocoques semblent différents de ceux des staphylocoques. D'autres études pourraient venir appuyer cette idée.

Au vu des données, l'utilisation de l'UF4000 en routine pourrait contribuer à la bonne prise en charge du prélèvement. En *Annexe 29 (page 123)* se trouve une proposition d'un algorithme décisionnel pour la prise en charge du liquide articulaire avec l'UF4000. Cet algorithme est réalisé avec toutes les données obtenues pour le liquide articulaire : les leucocytes, la formule leucocytaire et la détection de bactéries. Aucun de ces trois éléments ne peut être interprété séparément. Comme pour chaque analyse, les renseignements cliniques sont primordiaux pour une bonne prise en charge du liquide articulaire au sein du laboratoire.

3. Autres liquides

L'ensemble des données obtenues avec le groupe *Autres liquides* tendent aussi à l'utilisation de l'UF4000 en routine.

La comparaison des leucocytes et des hématies entre les deux méthodes est satisfaisante.

Pour les leucocytes, les analyses statistiques révèlent des différences significatives entre les deux méthodes, tout comme les autres groupes analysés. Un biais de 310 leucocytes entre les deux méthodes est constaté. Ce dernier étant en accord avec l'erreur systématique obtenue avec d'autres publications.⁵⁵ La présence d'une erreur proportionnelle est aussi objectivée. Les différences majeures se situent dans les hautes concentrations en leucocytes (à partir de 500 leucocytes environ : représentation logarithmique), ces dernières sont statistiquement significatives mais ne présentent aucun impact clinique pour le patient : le seuil de significativité étant bien en deçà de cette dérive. Par contre, une relation linéaire s'observe entre les deux méthodes avec un coefficient de corrélation à 0,94. Cette bonne relation linéaire est aussi visualisée sur le mode liquide biologique de l'UF1000⁵⁷ ainsi que sur d'autres automates d'hématologie.⁵⁹

L'analyse du tableau des concordances révèle environ 91% de concordance entre les deux méthodes. Les 27 discordances observées ont été étudiées : les mêmes observations que les autres groupes peuvent être admises. Les différentes causes de variabilité de lecture de la cellule de KOVA sont mises en évidence. De nombreuses discordances sont proches de la valeur du seuil. En prenant en compte l'incertitude de mesure de la méthode manuelle et automatisée, l'ensemble de ces discordances au seuil peut s'expliquer. Aucune culture n'était positive pour l'ensemble des échantillons discordants, ceci n'a donc pas eu d'impact clinique. Concernant la comparaison de méthode pour les hématies, les tests statistiques démontrent encore une fois, une différence entre les deux méthodes. Une erreur proportionnelle est observée ainsi qu'un biais d'environ 500 hématies : ces différences s'observent dans les hautes concentrations en hématies, sûrement du fait de l'imprécision de comptage de la cellule de KOVA. Ces données sont, en réalité, comparativement à d'autres études, tout à fait correctes.⁵⁵ Les deux méthodes restent tout de même statistiquement linéaires. En pratique, cette différence n'a pas d'impact clinique sur le patient.

La cytologie automatisée pour ce groupe de liquides est donc envisageable pour une utilisation quotidienne. Les discordances observées n'ont pas eu d'impact clinique et sont principalement dues à l'imprécision de comptage de la KOVA dans les hautes concentrations en éléments.

La comparaison de la formule leucocytaire au MGG et à l'UF4000 est discutable. Il est observé 80% de concordance. En effet, 41 formules discordantes sont constatées. La plupart de ces discordances sont dues à des inversions complètes de formule : l'UF4000 donne plus de cellules polynuclées que la cellule de KOVA. Le problème de distinction des nuages dans les diagrammes de dispersion par l'algorithme Sysmex® pourrait en être la

cause. Si ces discordances majeures n'étaient pas présentes, 96% de concordance serait observée entre les deux méthodes. Il est également visualisé des différences mineures par simple écart de plus de 20% entre les formules des deux méthodes ou une formule panachée rendue au MGG et à prédominance de cellules polynuclées à l'UF4000. Pour les prélèvements hémorragiques, la formule de l'UF4000 se rapproche plus de celle sanguine. L'ensemble des discordances observées n'a pas eu d'impact clinique. Seules 3 cultures étaient positives et l'UF4000 donnait une prédominance de cellules polynuclées contrairement au MGG. Ceci est en cohérence avec le rendu de la culture.

Les données statistiques révèlent une différence entre les deux méthodes avec une différence proportionnelle et une différence systématique d'environ 15% dans les formules, comme retrouvée dans la littérature.^{55,56} La relation linéaire qui lie les deux méthodes est statistiquement significative mais de faible intensité. Ceci n'a pas été retrouvé dans la bibliographie.⁵⁵ Notre faible relation linéaire entre les deux méthodes pourrait s'expliquer par le défaut de l'algorithme de l'automate. Il est donc nécessaire que l'entreprise Sysmex® apporte les modifications de son algorithme dans la différenciation des nuages pour pouvoir utiliser l'automate en routine dans la réalisation de la formule leucocytaire.

Comme avec le groupe *Liquide articulaire*, les résultats des décomptes semi-quantitatifs ne sont pas concluants entre les deux méthodes. Les mêmes observations peuvent être émises. En *Annexe 24 (page 118)*, un abaque est proposé afin d'uniformiser le rendu des résultats et d'avoir un rendu plus objectif.

La comparaison des bactéries pour les liquides d'ascites, péricardiques et pleuraux a le même but que celle des autres groupes de liquides (bonne sensibilité / bonne VPN). Ce seuil permettrait d'intégrer le liquide biologique dans un algorithme décisionnel, par un passage en première position sur l'automate et la décision d'examens complémentaires en fonction des résultats des leucocytes, de la formule leucocytaire, le contexte clinique et ce seuil de significativité en bactéries.

La comparaison du GRAM avec l'UF4000 s'est avérée peu fructueuse. Les mêmes observations et explications peuvent être apportées que celles des autres groupes de liquides. Nous observons une grande disparité des valeurs à l'UF4000 par rapport aux GRAM positifs et négatifs. Cette comparaison GRAM-UF4000 n'a pas permis la création d'un seuil.

Afin de cerner les paramètres de sensibilité et de VPN de notre seuil, nous avons regardé ceux du GRAM par rapport à la culture. Comme décrit dans la littérature, avec nos données, le GRAM n'a qu'une sensibilité de 54% mais une bonne VPN. Nous cherchons un seuil présentant une meilleure sensibilité que celle du GRAM tout en ayant une bonne VPN.

La comparaison de l'UF4000 et de la culture montre, tout comme le GRAM, une grande disparité des valeurs en bactéries à l'UF4000 par rapport aux résultats de culture. De nombreux liquides possédant plus de 1000 bactéries/ μ l ont des cultures négatives. Et de nombreux liquides aux cultures positives ont peu de bactéries à l'UF4000. Ceci suggère l'idée d'une différence de dénombrement bactérien à l'UF4000 en fonction du type de la bactérie (comme montré pour les urines⁶⁴) et du dénombrement de bactéries mortes (due par exemple à une antibiothérapie préalable) à l'UF4000.

Dans l'optique d'utilisation de l'UF4000 en méthode de dépistage, il est nécessaire d'avoir la meilleure des sensibilités et VPN possible. Ici, nous observons ces éléments avec un seuil de **30 bactéries/ μ l**. Il possède 100% de sensibilité et 100% VPN. Avec ce seuil, on ne passerait pas à côté d'une culture positive. Mais la spécificité étant de 17%, la probabilité d'avoir une culture positive est très faible et le fait d'avoir 30 bactéries/ μ l dans un liquide ne veut absolument pas dire « positif certain en culture ». Si les bactéries sont inférieures au seuil choisi, alors il y a 0% de chance d'après notre étude, d'avoir une culture positive. Si cette dernière est positive, alors elle résulte d'une contamination. La présence de leucocytes ou de formule prédominée par des cellules polynuclées ne veut pas non plus prédire la positivité d'une culture. L'association des trois paramètres (Bactéries > au seuil / Leucocytes > au seuil / Formule prédominée par des cellules polynuclées) ne semble pas prédire à 100% d'une positivité certaine de la culture.

La recherche du contexte clinique pour les cultures négatives ayant plus de 1000 bactéries/ μ l à l'UF4000 a permis de confirmer la détection de bactéries mortes à l'UF4000 suite à une antibiothérapie, responsable elle aussi, de la culture négative. L'étude du contexte clinique a également suggéré l'idée d'une interférence cellules tumorales – présence de bactéries à l'UF4000 : 3 des 22 liquides ayant plus de 1000 bactéries/ μ l et de culture négative était d'origine néoplasique. Ce résultat serait-il dû à la présence de cellules tumorales ? D'une chimiothérapie ? Ces questions restent en suspens dans cette étude. D'autres analyses seraient nécessaires afin d'étayer ces idées.

Enfin, avec les images des diagrammes de dispersion obtenues, nous pouvons observer qu'il y a bien une différence entre les nuages des GRAM + et des GRAM -. Il y a aussi une différence entre les nuages des streptocoques et ceux des staphylocoques. D'autres études pourraient venir appuyer cette idée, remarquée dans les liquides articulaires et les autres liquides.

Nous pouvons donc conclure sur l'utilisation de l'UF4000 pour améliorer la prise en charge en routine des liquides d'ascite, pleuraux, et péricardiques. En *Annexe 30 (page 125)*

se trouve une proposition d'un algorithme décisionnel pour la prise en charge de ces liquides avec l'UF4000. Cet algorithme est réalisé avec toutes les données obtenues : les leucocytes, la formule leucocytaire et la détection de bactéries. D'autres études sont évidemment nécessaires pour affiner ce premier algorithme. Il est créé sous réserve d'une correction du logiciel de séparation des nuages de points par Sysmex® pour les formules leucocytaires.

4. Conclusion de la comparaison de méthode

Pour l'ensemble des groupes de liquides analysés au cours de cette étude, la comparaison de méthode est conforme aux exigences du fournisseur et à nos exigences :

- les liquides biologiques peuvent être passés en première intention.
- le décompte leucocytes/hématies est fiable pour les groupes de liquides analysés.
- la formule leucocytaire est satisfaisante pour les trois groupes de liquides, sous réserve d'une correction de l'algorithme défaillant de Sysmex®.
- la création de seuil en bactéries pour les trois groupes de liquides présente un intérêt. Si ce seuil dispose d'une bonne VPN, il permettra d'éliminer les vrais négatifs en première intention et de définir ainsi les faux positifs en culture. S'il dispose d'une bonne sensibilité, alors il permettra d'avoir le moins de faux négatifs, et pourra être utilisé en méthode de dépistage. La réalisation d'examen complémentaires sera effectuée selon l'ensemble des données analysées.

La plupart des données cytologiques (leucocytes/hématies) obtenues avec les liquides biologiques sur l'UF4000 sont en concordances avec celles obtenues sur les automates d'hématologie.^{59,61} Les seuils significatifs en bactéries sont différents en fonction des types de liquides, et peuvent être différents selon les attentes des laboratoires. De nombreuses études réalisées sur les bactéries du module urine de cet automate montraient une grande disparité des seuils de bactériurie.^{62,63,64,65} Cet automate destiné en premier lieu à l'analyse cyto-bactériologique des urines, montre ainsi une grande hétérogénéité de ses compétences à la fois dans le domaine urinaire mais aussi dans le domaine des liquides biologiques.

D'un point de vue statistique, les essais de comparaison entre les deux méthodes ne sont pas corrélés. Ce fait était attendu : les méthodes automatisées sont différentes des méthodes manuelles. La plupart des discordances entre ces méthodes n'a pas entraîné d'effets clinique et/ou thérapeutique chez le patient. C'est cette dernière notion qui est la plus

importante dans la vérification de méthodes et la mise en place d'une nouvelle technique dans un laboratoire de bactériologie.

C. Perspectives d'utilisation en routine

L'UF4000 est un automate : il nécessitera toujours une intervention manuelle. En effet, il ne pourra jamais se substituer à la coloration de GRAM qui détecte la forme de la bactérie. Il restera tout de même d'une aide précieuse pour cet examen manuel. La présence de débris, de morceaux ou d'une trop grande viscosité dans les liquides resteront des facteurs limitant pour leur analyse. Les débris et morceaux peuvent boucher l'aiguille d'aspiration et sont aussi sources d'interférences analytiques. Ceci a déjà été constaté lors de précédentes études.⁵⁵

Pour le passage des liquides articulaires sur l'UF4000, il sera obligatoirement nécessaire d'effectuer une dilution minimale au 10^{ème}, étape pré-analytique pouvant aussi apporter une source d'erreur et d'imprécision du résultat.

Les liquides analysés devront obligatoirement contenir 600µl. Ce volume important est le point critique pour l'analyse des LCR mais peut être aussi un avantage pour le nombre important de cellules comptées et analysées. Ces liquides ne pouvant pas être analysés par l'appareil, devront être analysés par des méthodes manuelles classiques. L'harmonisation du décompte en cellule de KOVA et du rendu de la formule leucocytaire des techniciens pourrait être envisagée pour améliorer les pratiques, notamment avec la formation continue.

Cependant, l'UF4000 présente les nombreux avantages d'une technique automatisée. Notre étude émet l'idée qu'il peut remplacer la cytologie manuelle (KOVA) et la formule leucocytaire (sous condition d'une modification du logiciel par Sysmex®) en première intention si l'aspect et la quantité du prélèvement le permettent. En effet, par rapport à ces deux méthodes manuelles, l'UF4000 donne un résultat plus juste, plus reproductible, et ayant le moins de variabilité possible. L'incertitude de mesure de cette méthode est faible et peut être réellement quantifiée et notifiée au prescripteur contrairement aux méthodes manuelles. Le résultat rendu est standardisé.

La semi-quantification des cellules mononuclées et polynuclées réalisée pour les liquides contenant peu de leucocytes (inférieurs au seuil fixé), pourra être harmonisée grâce à cette automate. La quantification des éléments des prélèvements purulents et hémorragiques pourra être également effectuée de façon plus reproductible et précise que la méthode

manuelle. Leur passage pourra être effectué seulement s'ils ne contiennent pas de morceaux ou de débris.

Pour les prélèvements hémorragiques, l'interprétation de la numération et de la formule leucocytaire se fera évidemment en accord avec les données de contamination par les leucocytes sanguins.^{1,2} D'autres études seraient nécessaires pour prouver aussi l'utilité de rendre une formule leucocytaire, par exemple, pour un prélèvement hémorragique où cette dernière serait représentative du sang et non pas du liquide. D'autant plus que l'on ne connaît pas l'impact des hématies sur le décompte des bactéries ou des leucocytes à l'UF4000.

Par ailleurs, l'automate permet également la recherche de bactéries, technique manuelle peu sensible et nécessitant de la pratique, de la rigueur et de la formation. Le module urine possède un système d'alarmes (GP ? /GN ?) permettant d'avertir l'utilisateur sur la présence potentielle de bactéries, ce système d'alarme pourrait être également envisagé pour le module liquide biologique en fonction des seuils choisis pour chaque laboratoire. D'autres études seraient nécessaires pour évaluer ces seuils dans d'autres centres hospitaliers.

Avec l'UF4000, le résultat rendu peut être plus rapide (en 10min) qu'actuellement (environ 30min) : ceci serait un gain de temps sur la prise en charge du patient. De plus l'appareil pourrait transmettre directement ses données au Middleware supprimant ainsi toute intervention écrite humaine qui peut être source d'erreur. La traçabilité serait accrue et le flux de travail rationalisé. Le temps technique libéré permettrait d'orienter le technicien vers une tâche à plus forte valeur ajoutée ou la consécration de plus de temps sur la lecture de GRAM ou la réalisation de techniques moléculaires comme la PCR.

Son intégration à la routine du laboratoire pourrait être totalement envisageable et optimale grâce à l'ensemble des données obtenues dans cette thèse.

L'étude des cristaux pour les liquides articulaires a été réalisée durant cette thèse. Les résultats prometteurs feront l'objet d'un mémoire.

VI. Conclusion

L'ensemble des données de vérification analytique pure et les données de comparaison de méthode tient les promesses émises par Sysmex®. L'UF4000 peut être utilisé en routine dans le laboratoire en application des algorithmes proposés pour les différents liquides biologiques.

Règles générales à appliquer pour l'utilisation en routine de l'automate	
Manipulation générale	<ul style="list-style-type: none"> Mise en cupules des liquides sous PSM avec gants Cupules stockées sous la hotte dans un sachet hermétiquement fermé Transfert Cupule du PSM => à l'automate avec gants dans un délai le plus court possible
	<ul style="list-style-type: none"> Dilution 10^{ème} obligatoire pour tous les liquides articulaires Dilution possible si trop hémorragique ou purulent pour les autres liquides Pas de débris, morceaux pour tous les liquides Homogénéisation nécessaire avant mise en cupule Volume minimal de 600 µl
Pré-analytique	Fidélité : Vérifiée
	Limites de détection Leucocytes : 0,26/µl Hématies : 2,54/ µl Bactéries : 0,44/ µl
Analytique	Limites de quantification Leucocytes : 2/µl Hématies : 10/ µl Bactéries : 5/ µl Si résultat < LQ : « <i>non quantifiable : inférieur à la limite de quantification de l'automate</i> »
	Linéarité Vérifiée de la LQ à 10000/µl : <ul style="list-style-type: none"> - Si Leucocytes > 10000/µl : Dilution - Si hématies >10000/µl : « <i>Prélèvement hémorragique, >10000 hématies/µl</i> »
Post-analytique	Contamination cellulaire Leucocytes : 0,035% Hématies : 0,006% Si Leucocytes > 10000/µl : <ul style="list-style-type: none"> → Passage cupule eau physiologique → Rinçage supplémentaire
	Contamination microbienne Si >10000 bactéries/µl : <ul style="list-style-type: none"> → Passage cupule eau physiologique → Rinçage supplémentaire
Post-analytique	Incertitude de mesure : Notification au prescripteur, Relation clinico-biologique
	Comparaison de méthode Cf algorithmes de prise en charge pour chaque groupe de liquide Attention : Si > 1000 bactéries/µl : forte probabilité d'une culture positive si pas d'ATB au préalable
Post-analytique	Biologiste médical : <ul style="list-style-type: none"> - Interprétations avec les algorithmes de prise en charge pour chaque groupe de liquide. - Prise de décisions pour la réalisation de tests complémentaires.

VII. Bibliographie

1. REMIC, Référentiel en microbiologie médicale. 6^{ème} édition 2018
2. Denis et al. « **Bactériologie médicale, techniques usuelles** » Elsevier Masson 3^{ème} édition
3. Denis et al. « **Bactériologie médicale, techniques usuelles** » Elsevier Masson 2^{ème} édition
4. Grancher, Jeanne. « **Biologie des liquides d'épanchement** ». *Biomérieux* (novembre 2006)
5. COFER, Collège Français des Enseignants en Rhumatologie. « **Item 307 : Douleur et épanchement articulaire. Arthrite d'évolution récente** »
6. Bas. « **Contribution de l'analyse du liquide synovial au diagnostic des affections articulaires** »
7. Damiano, Bardin. « **Liquide synovial normal et pathologique** ». *EMC - Podologie* 1, n° 4 (décembre 2005)
8. Desplaces. « **Bactériologie des infections ostéoarticulaires chez l'adulte** ». *Revue du Rhumatisme* 73, n° 2 (février 2006)
9. Bayard, Riand-Voide. « **Le liquide synovial au laboratoire** »
10. CEP, Collège Français des Enseignants de pneumologie. « **Item 202 : Epanchement pleural** »
11. Pastré et al. « **Orientation diagnostique et conduite à tenir devant un épanchement pleural** ». *La Revue de Médecine Interne* 36, n° 4 (avril 2015)
12. Magro et al. « **Diagnostic des pleurésies (hors cancer)** ». *Revue des Maladies Respiratoires* 21, n° 6 (décembre 2004)
13. Light, Richard. « **Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudates and Exudates** ». *Annals of Internal Medicine* 77, n° 4 (1 octobre 1972)
14. CNEC, Collège des Enseignants de cardiologie et Maladies vasculaires. « **Item 274 : Péricardite aigue** »
15. Vakamudi et al. « **Pericardial Effusions: Causes, Diagnosis, and Management** ». *Progress in Cardiovascular Diseases* 59, n° 4 (janvier 2017)
16. CDU-HGE, Collégiale des universitaires en Hépatogastro-Entérologie. « **Item 298 : Ascite** »
17. Buffet. « **Conduite à tenir devant une ascite** ». *EMC - Hépatologie* 7, n° 3 (juillet 2012)
18. Carrier et al. « **L'ascite non liée à la cirrhose : physiopathologie, diagnostic et étiologies** ». *La Revue de Médecine Interne* 35, n° 6 (juin 2014)
19. Rahimi et al. « **Overview of Cerebrospinal Fluid Cytology** ». In *Handbook of Clinical Neurology*, 145:563-71. Elsevier, 2018
20. De Almeida et al. « **Comparison of Cerebrospinal Fluid Lactate with Physical, Cytological, and Other Biochemical Characteristics as Prognostic Factors in Acute Bacterial Meningitis** ». *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 77, n° 12 (décembre 2019)
21. Turtzo. « **Cerebrospinal Fluid Acquisition and Analysis in Modern Clinical Practice** ». In *Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice*, 55-61. Elsevier, 2009
22. Cibas, Edmund. « **Pleural, Pericardial, and Peritoneal Fluids** ». In *Cytology*, 129-53. Elsevier, 2009
23. Bertholf et al. « **Disposable Plastic and Reusable Glass Hemacytometers for Cell Counts** ». *Laboratory Medicine* 22, n° 12 (1 décembre 1991)
24. Martin, Ploy. « **Automatisation en bactériologie** ». *Journal des Anti-infectieux* 16, n° 3 (septembre 2014)
25. Akin et al. « **Comparison of LabUMat-with-UriSed and IQ®200 Fully Automatic Urine Sediment Analysers with Manual Urine Analysis** ». *Biotechnology and Applied Biochemistry* 53, n° 2 (1 juin 2009)

26. Ince et al. « **The comparison of automated urine analyzers with manual microscopic examination for urinalysis automated urine analyzers and manual urinalysis** ». *Practical Laboratory Medicine* 5 (11 mars 2016)
27. Bakan et al. « **Evaluation of the Analytical Performances of Cobas 6500 and Sysmex UN Series Automated Urinalysis Systems with Manual Microscopic Particle Counting** ». *Biochemia Medica* 28, n° 2 (15 juin 2018)
28. Bakan et al. « **Comparison of Cobas 6500 and Iris IQ200 fully-automated urine analyzers to manual urine microscopy** ». *Biochemia Medica* 26, n° 3 (15 octobre 2016)
29. Fabbro et al. « **Evaluation of the performances of the UF-1000i® automated urine analyzer** ». *Annales de biologie clinique* 69, n° 4 (juillet 2011)
30. Previtali et al. « **Performance Evaluation of the New Fully Automated Urine Particle Analyser UF-5000 Compared to the Reference Method of the Fuchs-Rosenthal Chamber** ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 472 (septembre 2017)
31. Allain et al. « **Performance analysis of the Sysmex UF4000/UD10 for diagnosis of urinary tract infections** ». *Annales de Biologie Clinique* 77, n° 6 (décembre 2019)
32. Bottini et al. « **Comparison between Automated and Microscopic Analysis in Body Fluids Cytology** ». *International Journal of Laboratory Hematology* 37, n° 2 (avril 2015)
33. Aguadero et al. « **Evaluation of Biological Fluid Analysis Using the Sysmex XN Automatic Hematology Analyzer** ». *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry* 94, n° 5 (2018)
34. Xu et al « **Evaluation of Sysmex XN-1000 hematology analyzer for cell count and screening of malignant cells of serous cavity effusion** ». *Medicine* 96, n° 27 (7 juillet 2017)
35. Fleming et al. « **Clinical Relevance and Contemporary Methods for Counting Blood Cells in Body Fluids Suspected of Inflammatory Disease** ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 53, n° 11 (octobre 2015)
36. Van Acker et al. « **Automated Flow Cytometric Analysis of Cerebrospinal Fluid** ». *Clinical Chemistry* 47, n° 3 (mars 2001)
37. Maleb et al. « **Cytological Examination of Cerebrospinal Fluid: Sysmex UF-1000i versus Optical Microscopy** ». *Analytical Biochemistry* 589 (15 janvier 2020)
38. Fleming et al. « **UF-1000i: Validation of the Body Fluid Mode for Counting Cells in Body Fluids** ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 52, n° 12 (1 janvier 2014)
39. Buoro et al. « **Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counts Using the New Body Fluid Mode of Sysmex UF-1000i** ». *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 30, n° 5 (septembre 2016)
40. Goubard et al. « **Performance of the Iris IQ(R)200 Elite Analyser in the Cell Counting of Serous Effusion Fluids and Cerebrospinal Drainage Fluids** ». *Journal of Clinical Pathology* 64, n° 12 (1 décembre 2011)
41. Sysmex. « **UF-4000 Informations générales** ». Version 17/12
42. Sysmex. « **UF-4000 Fonctionnement de base** ». Version 17/12
43. Sysmex. « **UF-Séries Clinical Case Study** » 2017
44. COFRAC, Norme NF EN ISO 15189
45. COFRAC. « **SH REF 02 : Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870** ». Révision 06
46. COFRAC. « **SH INF 50 : Portées-types d'accréditation** ». Révision 07
47. COFRAC. « **SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale** ». Révision 01
48. QUAMIC, Comité qualité de la société française de microbiologie. 1ère édition 2017
49. Vassault et al. « **Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse** ». 2017

50. Sysmex. « **Guide d'utilisation pour la vérification des méthodes UF5000/UD10** ». 2017
51. COFRAC. « **SH FORM 43 : Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale** ». Révision 01
52. Bland, Altman. « **Comparing Methods of Measurement: Why Plotting Difference against Standard Method Is Misleading** ». *The Lancet* 346, n° 8982 (octobre 1995)
53. COFRAC. « **SH GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale** ». Révision 00
54. Seghezzi et al. « **Preliminary Evaluation of UF-5000 Body Fluid Mode for Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counting** ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 473 (octobre 2017)
55. Koo et al. « **Comparison of Red Blood Cell, White Blood Cell and Differential Counts between UF-5000 System and Manual Method** ». *Journal of Laboratory Medicine and Quality Assurance* 41, n° 3 (30 septembre 2019)
56. Cho et al. « **Performance Evaluation of Body Fluid Cellular Analysis Using the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Sysmex XN-350, and UF-5000 Automated Cellular Analyzers** ». *Annals of Laboratory Medicine* 40, n° 2 (mars 2020)
57. Buoro et al. « **Analytical Evaluation of Sysmex UF-1000i for Flow Cytometric Analysis of Peritoneal Fluid** ». *Clinical Biochemistry* 45, n° 15 (octobre 2012)
58. Andersen et al. « **Carryover Issues with UF-5000 Urine Flow Cytometry – How Did We Miss It?** » *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 58, n° 4 (26 mars 2020)
59. Fleming et al. « **Validation of the Body Fluid Module on the New Sysmex XN-1000 for Counting Blood Cells in Cerebrospinal Fluid and Other Body Fluids** ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 50, n° 10 (1 janvier 2012).
60. Lussier et al. « **Atlas des cellules et des cristaux du liquide synovial** ». Version 1.1
61. Jonge et al « **Evaluation of the New Body Fluid Mode on the Sysmex XE-5000 for Counting Leukocytes and Erythrocytes in Cerebrospinal Fluid and Other Body Fluids** ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 48, n° 5 (1 janvier 2010)
62. Ren et al « **Rapidly Discriminating Culture-Negative Urine Specimens from Patients with Suspected Urinary Tract Infections by UF-5000** ». *Bioanalysis* 10, n° 22 (novembre 2018)
63. De Rosa et al. « **Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures** ». *Clinica Chimica Acta* 484 (1 septembre 2018)
64. Kim et al. « **Rapid Screening of Urinary Tract Infection and Discrimination of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by Automated Flow Cytometric Analysis Using Sysmex UF-5000** ». *Journal of Clinical Microbiology* 56, n° 8 (août 2018)
65. Allain et al « **Performance analysis of the Sysmex UF4000/UD10 for diagnosis of urinary tract infections** ». *Annales de Biologie Clinique* 77, n° 6 (décembre 2019)

VIII. Annexes

Annexe 1 : Proposition de tableau récapitulatif pour le liquide articulaire

		Normal	Transsudat		Exsudat : Inflammatoire	
			Non inflammatoire	Réactionnelle	Microcristalline	Septique
Examen macroscopique	Couleur	Jaune pâle	Paille	Paille	Opalescent	Variable
	Viscosité	Très élevée	Elevée	Faible	Faible	Variable
	Transparence	Transparent	Transparent	Transparent	Opaque	Opaque
Examen microscopique cytologique	Leucocytes/mm ³	200 ^{3,6,9} 200-600 ⁸	200 - 2000 ^{6,9} (< 1000 ^{2,4,5,7})	2000 - 50000 ^{3,4}	2000 - 20000 ⁴	2000 - 50000 ^{3,4} >10000 ^{1,5} 50000 souvent >100000 ^{6,7}
	% PN à la formule	<25% ^{3,6,9}	<25% ^{6,9} <50% ⁵ / Panachée ⁴	>50% ^{3,5,6,9} >75% ⁴	>50% ^{3,5,6,9} >75% ⁴	>75% ^{4,6,9} 80-90% ^{1,3,5,6,8}
	Cristaux	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
Examen microscopique bactériologique : GRAM		Pas de germe	Pas de germe	Pas de germe	Pas de germe	Présence +/- de germe
Examen biochimique : Protéines		<20g/l ³ <25g/l ⁹	< 30g/l ⁹ <40g/l ⁵	> 40g/l ^{5,9} > 45g/l ⁴ > 50g/l ³	> 40g/l ^{5,9} > 45g/l ⁴ > 50g/l ³	> 40g/l ^{5,9} > 45g/l ⁴ > 50g/l ³

Annexe 2 : Proposition de tableau récapitulatif pour le liquide pleural

		Transsudat		Exsudat : Inflammatoire		
		Non inflammatoire	Bactérien	Tuberculeux	Métastatique	Autres
Examen macroscopique	Aspect	Jaune citrin	Variable	Variable	Souvent hémorragique	Variable
Examen microscopique cytologique	Leucocytes/mm ³	< 1000 ⁴ < 500 ^{2,3}	> 10000 ^{1,4,12} >500 ^{2,3} Empyème : > 2000 ^{2,3} souvent > 25000 ⁴	1000 à 10000 ⁴ > 500 ^{2,3}	1000 à 10000 ⁴ > 500 ^{2,3}	1000 à 10000 ⁴ > 500 ^{2,3}
	Formule leucocytaire	Cellules mésothéliales	> 50% PN ^{1,4}	> 70% lymphocytes ⁴	Cellules anormales	Variable
Examen microscopique bactériologique : coloration de GRAM		Négatif	Positif plus ou moins	Négatif	Négatif	Négatif
Examen biochimique : Protéines		< 25g/l ¹⁰ < 30g/l ^{2,3,4}	> 30g/l ⁴ > 35g/l ¹⁰ > 50g/l ^{2,3} Empyème	> 30g/l ^{2,3,4} > 35g/l ¹⁰	> 30g/l ^{2,3,4} > 35g/l ¹⁰	> 30g/l ^{2,3,4} > 35g/l ¹⁰

Annexe 3 : Proposition de tableau récapitulatif pour le liquide d'ascite

		Transsudat : non inflammatoire			Exsudat : Inflammatoire	
		Cirrhose et autres transsudats	ISLA	Insuffisance cardiaque	Tuberculose péritonéale	Autres exsudats
Examen macroscopique	Aspect	Jaune citrin	Trouble	Jaune citrin	Ambré	Variable
Examen microscopique cytologique	Leucocytes/mm ³	-	-	< 300 ⁴	> 1000 ⁴ 500-1500 ¹⁷	300 - 500 ⁴
	Formule leucocytaire	< 250/mm ³ PN ⁴	> 250/mm ³ PN ^{1,4,16,17}	Cellules mésothéliales	> 70% Lymphocytes ⁴	Variable
Examen microscopique bactériologique : coloration de GRAM		Négatif	Positif plus ou moins	Négatif	Négatif	Négatif
Examen biochimique : Protéines Gradient Albumine Sérum - Ascite		< 25g/l ^{4,16} > 11g/l ¹⁷	< 25g/l ^{4,16} > 11g/l ¹⁷	> 25g/l ^{4,16} > 11g/l ¹⁷	> 25g/l ^{4,16} < 11g/l ¹⁷	> 25g/l ^{4,16} < 11g/l ¹⁷

Annexe 4 : Proposition de tableau récapitulatif pour le LCR

		LCR normal	LCR trouble	LCR lymphocytaire	LCR lymphocytaire	LCR panaché
Examen macroscopique	Aspect	Eau de roche, clair	Trouble	Clair	Clair	Clair ou trouble
Examen microscopique cytologique	Leucocytes/mm³	< 5 ^{1,2,3,19} Adulte < 10-30 ^{1,2} Nouveau-né	> 200 ^{1,2}	100-500 ¹ 10-100 ^{2,19}	100-500 ^{1,2} 50-500 ¹⁹	> 100 ¹ 100-500 ²
	Formule leucocytaire	-	Prédominée par PN	Prédominée par Lymphocytes Sauf Entérovirus	Prédominée par Lymphocytes	Environ 50% PN 50% Lymphocytes
Examen biochimique	Protéïnorachie	0,15 – 0,45 g/l	Augmentée >1 ²	Normale <1 ²	Augmentée >1 ²	Augmentée >1 ²
	Glycorachie	50-66% glycémie	< 50% glycémie	Normale	Hypoglycorachie	Normale ou basse
Orientation diagnostic		Aucune	Méningite Bactérienne	Méningite virale Fongique	Méningite tuberculeuse	Listeria Méningite débutante

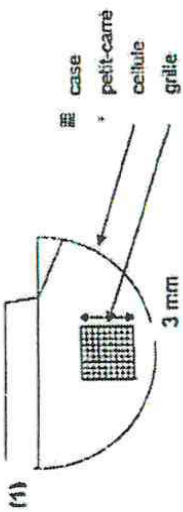
Annexe 5 : Extrait de la procédure applicable au laboratoire CHU AMIENS - PICARDIE pour la prise en charge des liquides biologiques
Examen cytologique et mise en culture



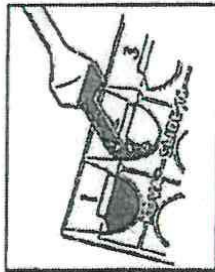
<p>Examen cytologique => décompte leucocytes/hématies en cellule de Kova</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si < 10 leucocytes/mm³ : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre le décompte de leucocytes / hématies o Pas d'examen cytologique qualitatif : pas de formule leucocytaire au MGG o Pas d'examen bactériologique direct : pas de recherche de bactérie au GRAM : Sauf en cas de purpura fulminans - Si > 10 leucocytes/mm³ : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre le décompte de leucocytes / hématies o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame en cyto-centrifugation et coloration de MGG avec le Kit RAL® : formule leucocytaire (%PN / %Cellules mononuclées) effectuée o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame en cyto-centrifugation et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectuée - Si décompte impossible (prélèvement hémorragique, coagulé etc.) : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre Numération impossible / Formule impossible o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de MGG avec le Kit RAL® : résultat semi-quantitatif du nombre de polynucléaires et de cellules mononuclées o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectué <p>Mise en culture : Ensemencement d'une gélose PVX + 1 bouillon cœur cervelle (CC) pour tout LCR Si > 10 leucocytes/mm³ ou Numération impossible : Ajout d'une gélose sang AO et AA</p>	<p>LCR</p>
<p>Examen cytologique => décompte leucocytes/hématies en cellule de Kova</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si < 200 leucocytes/mm³ : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre le décompte de leucocytes / hématies o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de MGG avec le Kit RAL® : résultat semi-quantitatif du nombre de polynucléaires et de cellules mononuclées o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectué - Si > 200 leucocytes/mm³ : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre le décompte de leucocytes / hématies o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame en cyto-centrifugation et coloration de MGG avec le Kit RAL® : formule leucocytaire (%PN / %Cellules mononuclées) effectuée o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame en cyto-centrifugation et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectuée - Si décompte impossible (prélèvement hémorragique, coagulé etc.) : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre Numération impossible / Formule impossible o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de MGG avec le Kit RAL® : résultat semi-quantitatif du nombre de polynucléaires et de cellules mononuclées o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectué <p>Mise en culture : Ensemencement d'une gélose sang AO et AA, d'une gélose chocolat (PVX sous CO₂) et d'un bouillon cœur cervelle</p>	<p>Liquide articulaire</p>
<p>Examen cytologique => décompte leucocytes/hématies en cellule de Kova</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si < 100 leucocytes/mm³ : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre le décompte de leucocytes / hématies o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de MGG avec le Kit RAL® : résultat semi-quantitatif du nombre de polynucléaires et de cellules mononuclées o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectué - Si > 100 leucocytes/mm³ : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre le décompte de leucocytes / hématies o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame en cyto-centrifugation et coloration de MGG avec le Kit RAL® : formule leucocytaire (%PN / %Cellules mononuclées) effectuée o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame en cyto-centrifugation et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectuée - Si décompte impossible (prélèvement hémorragique, coagulé etc.) : <ul style="list-style-type: none"> o Rendre Numération impossible / Formule impossible o Examen cytologique qualitatif : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de MGG avec le Kit RAL® : résultat semi-quantitatif du nombre de polynucléaires et de cellules mononuclées o Examen bactériologique direct : réalisation d'une lame par simple étalement et coloration de GRAM : recherche de bactérie effectué <p>Mise en culture : Ensemencement d'une gélose sang AO et AA et d'un bouillon CC. Pour le liquide pleural et péricardique : ajout d'une gélose PVX sous CO₂</p>	<p>Liquide pleural, d'ascite, péricardique, de dialyse péritonéale</p>

KOVA® Glasstic® Slide 10

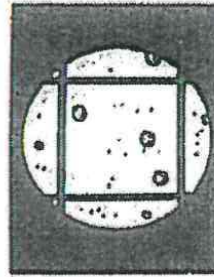
Lame de 10 cellules à numération avec grille, à usage unique
(Code produit: 87144E, 87144F)



- Volume de la cellule = 6,6 µl
- Profondeur de la cellule = 0,1 mm
- Dimension externe de la grille = 3 x 3 mm
- Volume de liquide dans la grille = 0,9 µl
- Dimension d'un petit carré = 0,33 x 0,33 mm
- Volume de liquide dans un petit carré = 0,01111 µl



Par capillarité, 6,6 µl de l'échantillon remplissent la cellule, avec une répartition homogène du sédiment. Un volume d'échantillon en excès remplit la chambre d'expansion qui entoure la cellule.



Quantifier les cellules à faible grossissement (x100) puis à fort grossissement (x400).

Ne compter que les cellules situées à l'intérieur des traits de la grille.

Se référer à la table de valeurs pour obtenir le nombre de cellules/µl.

Table de valeurs pour urine ou autres liquides corporels Non dilués

Échantillon avec comptage peu élevé		Échantillon avec comptage élevé	
Compter le nombre de cellules recherchées dans 36 petits carrés ou 4 cases de la grille.		Compter le nombre de cellules recherchées dans 10 petits carrés de cases différentes de la grille.	
Cellules comptées	Cellules/µl	Cellules comptées	Cellules/µl
1	2.500	1	9.000
2	5.000	2	18.000
3	7.500	3	27.000
4	10.000	4	36.000
5	12.500	5	45.000
6	15.000	6	54.000
7	17.500	7	63.000
8	20.000	8	72.000
9	22.500	9	81.000
10	25.000	10	90.000
11	27.500	20	180.000
12	30.000	25	225.000
13	32.500	30	270.000
14	35.000	35	315.000
15	37.500	40	360.000
16	40.000	50	450.000
17	42.500	60	540.000
18	45.000	70	630.000
19	47.500	80	720.000
20	50.000	90	810.000
25	62.500	100	900.000
30	75.000	150	1.350.000
40	100.000	200	1.800.000
50	125.000	250	2.250.000

Méthode de calcul alternatif: Faire la moyenne des cellules comptées par petits carrés et multiplier par 90 pour obtenir le nombre de cellules par µl; multiplier par 90.000 pour obtenir le nombre de cellules par ml.

Méthode de calcul pour liquides corporels dilués:

Cellules/µl = Moyenne des cellules comptées par petits carrés x 90 (facteur multiplicateur) x dilution.
ex: LCR (Liquide Céphalo-Rachidien) dilué au 1/10^{ème}; comptage total de 50 hématies dans 10 petites carrés.

$$\text{Hématies/µl} = \frac{50 \text{ cellules}}{10 \text{ carrés}} \times 90 \text{ (facteur)} \times 10 \text{ (dilution)}$$

$$= 5 \times 900 = 4.500 \text{ hématies/µl}$$

Sperme dilué au 1/20^{ème}; comptage total de 150 spermatozoïdes dans 5 petits carrés.

$$\text{Spermatozoïdes/µl} = \frac{150 \text{ cellules}}{5 \text{ carrés}} \times 90 \text{ (facteur)} \times 20 \text{ (dilution)}$$

$$= 30 \times 1.800 = 54.000 \text{ spermatozoïdes/µl}$$

Ne réutilisez pas de produits KOVA

© marque déposée par Kova International, Inc.

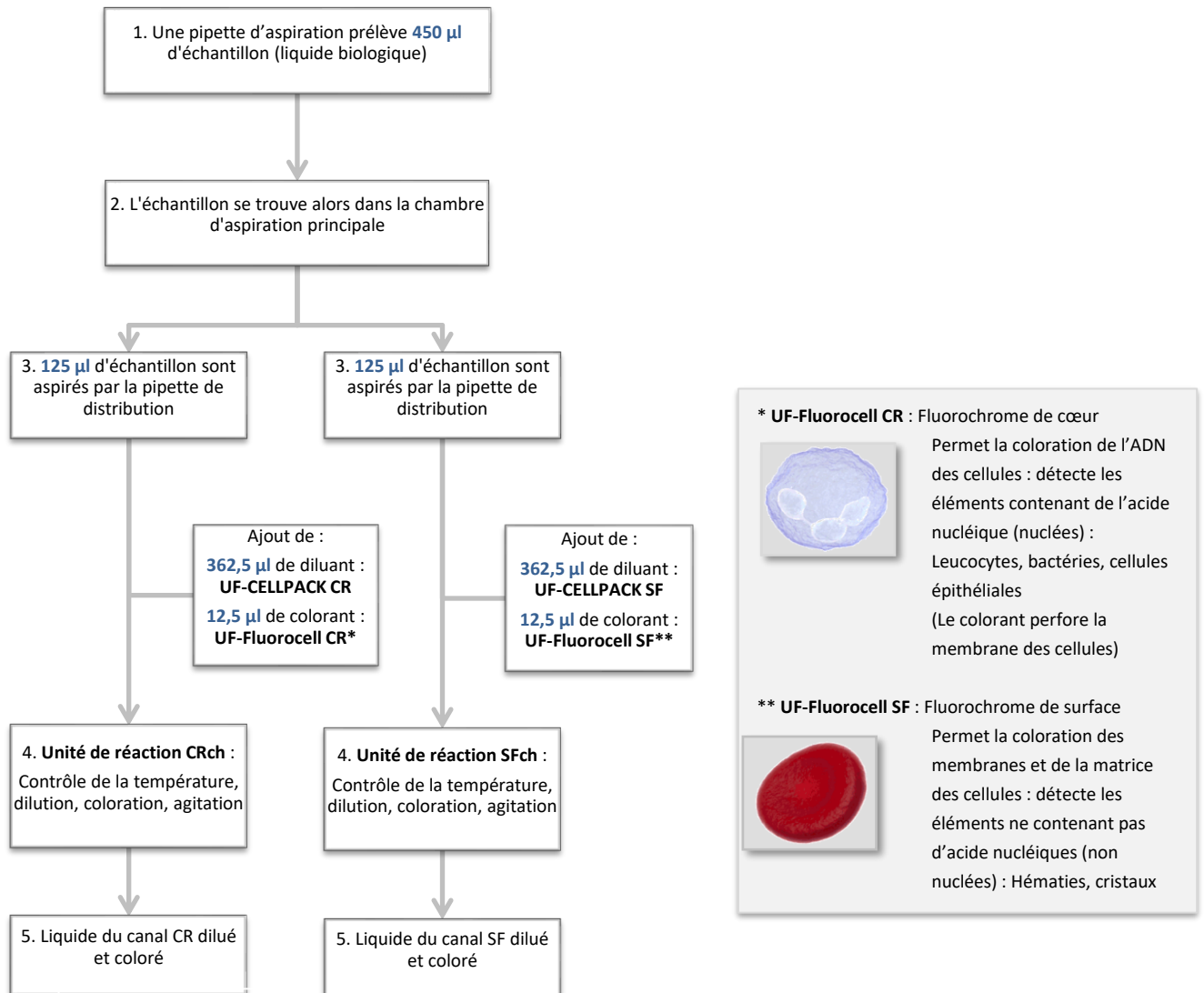
KOVA
INTERNATIONAL
www.kovalintl.com

Kova International, Inc.
7272 Chapman Avenue, Suite B
Garden Grove, California 92641
UNITED STATES
Tel: +1 855 217 6393
Fax: +1 714 993 7595

Adriana Ltd.
Part Office
Palo Alto
Meride COVA 6WE
UNITED KINGDOM
ECIREP

Annexe 7 : Etapes détaillées de l'analyse au sein de l'UF4000

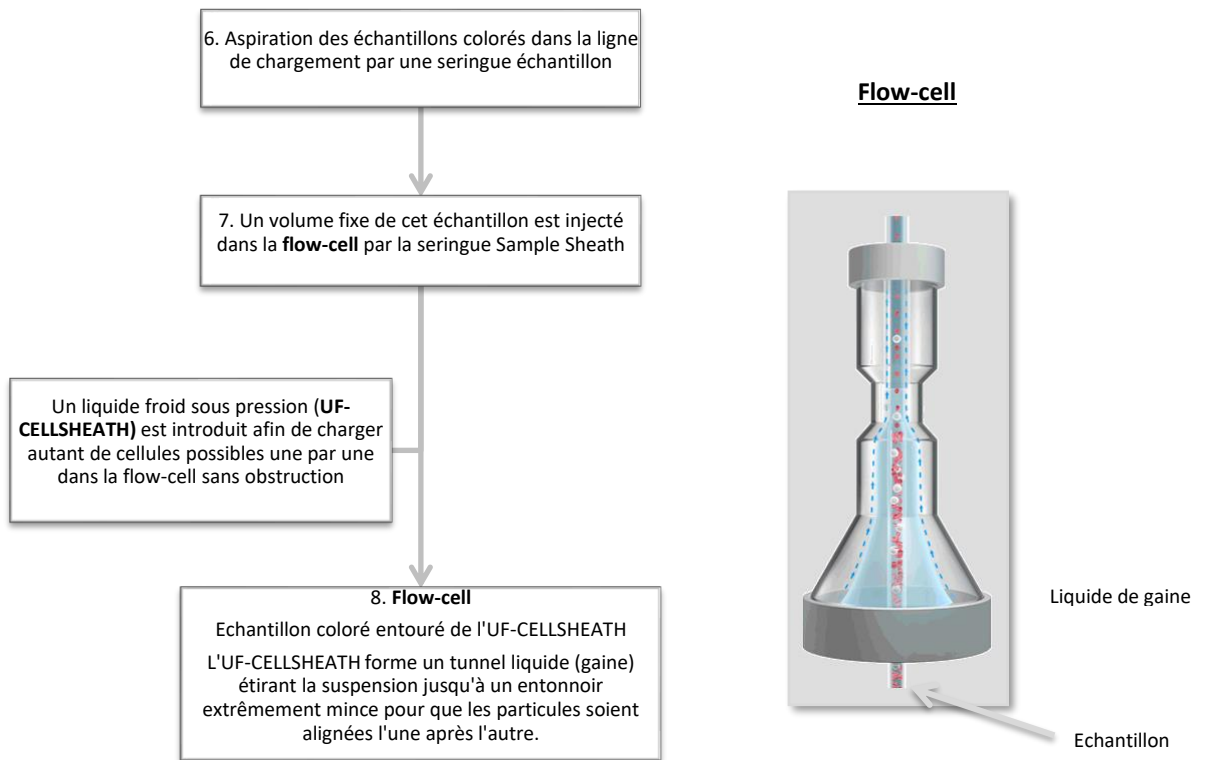
1^{ère} étape : Dilution / Coloration de l'échantillon



2^{ème} étape : Système hydraulique : focalisation hydrodynamique

Cette étape est réalisée pour les deux liquides CR et SF obtenus dans les unités de réaction.

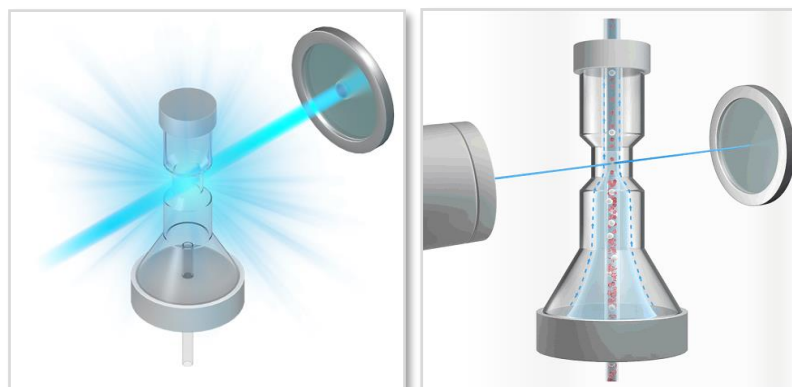
Le liquide SF passant avant le liquide CR dans la flow-cell.



Le mécanisme de flux de gaine améliore la précision et la répétabilité de la numération cellulaire. Comme les particules passent au centre de la flow cell dans l'ordre, la flow-cell ne peut pas être contaminée.

3^{ème} étape : Système optique : faisceau laser

Une lumière laser bleu de 488nm est orientée par le système de lentille du condenseur pour former une tâche de faisceau. Cette tâche de faisceau laser est pointée sur les particules passant une à une dans la flow-cell.

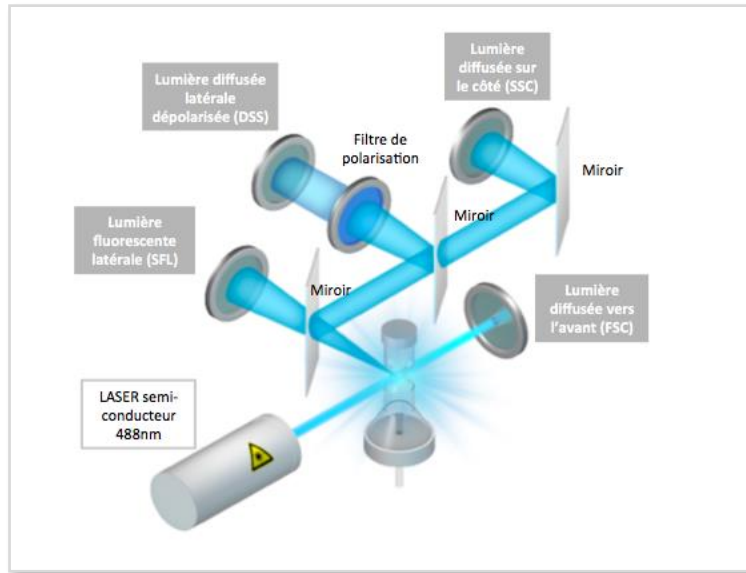


Lorsque chaque particule passe devant le faisceau laser, un ensemble de signaux lumineux individuels est généré : quatre signaux lumineux émanent pour chaque particule grâce à ce système optique :

- Lumière diffusée vers l'avant (FSC : Forward Scattered)

- Lumière diffusée sur le côté (SSC ou SS : Side Scattered light)
- Lumière diffusée latérale dépolarisée (DSS : Depolarised Side Scattered light)
- Lumière fluorescente latérale (SFL ou FL : Side Fluorescence light)

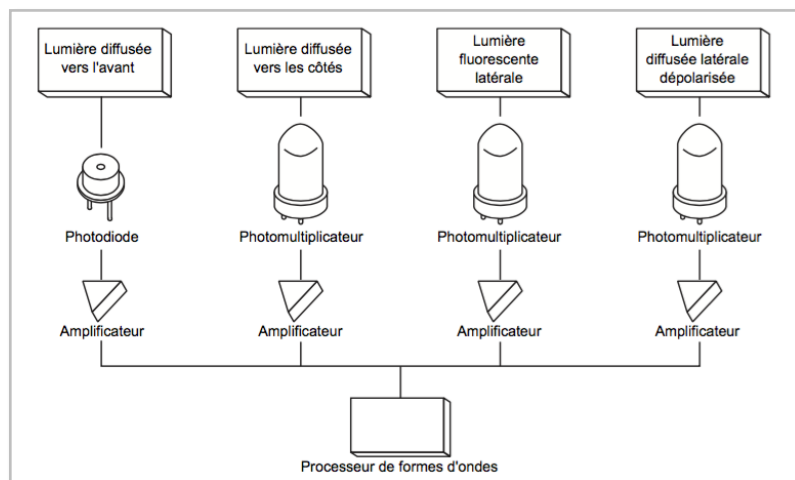
Chaque signal lumineux étant plus ou moins émis en fonction de la particule passant devant le faisceau laser.



4^{ème} étape : Système électrique

La lumière diffusée vers l'avant (FSC) est convertie en signal électrique par des photodiodes.

Les autres lumières émises (SSC, DSS et SFL) étant faibles, des photomultiplicateurs hautement sensibles sont utilisés comme photodétecteurs : ils amplifient la lumière avant de la convertir en signal électrique.



Les signaux électriques émis sont ensuite transformés en « formes d'ondes / empreintes » dans le processus de formes d'ondes.

Un histogramme unidimensionnel est généré pour chaque signal électrique reçu (chaque signal lumineux) :

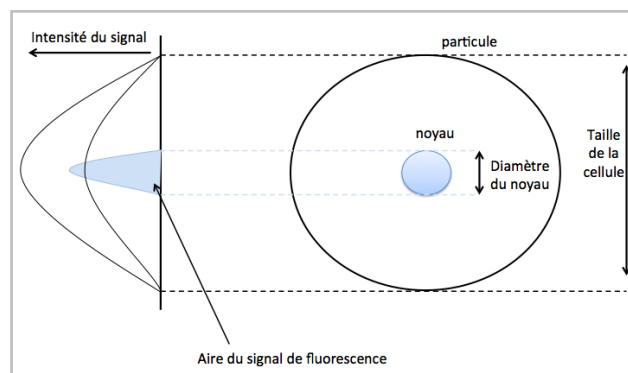
- La hauteur de la forme d'onde correspond à l'intensité de la lumière
- La largeur de la forme d'onde correspond à la durée d'impulsion de la lumière

5^{ème} étape : Qualification et quantification d'une particule

Chaque forme d'ondes est analysée par un microprocesseur :

Les caractéristiques des formes d'ondes (hauteur, largeur, aire) des quatre signaux lumineux sont analysées. Chaque forme d'ondes de chaque signal va donner des informations différentes :

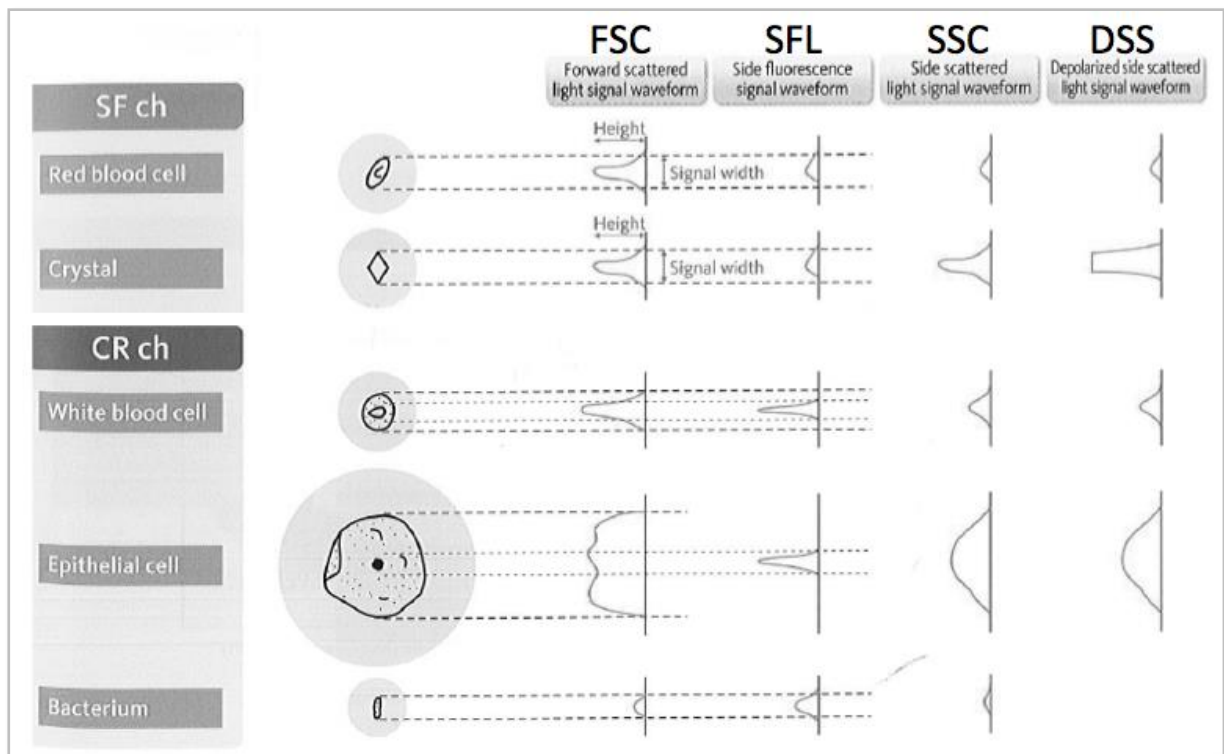
Relation Particule / Forme d'ondes



Relation signal lumineux / Forme d'ondes / Particule

<p>Lumière diffusée vers l'avant (FSC) : TAILLE ET PERMEABILITE DE LA PARTICULE</p> <p>P : hauteur du pic : Taille / hauteur des particules, indice de réfraction</p> <p>W : largeur du pic Longueur de la particule</p>	<p>Lumière diffusée sur le côté (SSC) : EPAISSEUR et ETAT DES STRUCTURES INTERNES DES PARTICULES</p> <p>A : Aire Information sur la taille et sur la complexité interne de la particule</p> <p>P : hauteur du pic Complexité interne et épaisseur de la particule</p>
<p>Lumière diffusée latérale dépolariée (DSS) : AMPLITUDE DE LA BIREFRINGENCE DE LA PARTICULE</p> <p>P : hauteur du pic Intensité de la biréfringence de la particule</p>	<p>Lumière fluorescente latérale (SFL) : DEGRE DE COLORATION DES STRUCTURES DE LA PARTICULE</p> <p>A : Aire</p> <p>CR : Capacité de coloration au fluorochrome de l'acide nucléique</p> <p>SF : Capacité de coloration au fluorochrome des composants de la matrice et la membrane cellulaire</p> <p>P : hauteur du pic : capacité de coloration au fluorochrome de la particule</p> <p>W : largeur du pic Longueur de la particule</p>

A partir des informations obtenues des formes d'ondes pour les différents signaux, chaque particule est classée et comptée à l'aide d'un algorithme de classification.



6^{ème} étape : Création d'un scattergramme

Une fois la qualification et la quantification d'une particule effectuées, un scattergramme bidimensionnel est généré (diagramme de dispersion) afin de résumer les informations à l'écran. Cela permet de visualiser des nuages de points correspondants à chacune des particules de l'échantillon. En abscisse et ordonnée des diagrammes se trouvent les informations des différents signaux qui ont permis l'identification des particules.

Dans le mode liquide biologique, 5 diagrammes de dispersion sont présentés.

Légende des scattergrammes :

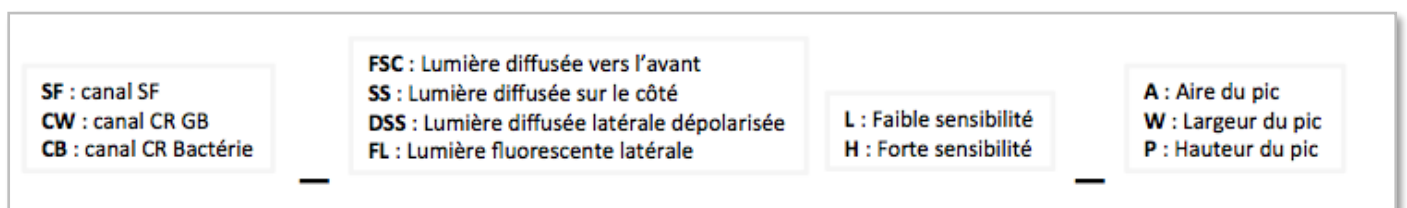
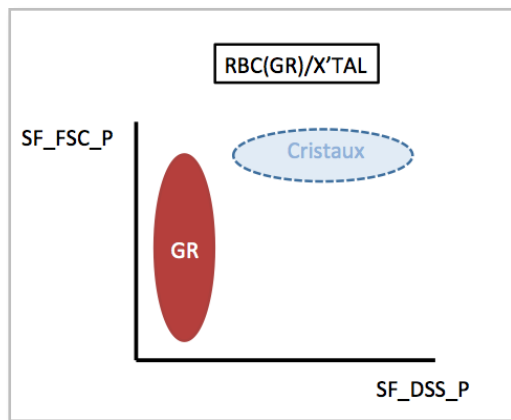


Diagramme pour le canal SF : HEMATIES et CRISTAUX



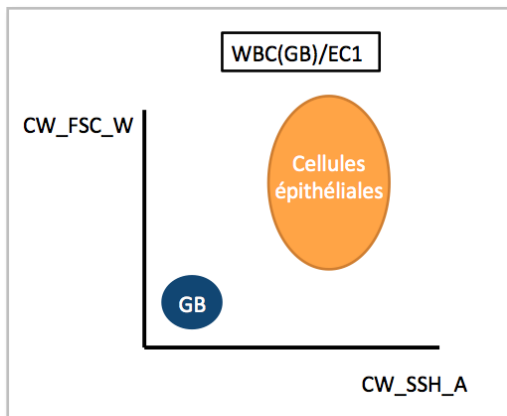
Hématies : petite taille, petite hauteur, faible indice de réfraction, pas de biréfringence => en bas à gauche.

Cristaux : forte biréfringence et plus gros que les hématies => en haut à droite.

Les cristaux sont visibles sur les résultats bruts de l'UWAM : ils ne sont pas rendus par l'entreprise Sysmex® pour les liquides biologiques mais la présence du nuage de points est visible et interprétable à l'œil de l'utilisateur.

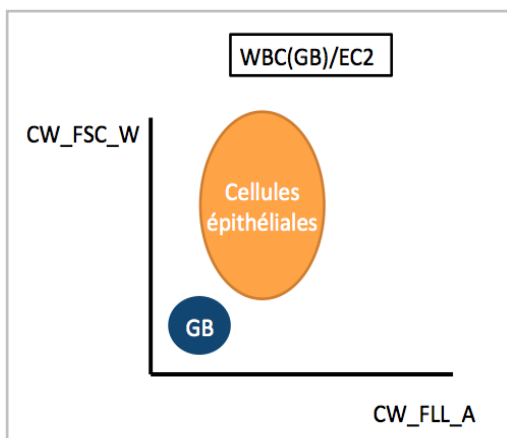
Diagrammes pour le canal CR :

LEUCOCYTES / CELLULES EPITHELIALES



Leucocytes : faible longueur, faible complexité cellulaire => en bas à gauche.

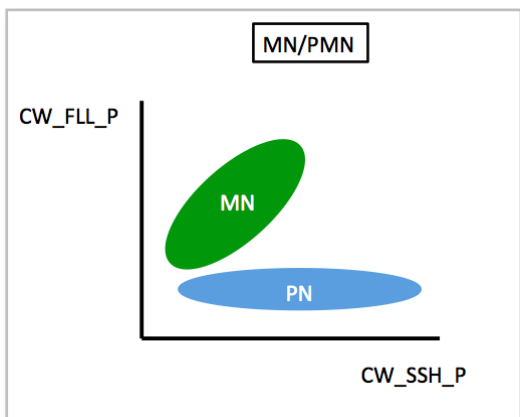
Cellules épithéliales : plus grosses que les leucocytes, forte complexité interne => en haut à droite.



Leucocytes : faible longueur, forte capacité de coloration de l'acide nucléique => en bas à gauche.

Cellules épithéliales : plus grosses cellules et moins bonne capacité de coloration de l'acide nucléique que les leucocytes => en haut au milieu.

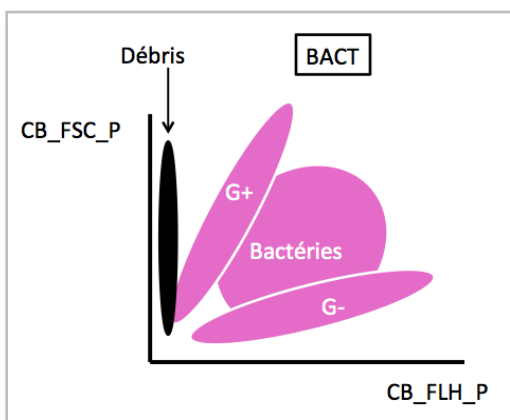
CELLULES MONONUCLEES / POLYNUCLEES



Cellules mononuclées : Faible capacité de coloration de l'acide nucléique, faible complexité interne => à gauche vers le haut.

Cellules polynuclées : Forte capacité de coloration de l'acide nucléique, importante complexité interne => en bas vers la droite.

BACTERIES

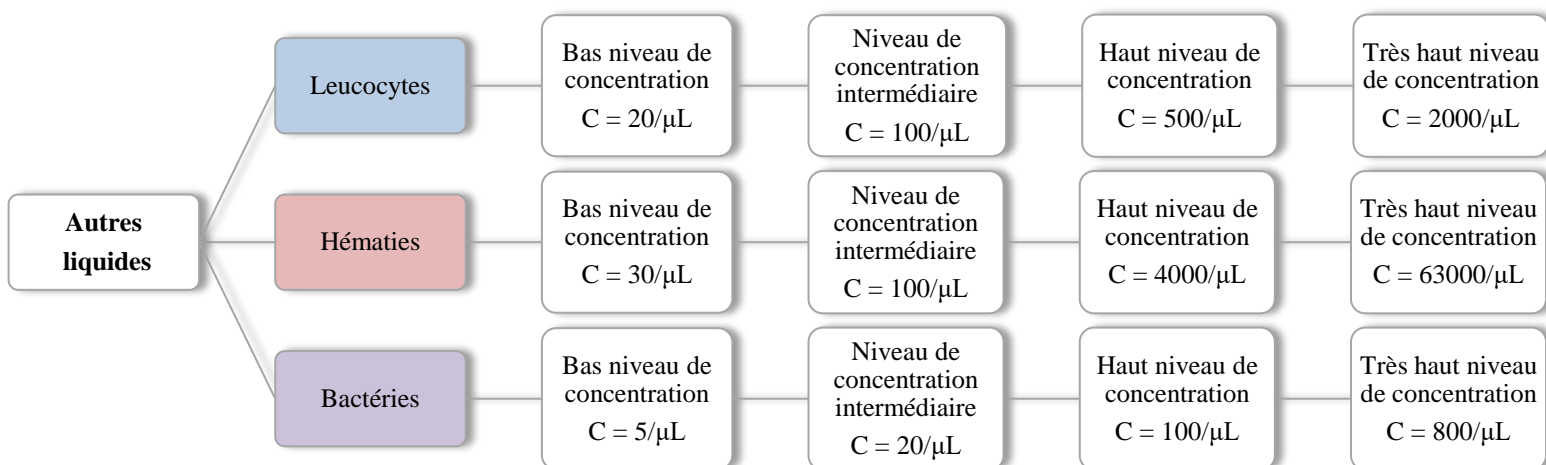
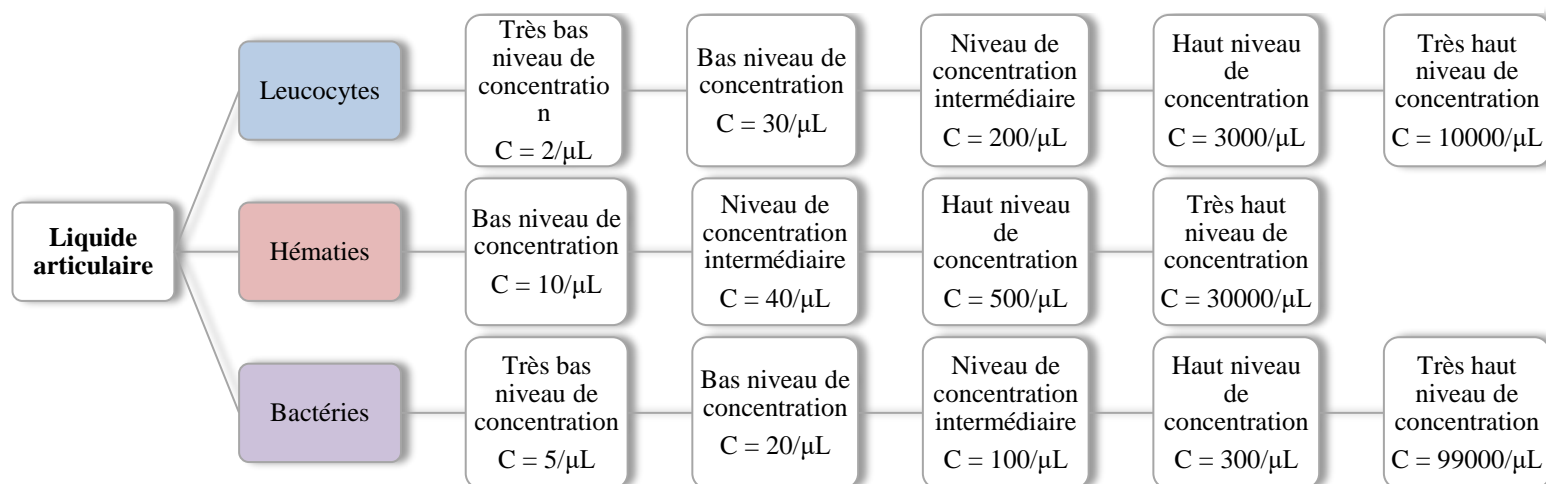
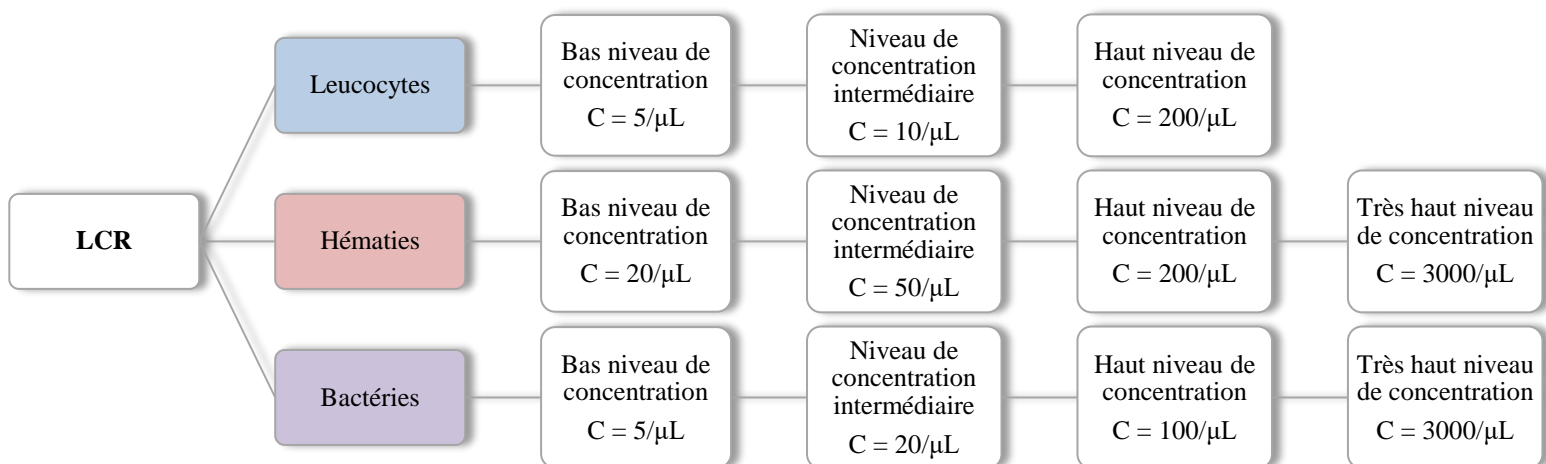


Bactéries GRAM + : importante épaisseur (peptidoglycane épais), faible capacité de coloration de l'acide nucléique (moins de pénétration du colorant à travers l'épais peptidoglycane) => à gauche vers le haut.

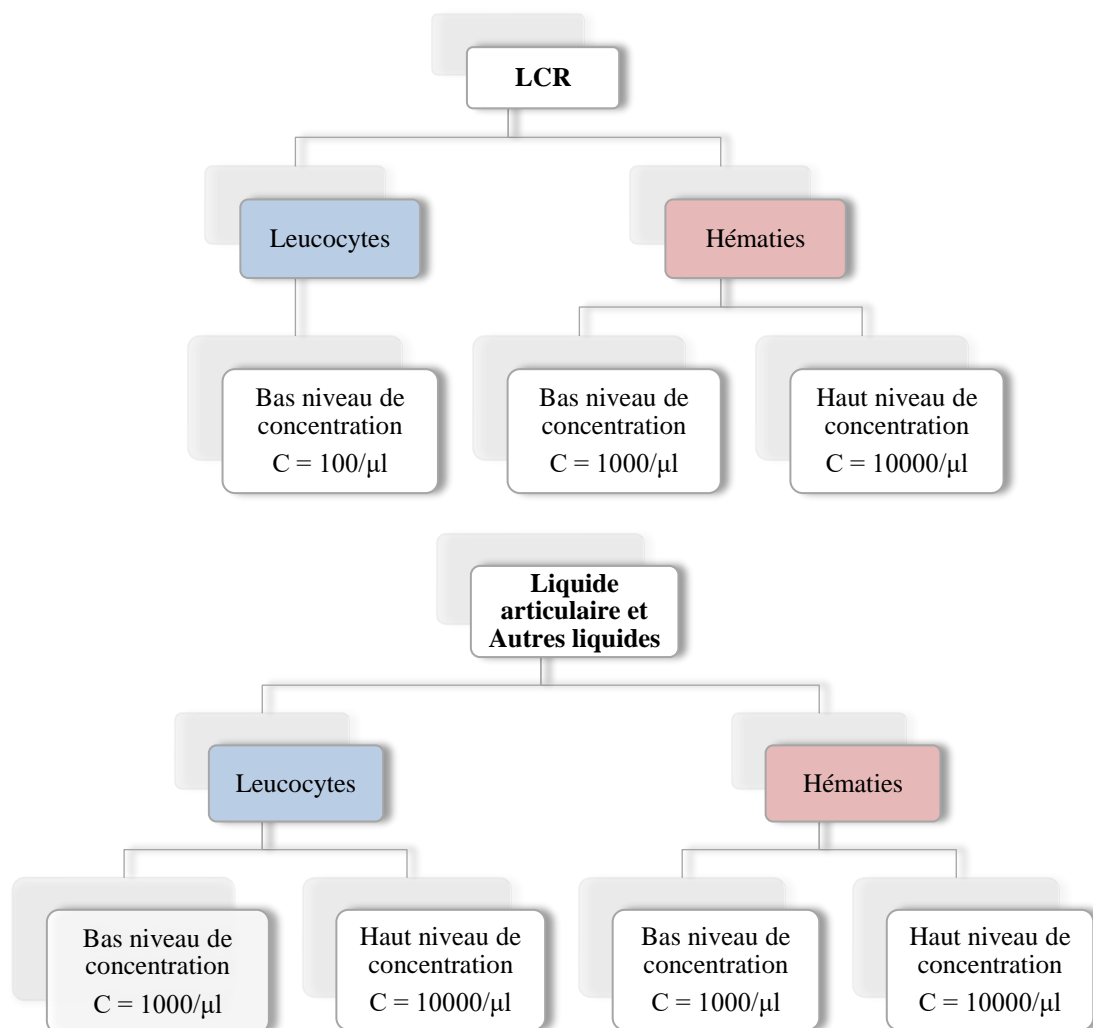
Bactéries GRAM - : Faible épaisseur (peptidoglycane mince), forte capacité de coloration de l'acide nucléique (plus de pénétration du colorant à travers le fin peptidoglycane) => en bas vers la droite.

Le type de bactéries (G+ /G-) n'est pas rendu par l'entreprise Sysmex® mais les tendances des deux nuages de points sont visibles et interprétables à l'œil de l'utilisateur. Néanmoins pour le module urine, il oriente via une note (BACT-info), la tendance G- ou G+ de la répartition des points.

Annexe 8 : Schémas récapitulatifs de la répétabilité

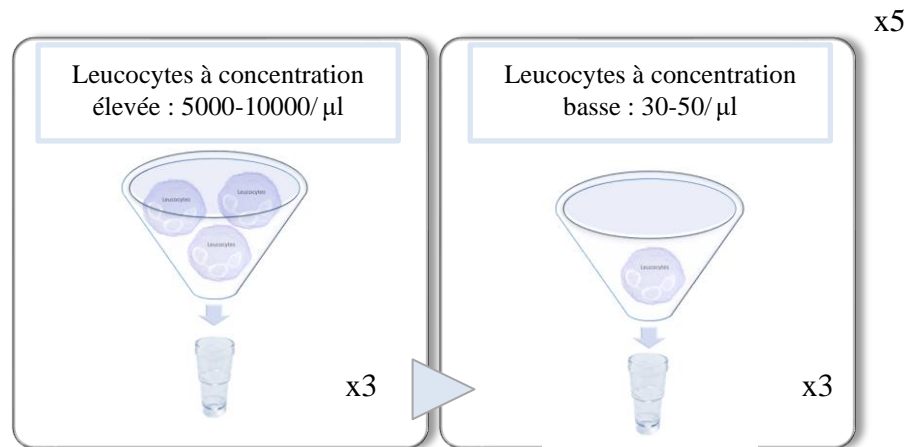


Annexe 9 : Schémas récapitulatifs de la linéarité

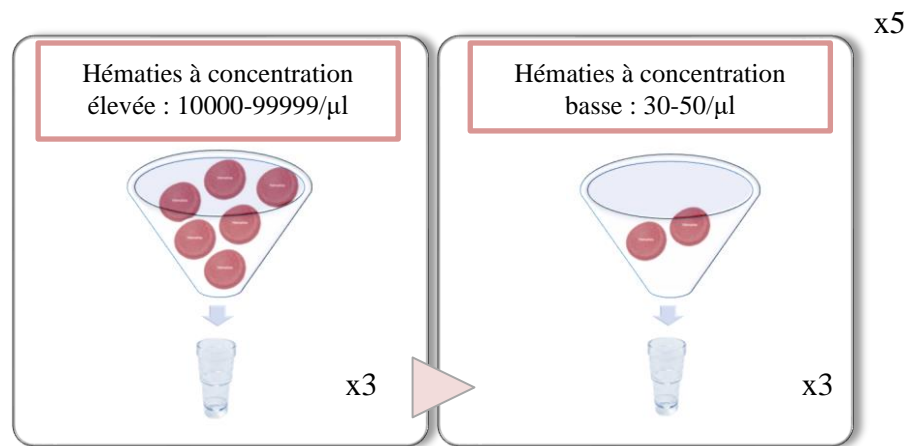


Annexe 10 : Schémas récapitulatifs de la contamination cellulaire

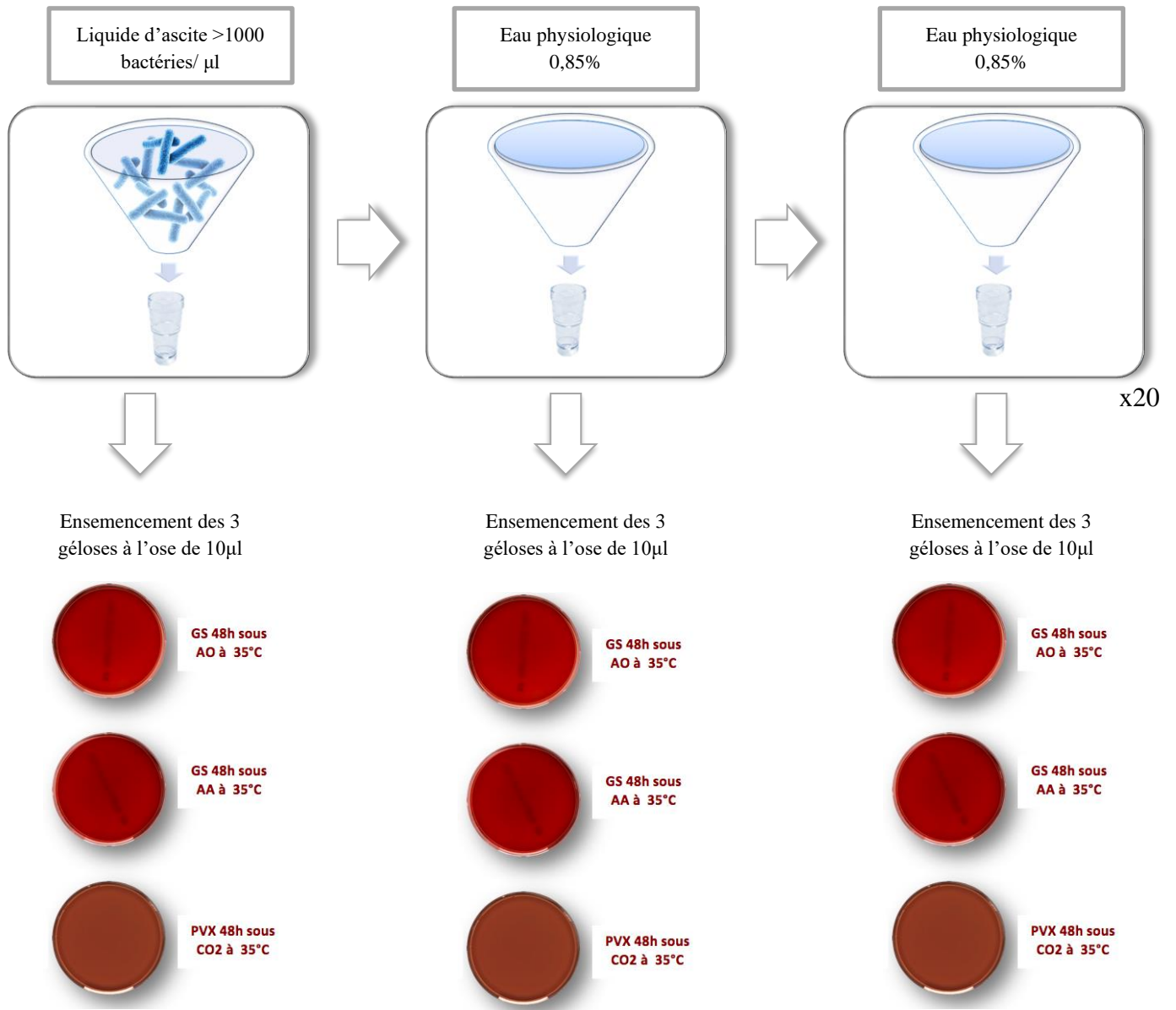
Leucocytes



Hématies



Annexe 11 : Schéma récapitulatif de la contamination microbienne



Annexe 12 : Coefficients de variation et plages du fournisseur

Coefficient de variation de Répétabilité du fournisseur Sysmex Scorp®

	CV à concentration faible	CV au niveau de décision clinique selon Sysmex	CV à concentration élevée
Leucocytes	30% ou moins (2/ μ l)	15% ou moins (40/ μ l)	10% ou moins (500/ μ l)
Hématies	50% ou moins (15/ μ l)	40% ou moins (40/ μ l)	30% ou moins (200/ μ l)
Bactéries	50% ou moins (5/ μ l)	20% ou moins (100/ μ l)	20% ou moins (800/ μ l)

Coefficient de variation de Reproductibilité du fournisseur Sysmex Scorp®

	CV à concentration faible	CV à concentration élevée
Leucocytes	15% ou moins (40/ μ l)	10% ou moins (800/ μ l)
Hématies	40% ou moins (40/ μ l)	30% ou moins (200/ μ l)
Bactéries	20% ou moins (200/ μ l)	20% ou moins (800/ μ l)

Plages données par le fournisseur

	Plage d'analyse	Plage d'affichage
Leucocytes	2 à 10000/ μ l	0 à 99999 / μ l
Hématies	15 à 99999/ μ l	0 à 99999/ μ l
Bactéries	5 à 10000/ μ l	0 à 99999 / μ l

Annexe 13 : Données et calculs pour la contamination cellulaire

Concentrations en leucocytes lors de l'expérience :

	Concentration voulue	Concentration obtenue environ
Niveau Haut (H)	5000 à 10000 leucocytes/ μ l	6000 leucocytes/ μ l
Niveau Bas (B)	30 à 50 leucocytes/ μ l	40 leucocytes/ μ l

$$\text{Contamination des leucocytes en } \% C = \frac{(42,52-44,68)*100}{6227,14-44,68} = \mathbf{0,035\%}$$

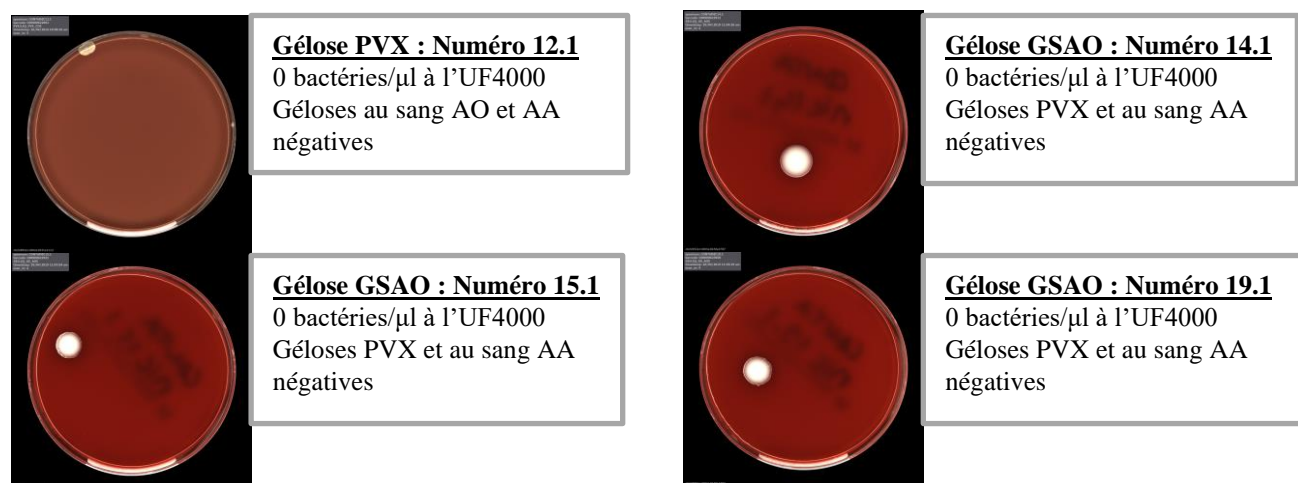
Concentrations en hématies lors de l'expérience :

	Concentration voulue	Concentration obtenue environ
Niveau Haut (H)	10000 à 99999 hématies/ μ l	84000 hématies/ μ l
Niveau Bas (B)	30 à 50 hématies/ μ l	40 hématies/ μ l

$$\text{Contamination des hématies en } \% C = \frac{(44,38-39,74)*100}{85010,35333-39,74} = \mathbf{0,00546\%}$$

Annexe 14 : Photos de la contamination microbienne

Photos des 4 géloses d'eau physiologique contenant une colonie de bactérie



Exemples de photos de cultures de liquides biologiques positives

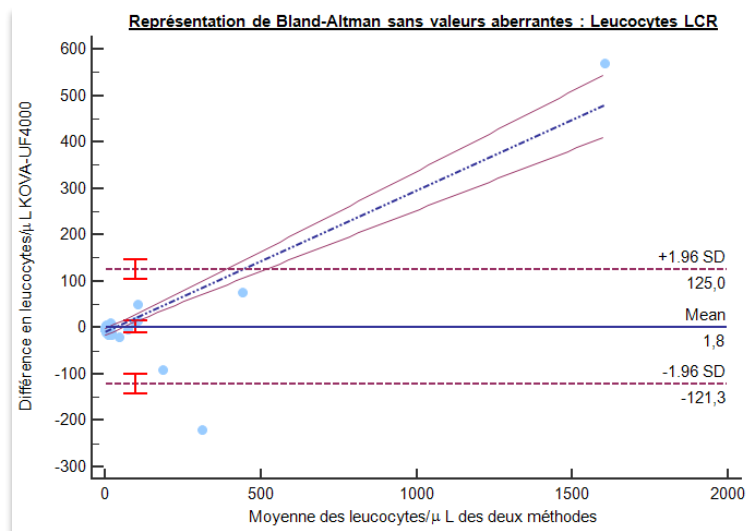
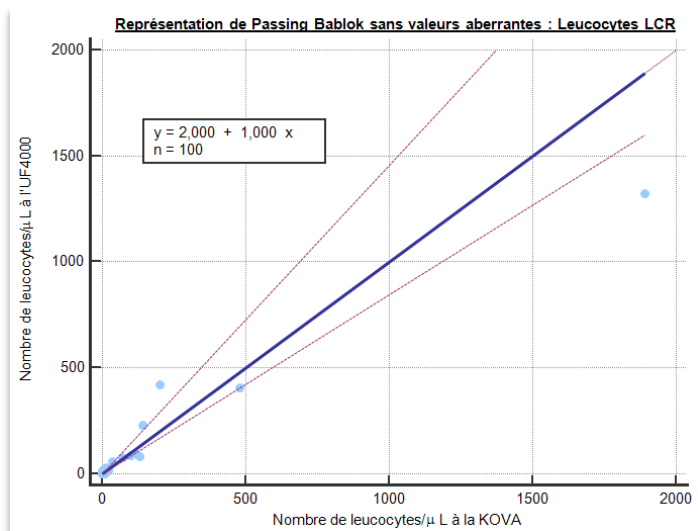


Annexe 15 : Tests statistiques pour la comparaison des leucocytes du groupe LCR

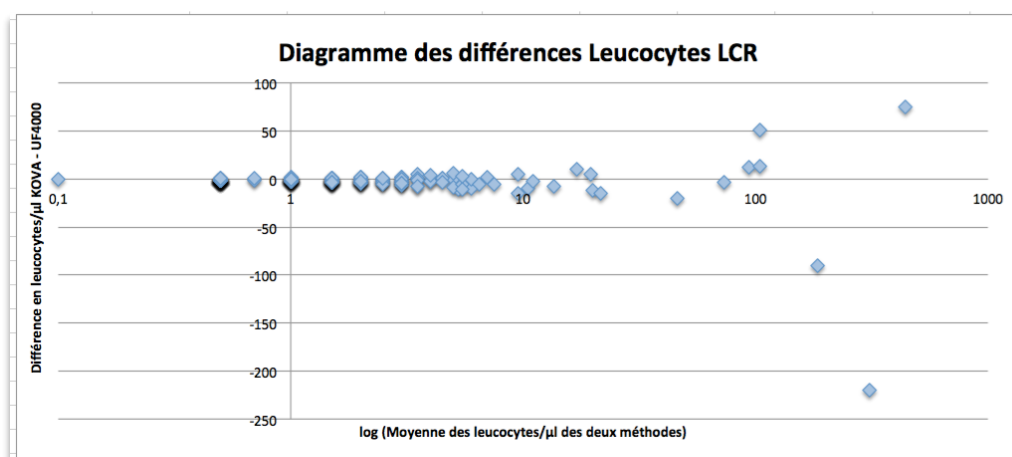
Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
	+ Test de différence (Wilcoxon)	Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1, 96 SD
Dans la totalité (N = 180)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,575	P < 0,01 Non linéaire	1,5 (1-1,85)	0,5 (0,15-1)	27,95 (-11,44 à 67,34)	-496,96 à 552,87
Dans la linéarité (N = 102)		0,537	P = 0,95 Linéaire	1 (0,83-1,13)	2 (1,87-2,17)	49,38 (-20,36 à 119,11)	-646,48 à 745,23
Dans la linéarité sans valeurs aberrantes (N = 100)		0,508	P = 0,93 Linéaire	1 (0,85-1,46)	2 (1,54-2,15)	1,82 (-10,65 à 14,28)	-121,33 à 124,96

Représentations de Passing Bablok et Bland Altman dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes (N = 100)

	KOVA (leucocytes/ μ l)	UF4000 (leucocytes/ μ l)
Plus petite valeur	0	2
Plus grande valeur	1890	1321
Médiane	1,5	4



Représentation logarithmique des différences (N = 180)

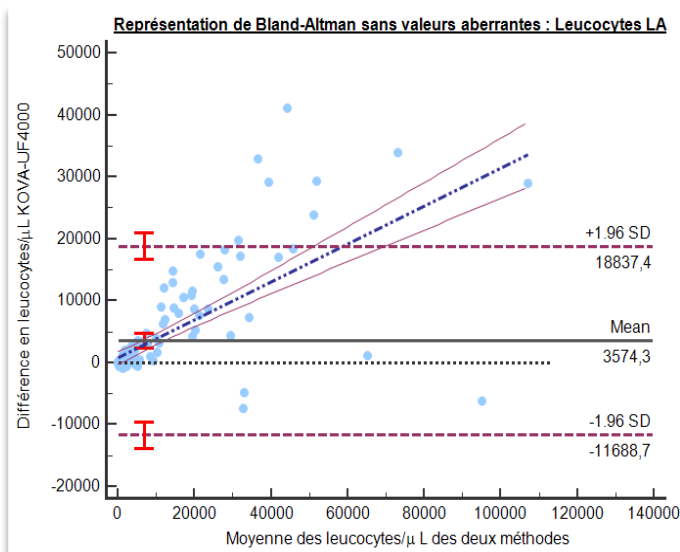
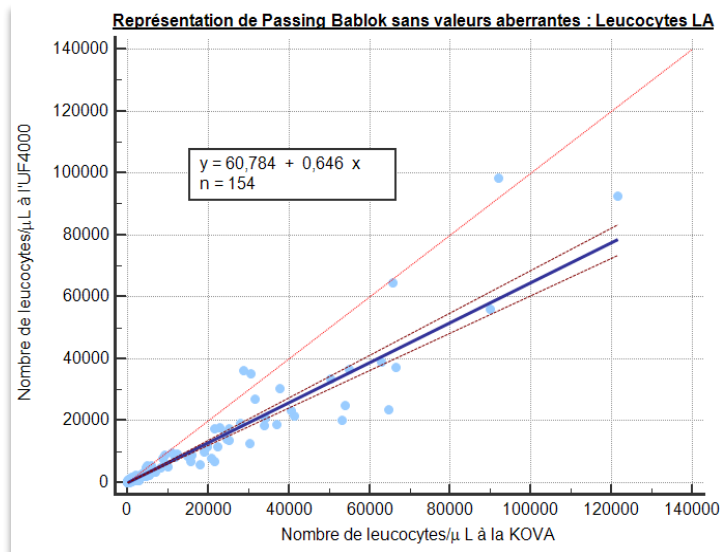


Annexe 16 : Tests statistiques pour la comparaison des leucocytes du groupe *Liquide articulaire*

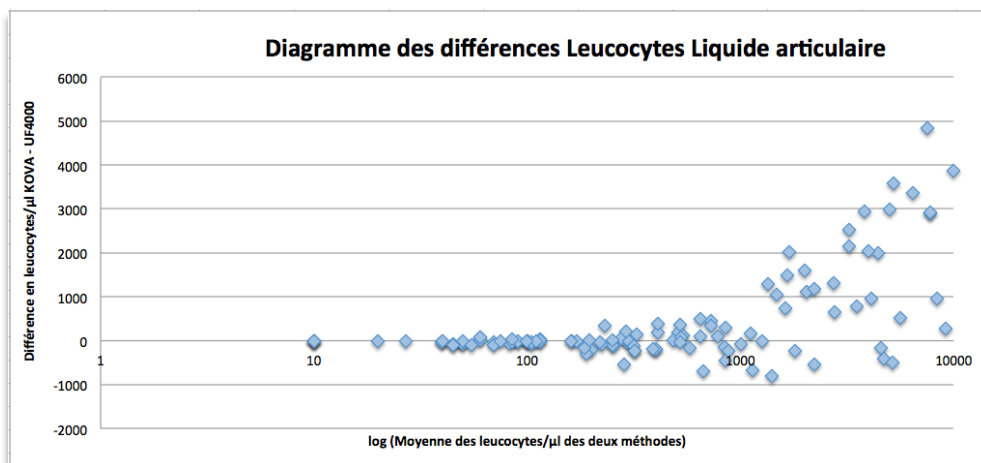
Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
	+ Test de différence (Wilcoxon)	Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1,96 SD
Dans la totalité (N = 160)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,969	P = 0,16 Linéaire	0,66 (0,62-0,69)	55,66 (39,25-66,42)	3647,79 (1802,34 à 5493,25)	-19518,29 à 26813,88
Dans la linéarité (N = 156)		0,966	P = 0,22 Linéaire	0,65 (0,61-0,69)	60,65 (45,77-76)	3348,44 (1604,97 à 5091,91)	-18257,84 à 24954,73
Dans la linéarité sans valeurs aberrantes (N = 154)		0,967	P = 0,21 Linéaire	0,65 (0,60-0,69)	60,78 (45,79-71,74)	3574,33 (2334,62 à 4814,05)	-11688,72 à 18837,38

Représentations de Passing Bablok et Bland Altman dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes (N = 154)

	KOVA (leucocytes/ μ l)	UF4000 (leucocytes/ μ l)
Plus petite valeur	0	20
Plus grande valeur	121500	98210
Médiane	925	910



Représentation logarithmique des différences (N = 160)

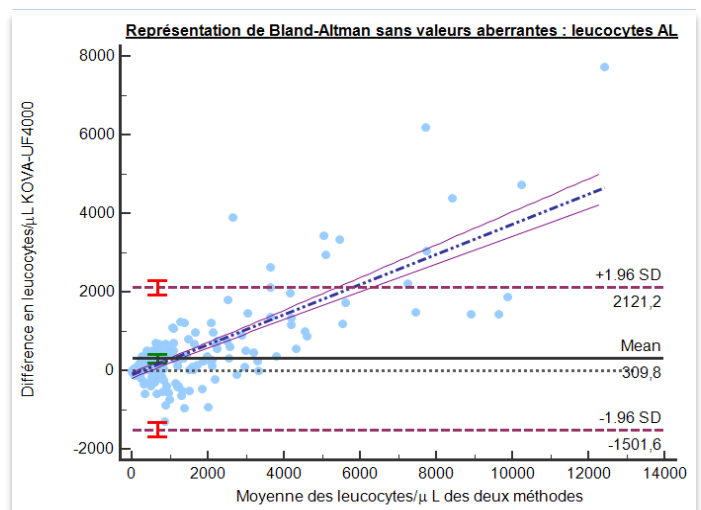
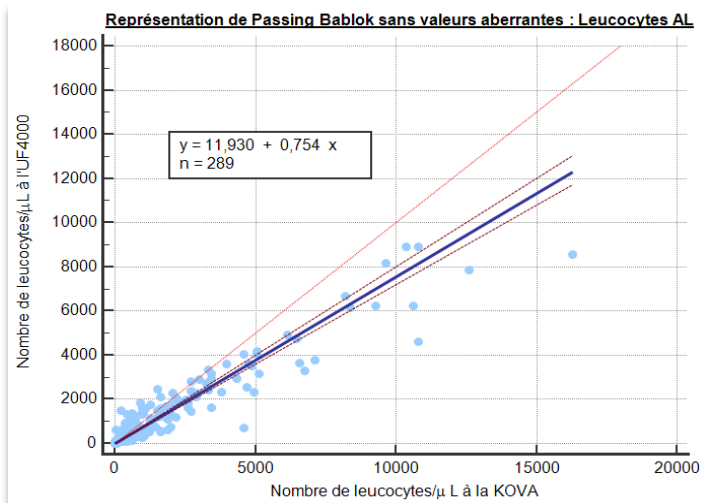


Annexe 17 : Tests statistiques pour la comparaison des leucocytes du groupe *Autres liquides*

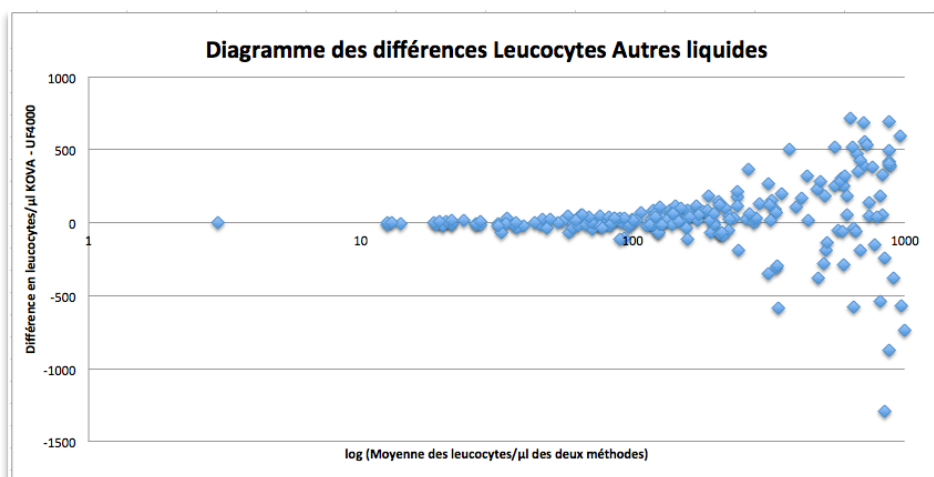
Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk) + Test de différence (Wilcoxon)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
		Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agréments : biais +/- 1,96 SD
Dans la totalité (N = 292)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,941	P = 0,98 Linéaire	0,76 (0,72-0,80)	11,75 (4,26-19,83)	400,95 (72 à 729,89)	-5196,79 à 5998,68
Dans la linéarité (N = 290)		0,939	P = 0,79 Linéaire	0,75 (0,72-0,80)	12,53 (6,44-20,93)	458,71 (146,79 à 770,63)	-4830,95 à 5748,37
Dans la linéarité sans valeurs aberrantes (N = 289)		0,94	P = 0,98 Linéaire	0,75 (0,72-0,80)	11,93 (5,6-20,15)	309,78 (202,78 à 416,78)	-1501,62 à 2121,18

Représentations de Passing Bablok et Bland Altman dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes (N = 289)

	KOVA (leucocytes/ μ l)	UF4000 (leucocytes/ μ l)
Plus petite valeur	0	15
Plus grande valeur	16290	8927
Médiane	300	259



Représentation logarithmique des différences (N = 292)

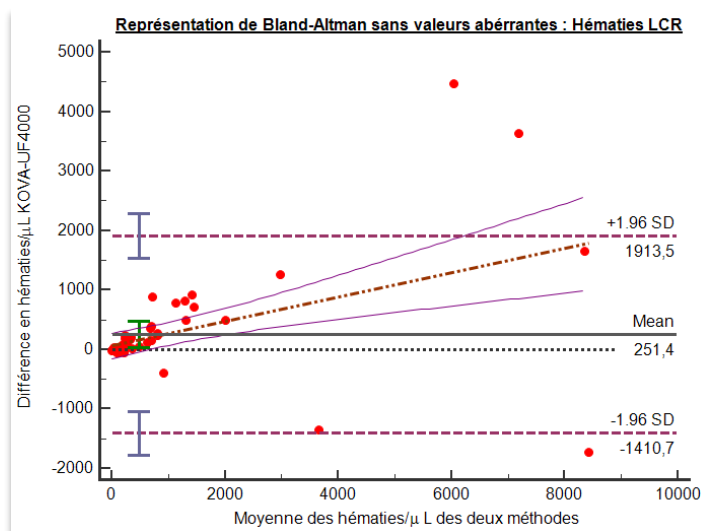
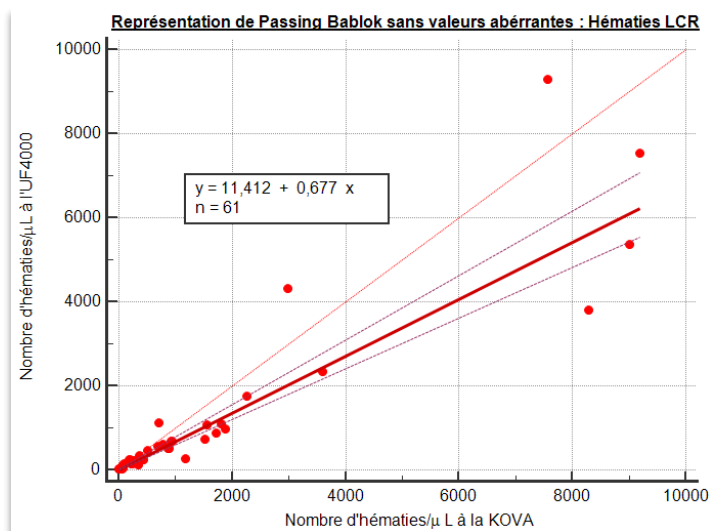


Annexe 18 : Tests statistiques pour la comparaison des hématies du groupe LCR

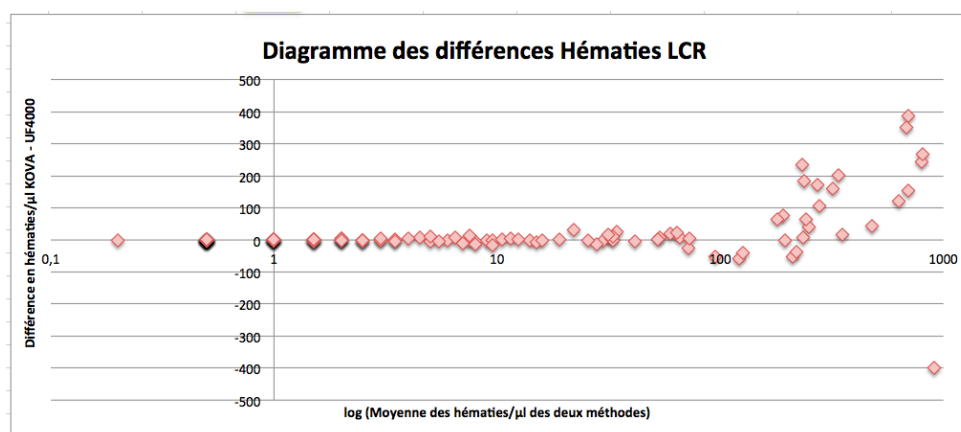
Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk) + Test de différence (Wilcoxon)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
		Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1,96 SD
Dans la totalité (N = 177)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,87	P = 0,10 Linéaire	0,80 (0,71-0,88)	0 (0-0)	160,68 (-2,17 à 323,54)	-1991,14 à 2312,50
Dans la linéarité (N = 62)		0,99	P = 0,98 Linéaire	0,84 (0,71-1,10)	0 (-0,23-0,16)	457,45 (-6,65 à 921,55)	-3124,49 à 4039,39
Dans la linéarité sans valeurs aberrantes (N = 61)		0,97	P = 0,56 Linéaire	0,68 (0,60-0,77)	11,41 (5,01-15,79)	251,39 (34,21 à 468,58)	-1410,68 à 1913,47

Représentations de Passing Bablok et Bland Altman dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes (N = 61)

	KOVA (hématies/ μ L)	UF4000 (hématies/ μ L)
Plus petite valeur	1	15
Plus grande valeur	9180	9285
Médiane	240	196



Représentation logarithmique des différences (N = 177)

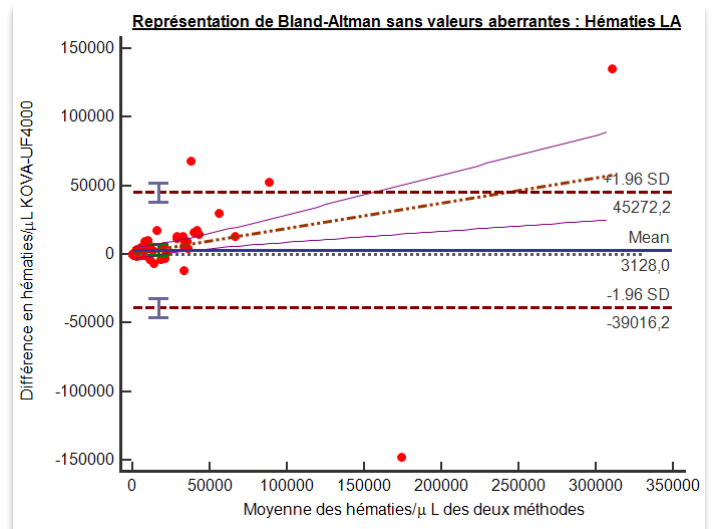
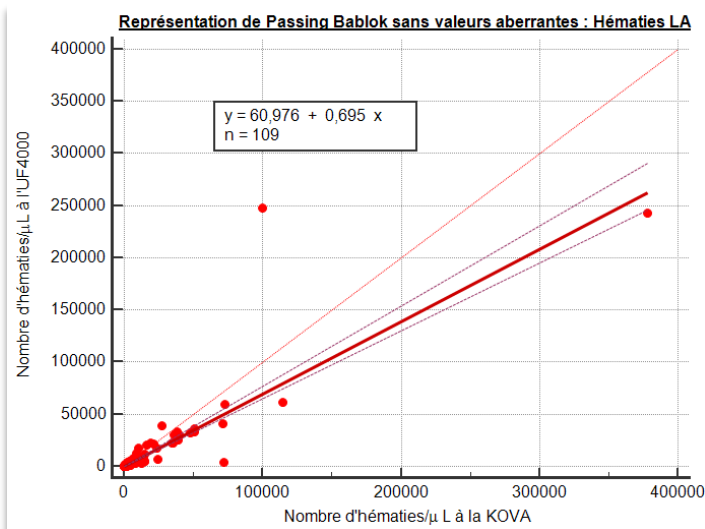


Annexe 19 : Tests statistiques pour la comparaison des hématies du groupe *Liquide articulaire*

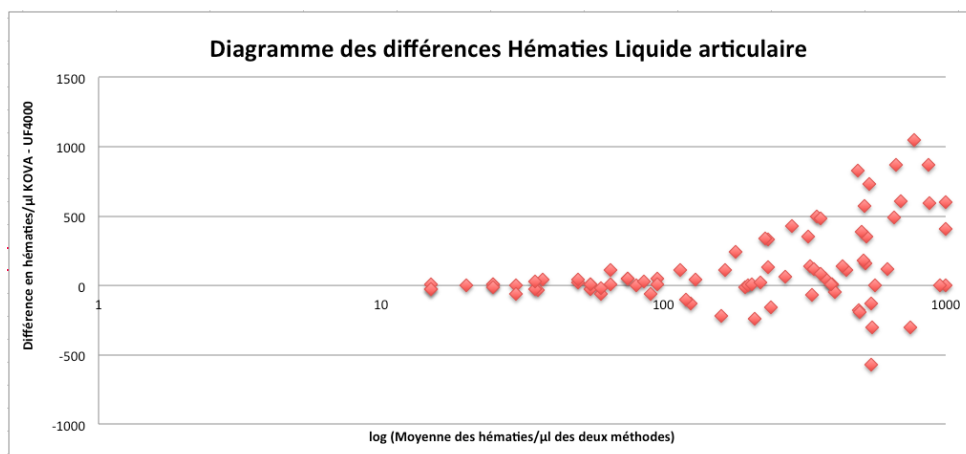
Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk) + Test de différence (Wilcoxon)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
		Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1, 96 SD
Dans la totalité (N = 150)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,93	P = 0,89 Linéaire	0,72 (0,66-0,79)	6,55 (-3,82-28,96)	-1530,14 (-9679,46 à 6619,18)	-100529,69 à 97469,41
Dans la linéarité (N = 110)		0,91	P = 0,97 Linéaire	0,71 (0,65-0,78)	61,96 (6,27-126,17)	-2118,71 (-13276,41 à 9038,99)	-117844,63 à 113607,22
Dans la linéarité sans valeurs aberrantes (N = 109)		0,91	P = 0,88 Linéaire	0,70 (0,65-0,77)	60,98 (9,47-129,6)	3128 (-954,35 à 7210,35)	-39016,17 à 45272,17

Représentations de Passing Bablok et Bland Altman dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes (N = 109)

	KOVA (hématies/μl)	UF4000 (hématies/μl)
Plus petite valeur	50	150
Plus grande valeur	378000	247540
Médiane	1400	1120



Représentation logarithmique des différences (N =150)

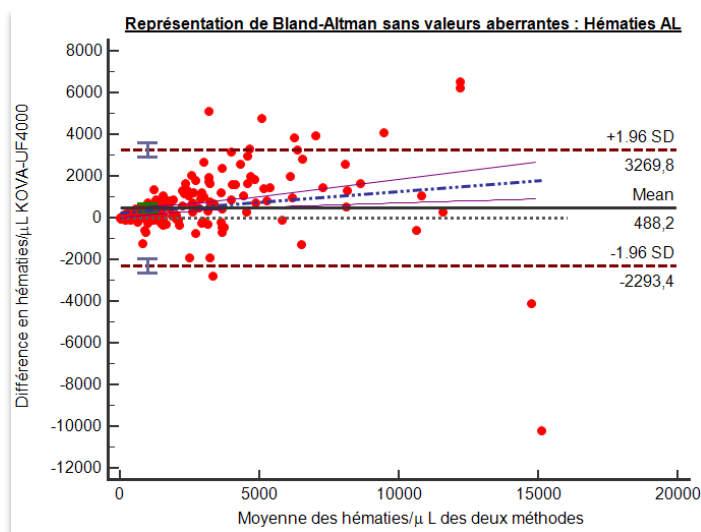
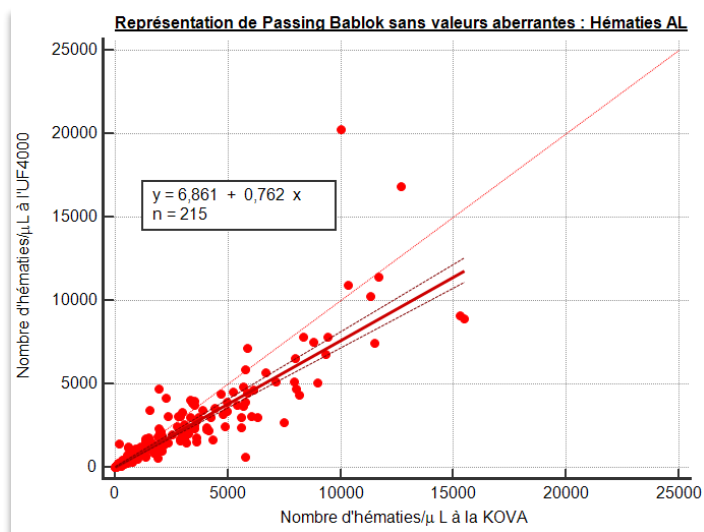


Annexe 20 : Tests statistiques pour la comparaison des hématies du groupe *Autres liquides*

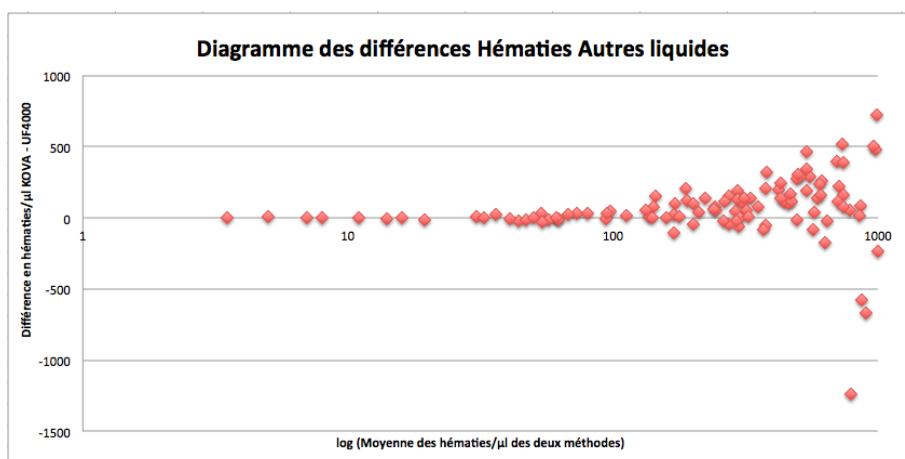
Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
	+ Test de différence (Wilcoxon)	Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1,96 SD
Dans la totalité (N = 222)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,96	P = 0,98 Linéaire	0,76 (0,73-0,81)	4,06 (-10,60-19,72)	1131,67 (-1822,37 à 4085,71)	-42642,28 à 44905,62
Dans la linéarité (N = 217)		0,96	P = 0,98 Linéaire	0,76 (0,72-0,81)	6,86 (-13,49-22,74)	1157,72 (-1864,83 à 4180,28)	-43118,66 à 45434,11
Dans la linéarité sans valeurs aberrantes (N = 215)		0,96	P = 0,97 Linéaire	0,76 (0,72-0,81)	6,86 (-12,98-26,16)	488,17 (297,39 à 678,95)	-2293,42 à 3269,75

Représentations de Passing Bablok et Bland Altman dans le domaine de linéarité et sans valeurs aberrantes (N = 215)

	KOVA (hématies/μl)	UF4000 (hématies/μl)
Plus petite valeur	12	15
Plus grande valeur	15480	20215
Médiane	1350	1090



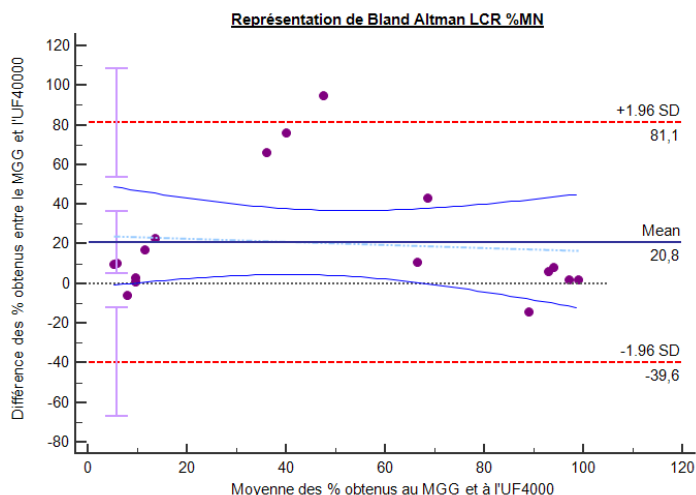
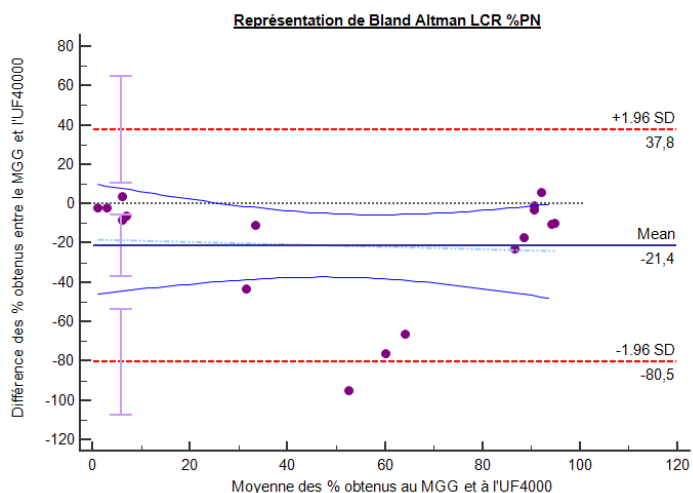
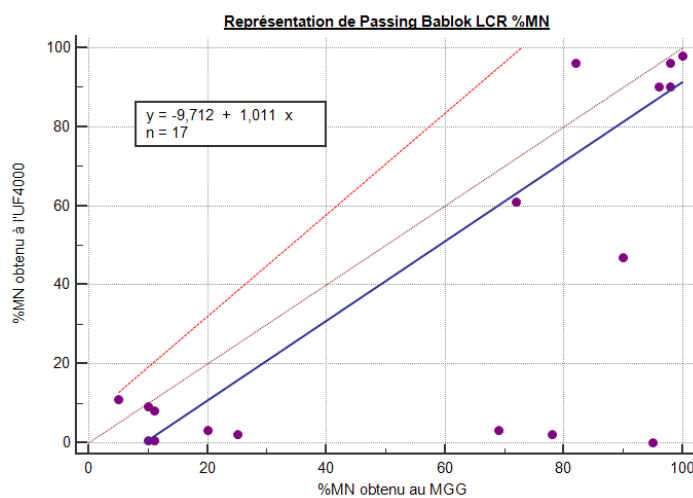
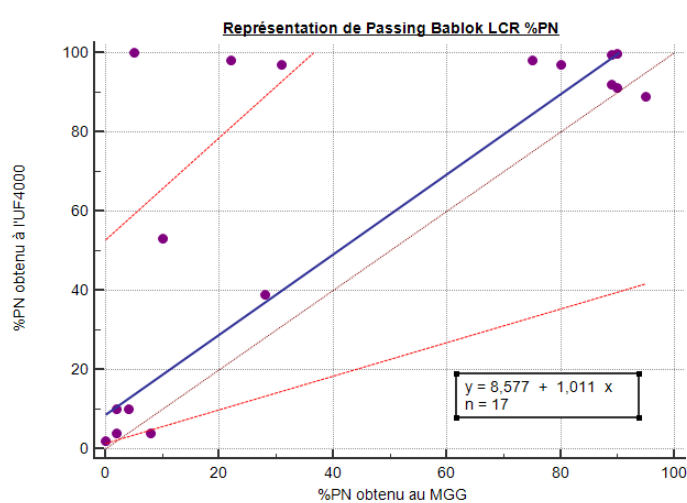
Représentation logarithmique des différences (N = 222)



Annexe 21 : Tests statistiques pour la comparaison de la formule leucocytaire du LCR

Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk) + Test de différence (Wilcoxon)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
		Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1,96 SD
% PN (N = 17)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,574	P = 0,07 Linéaire	1,01 (0,42-1,29)	8,58 (1,42-52,88)	-21,36 (-36,87 à -5,85)	-80,49 à 10,72
% MN (N = 17)							

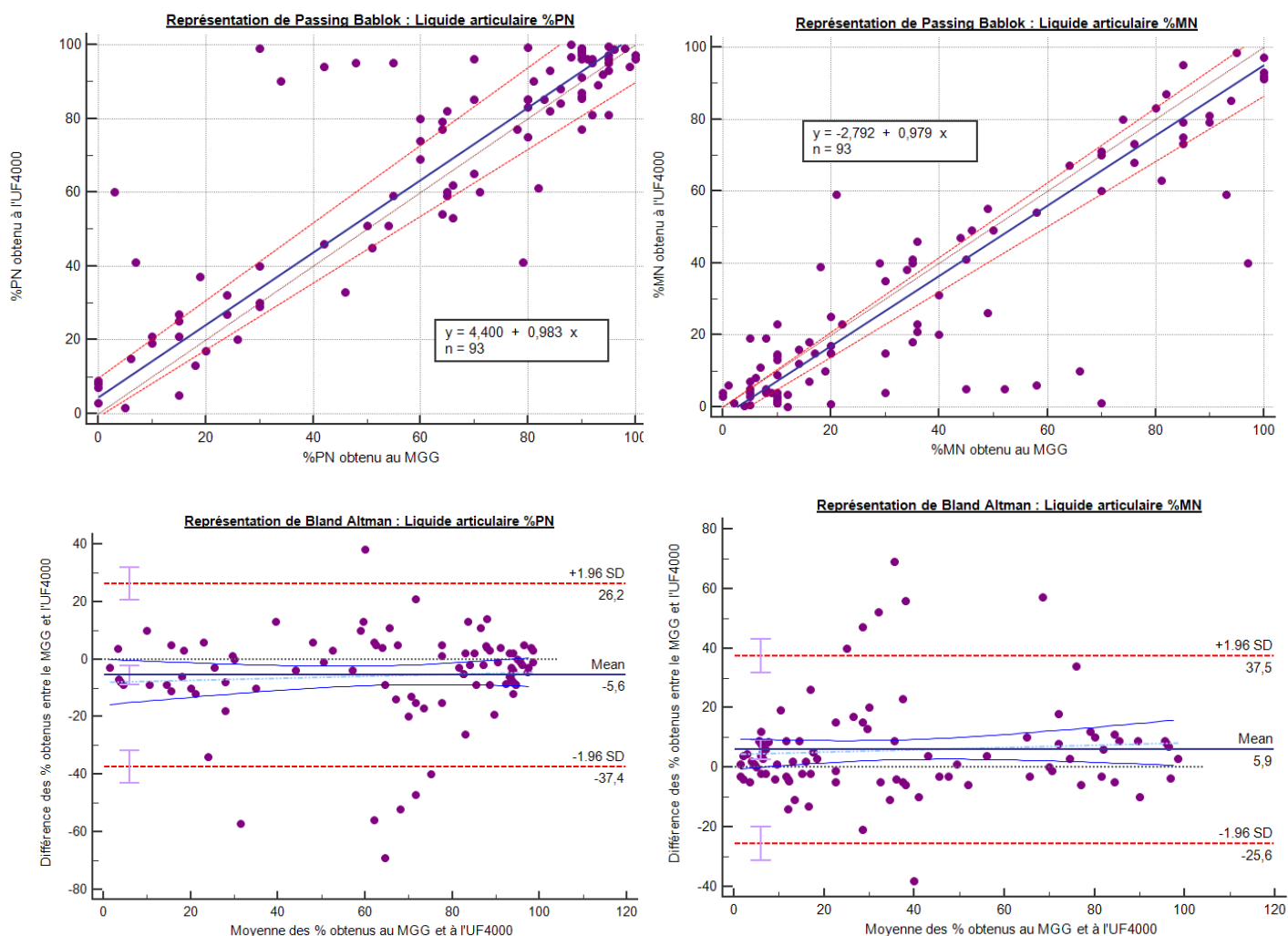
Représentations de Passing Bablok et Bland Altman (N = 17)



Annexe 22 : Tests statistiques pour la comparaison de la formule leucocytaire du liquide articulaire

Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk) + Test de différence (Wilcoxon)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
		Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrément : biais +/- 1,96 SD
% PN (N = 93)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,806	P = 0,82 Linéaire	0,98 (0,91-1,05)	4,40 (-1,01-9,55)	-5,58 (-8,92 à -2,25)	-37,35 à 26,18
% MN (N = 93)		0,811	P = 0,94 Linéaire	0,98 (0,91-1,04)	-2,79 (-4,33- -0,34)	5,91 (2,59 à 9,22)	-25,65 à 37,46

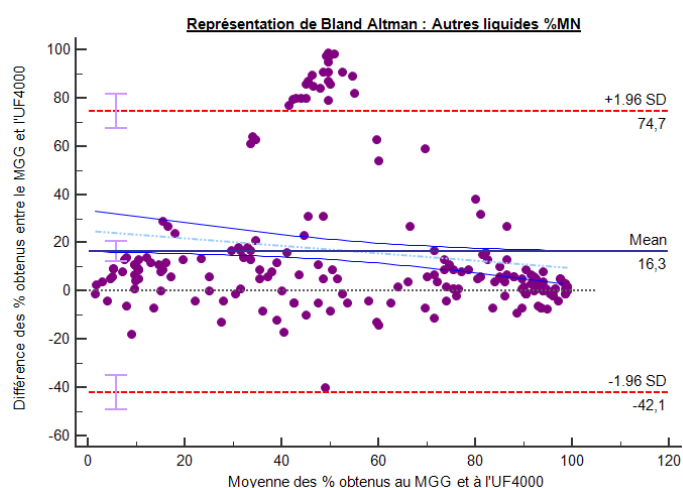
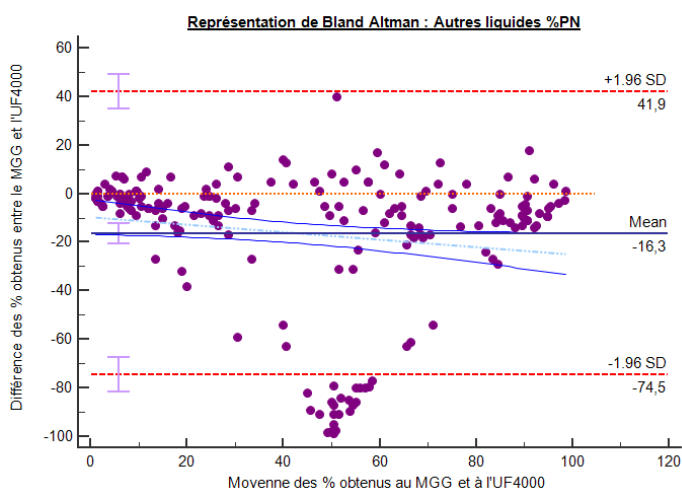
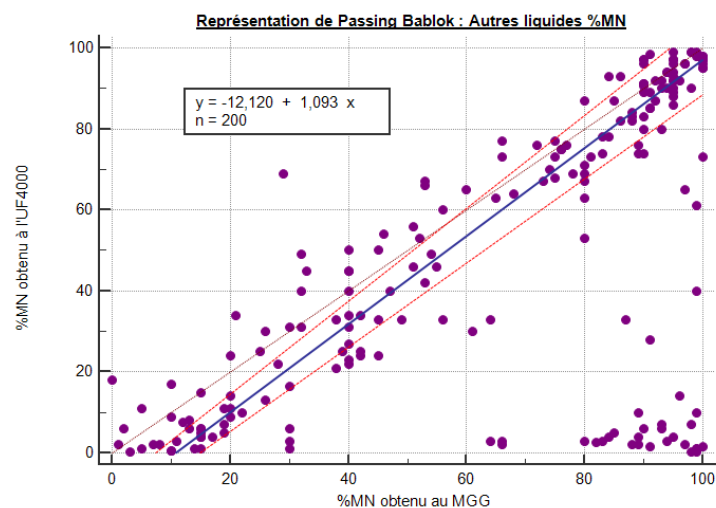
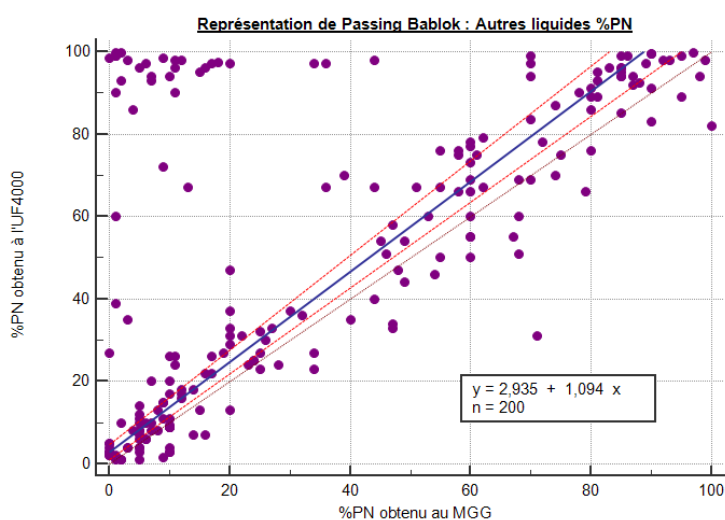
Représentations de Passing Bablok et Bland Altman (N = 93)



Annexe 23 : Tests statistiques pour la comparaison de la formule leucocytaire des autres liquides

Valeurs	Test de normalité (Shapiro et Wilk) + Test de différence (Wilcoxon)	Régression de Passing Bablok				Représentation de Bland Altman	
		Coefficient de corrélation de Spearman : R	Test de linéarité	Pente de la droite (IC 95%)	Ordonnée à l'origine (IC 95%)	Moyenne des différences : Biais (IC 95%)	Limites d'agrèments : biais +/- 1,96 SD
% PN (N = 200)	Les différences ne suivent pas une loi normale + Différence significative entre les deux méthodes	0,574	P = 0,03 Non Linéaire	1,09 (1,04-1,15)	2,94 (1,06-4,67)	-16,28 (-20,43 à -12,14)	-74,52 à 41,95
% MN (N = 200)		0,573	P = 0,03 Non Linéaire	1,09 (1,04-1,15)	-12,12 (-15,55- -8,6)	16,30 (12,15 à 20,46)	-42,10 à 74,70

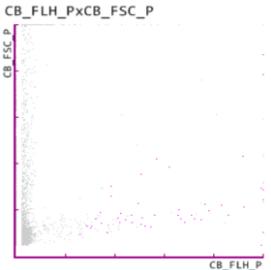
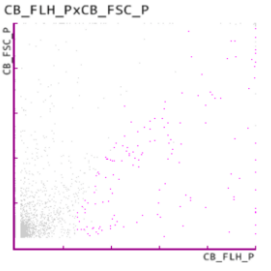
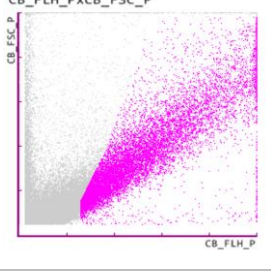
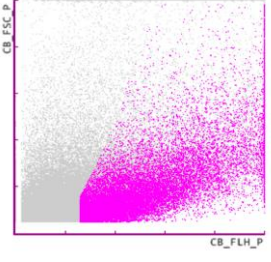
Représentations de Passing Bablok et Bland Altman (N = 200)



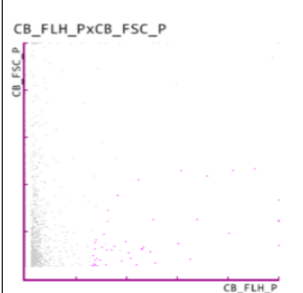
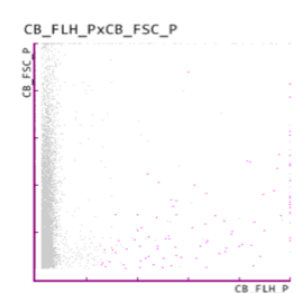
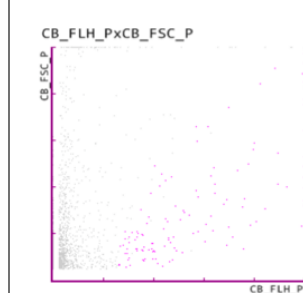
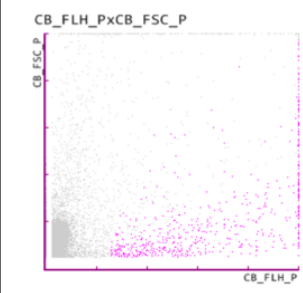
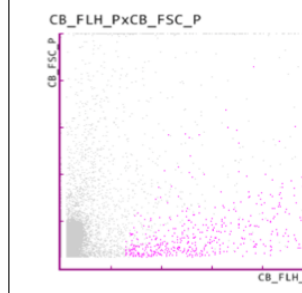
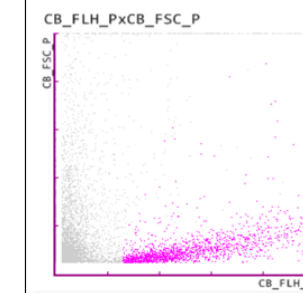
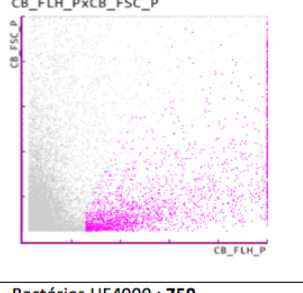
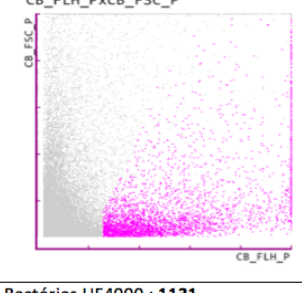
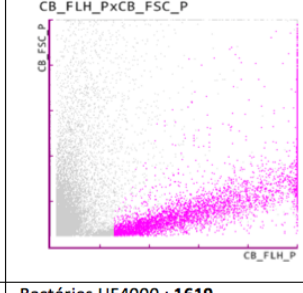
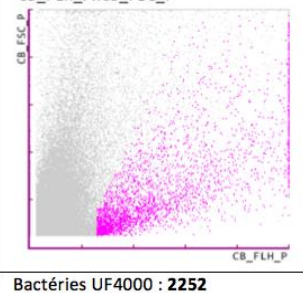
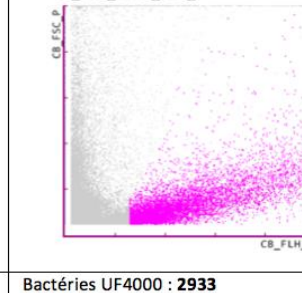
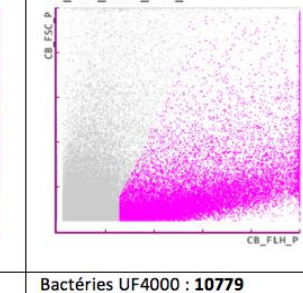
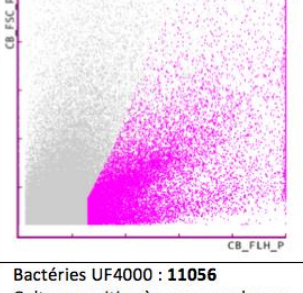
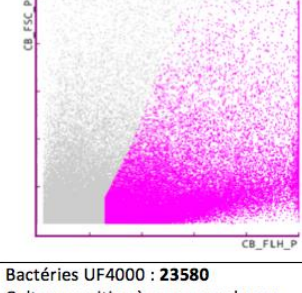
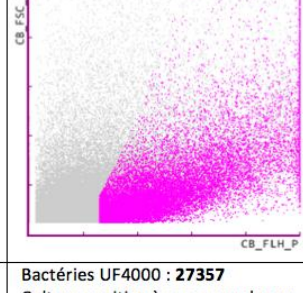
Annexe 24 : Proposition d'abaque du rendu des résultats semi-quantitatif pour les numérations leucocytaires inférieures au seuil décisionnel à l'UF4000.

Résultat %PN ou %MN à l'UF4000	Rendu du résultat en semi-quantitatif par le Sysmex si inférieur au seuil décisionnel
0%	Aucun
0 => 15%	Très Rare
15 => 30%	Rare
30 => 50%	Quelques
50 => 65%	Assez nombreux
65 => 80%	Nombreux
80 => 100%	Très nombreux

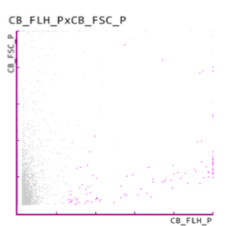
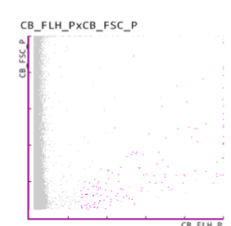
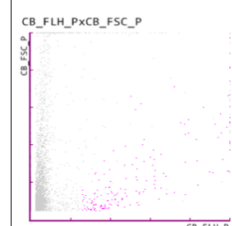
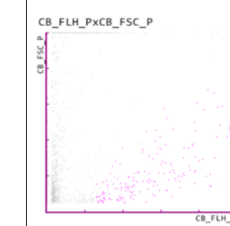
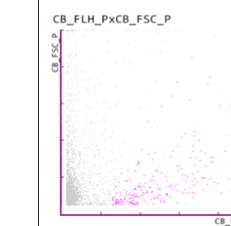
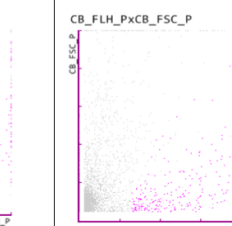
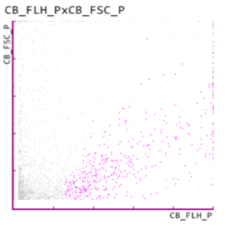
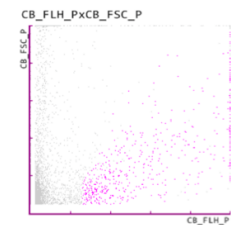
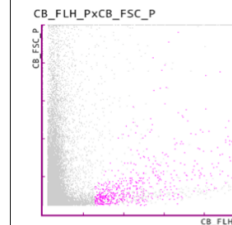
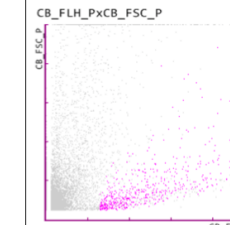
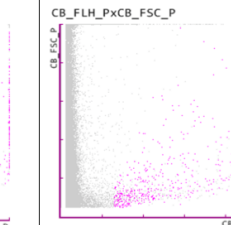
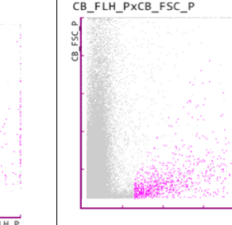
Annexe 25 : Diagrammes de dispersion des 4 cultures positives du LCR

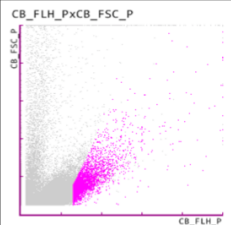
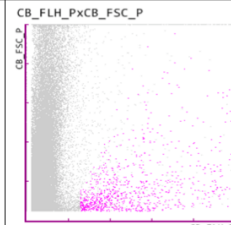
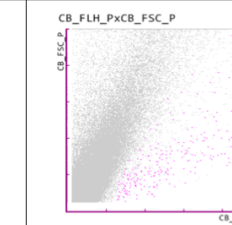
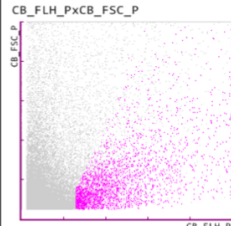
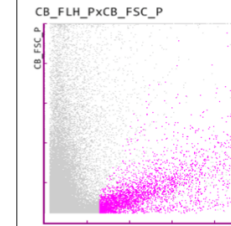
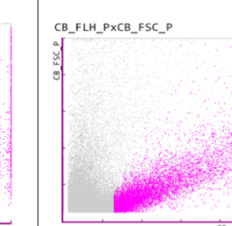
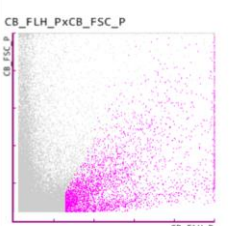
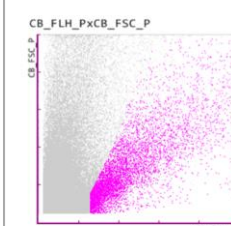
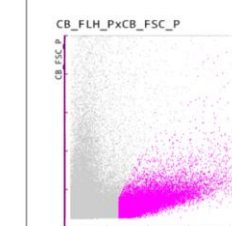
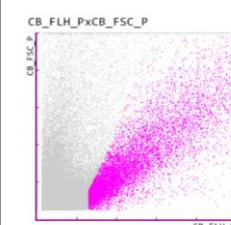
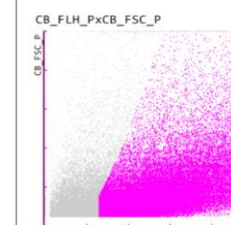
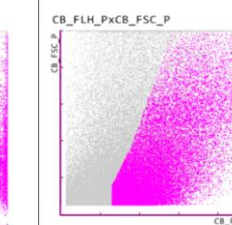
Numéro de prélèvement	Bactéries culture	Bactéries UF4000	Diagrammes De dispersion
75	Positif à <i>Staphylococcus épidermidis</i> après enrichissement	16	
107	Positif à assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>	48	
78	Positif à assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>	3770	
68	Positif à rares <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18750	

Annexe 26 : Diagrammes de dispersion des 15 cultures positives du liquide articulaire

		
Bactéries UF4000 : 10,2 Culture positive à quelques <i>Staphylococcus warneri</i>	Bactéries UF4000 : 32 Culture positive à très rares <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéries UF4000 : 39 Culture positive après enrichissement à <i>Staphylococcus aureus</i>
		
Bactéries UF4000 : 122 Culture positive à quelques <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bactéries UF4000 : 210 Culture positive à assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 656 Culture positive à rares <i>Streptococcus pneumoniae</i>
		
Bactéries UF4000 : 759 Culture positive à rares <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 1131 Culture positive à rares <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 1619 Culture positive à assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>
		
Bactéries UF4000 : 2252 Culture positive à assez nombreux Streptococcus du groupe C	Bactéries UF4000 : 2933 Culture positive à très rares <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bactéries UF4000 : 10779 Culture positive à quelques <i>Staphylococcus aureus</i>
		
Bactéries UF4000 : 11056 Culture positive à assez nombreux Streptococcus spp.	Bactéries UF4000 : 23580 Culture positive à assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 27357 Culture positive à assez nombreux <i>Staphylococcus aureus</i>

Annexe 27 : Diagrammes de dispersion des 24 cultures positives des autres liquides

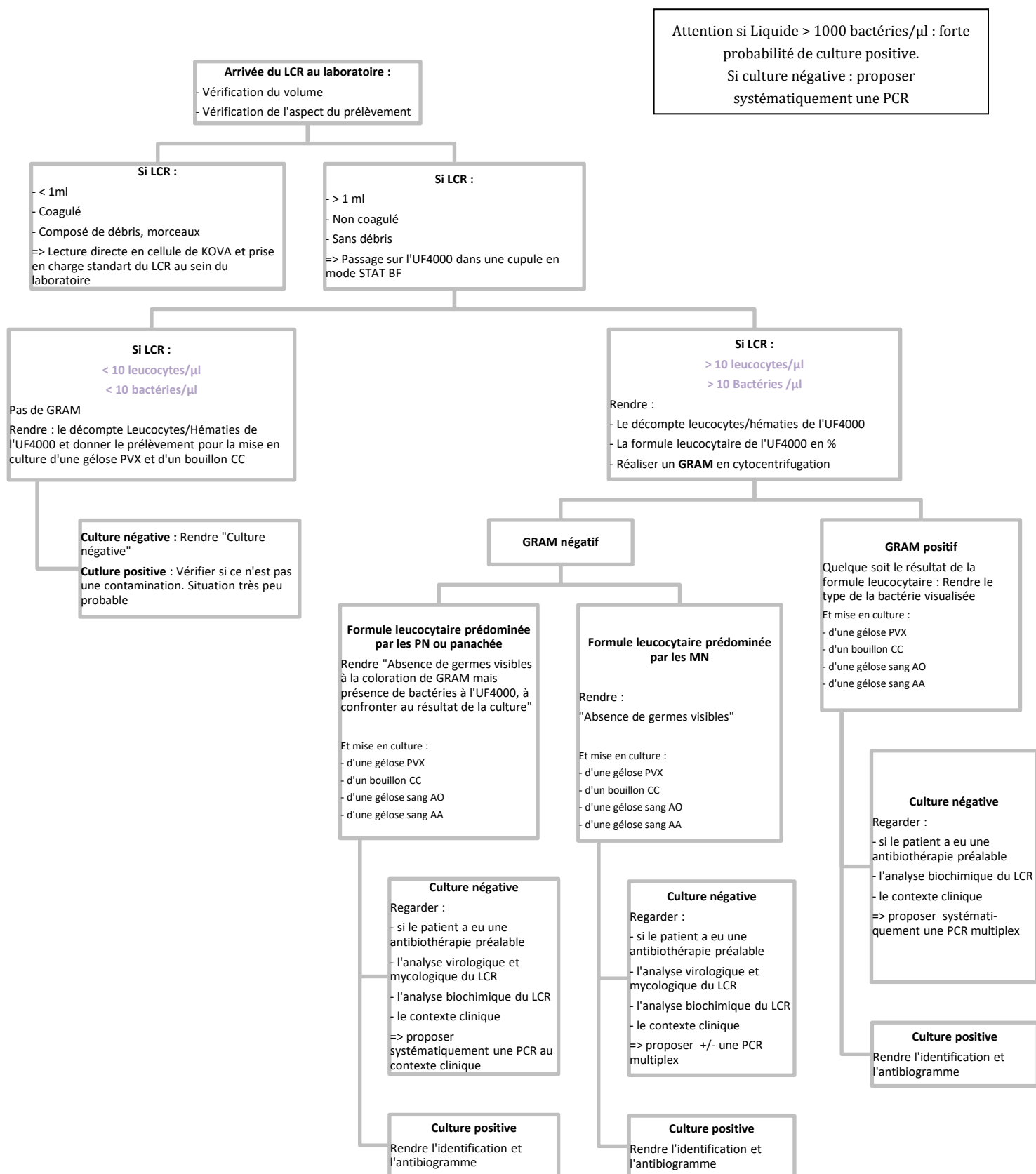
					
Bactéries UF4000 : 32 Culture positive à rares <i>Klebsiella oxytoca</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	Bactéries UF4000 : 43 Culture positive à très rares <i>Streptococcus sanguinis</i>	Bactéries UF4000 : 49 Culture positive à rares <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéries UF4000 : 61 Culture positive à très rares <i>Enterococcus</i> sp.	Bactéries UF4000 : 91 Culture positive à très rares <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 94 Culture positive à rares <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
					
Bactéries UF4000 : 137 Culture positive à très rares <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéries UF4000 : 159 Culture positive à très rares <i>Escherichia coli</i>	Bactéries UF4000 : 190 Culture positive à rares <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 198 Culture positive après enrichissement <i>Enterococcus faecalis</i>	Bactéries UF4000 : 316 Culture positive à <i>Brevibacterium</i>	Bactéries UF4000 : 319 Culture positive à rares <i>Streptococcus</i> sp.

		
Bactéries UF4000 : 369 Culture positive à nombreux <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéries UF4000 : 479 Culture positive à très rares <i>Streptococcus</i> sp.	Bactéries UF4000 : 665 Culture positive après enrichissement <i>Enterococcus faecalis</i>
		
Bactéries UF4000 : 797 Culture positive à nombreux <i>Streptococcus</i> sp.	Bactéries UF4000 : 1145 Culture positive à très rares <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 1971 Culture positive à rares <i>Streptococcus</i> sp.
		
Bactéries UF4000 : 2410 Culture positive à très rares <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 5649 Culture positive à rares <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéries UF4000 : 7095 Culture positive à assez nombreux <i>Acinetobacter baumannii</i>
		
Bactéries UF4000 : 9856 Culture positive à très nombreux <i>Streptococcus</i> sp.	Bactéries UF4000 : 77854 Culture positive à quelques <i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries UF4000 : 99999 Culture positive polymicrobienne

Annexe 28 : Algorithmes de prise en charge d'un LCR au laboratoire

Prise en charge d'un LCR au laboratoire

Partie 1



Prise en charge d'un LCR au laboratoire

Partie 2

Arrivée du LCR au laboratoire :
 - Vérification du volume
 - Vérification de l'aspect du prélèvement

Si LCR :
 - < 1ml
 - Coagulé
 - Composé de débris, morceaux
 => Lecture directe en cellule de KOVA et prise en charge standart du LCR au sein du laboratoire

Si LCR :
 - > 1 ml
 - Non coagulé
 - Sans débris
 => Passage sur l'UF4000 dans une cupule en mode STAT BF

Si LCR :
 < 10 leucocytes/ μ l
 > 10 bactéries/ μ l

Rendre :

- Le décompte leucocytes/hématies de l'UF4000
- Réaliser un **GRAM** en cyto centrifugation pour vérification

Si LCR :
 > 10 leucocytes/ μ l
 < 10 Bactéries / μ l

Rendre :

- Le décompte leucocytes/hématies de l'UF4000
- La formule leucocytaire de l'UF4000 en %
- Réaliser un **GRAM** en cyto centrifugation

GRAM négatif

Rendre "Présence de bactéries à l'UF4000 mais non présentes au GRAM, à confronter au résultat de la culture."

Et mise en culture :

- d'une gélose PVX
- d'un bouillon CC
- d'une gélose sang AO
- d'une gélose sang AA

GRAM positif

Rendre le type de la bactérie visualisée + la formule leucocytaire de l'UF4000

Et mise en culture :

- d'une gélose PVX
- d'un bouillon CC
- d'une gélose sang AO
- d'une gélose sang AA
- d'une gélose spécifique de la bactérie retrouvée

Culture négative

Regarder :

- l'analyse virologique et mycologique du LCR
- l'analyse biochimique du LCR
- le contexte clinique
- Lecture des scattergrammes

=> proposer +/- PCR multiplex

Sinon rendre "Culture négative, probable erreur analytique de l'UF4000"

Culture négative

Regarder :

- si le patient a eu une antibiothérapie préalable
- si les bonnes géloses ont été ensemencées
- l'analyse biochimique du LCR
- le contexte clinique

=> proposer une PCR multiplex en systématique

Culture positive

Rendre l'identification et l'antibiogramme

Culture positive

Rendre l'identification et l'antibiogramme

GRAM négatif

Formule leucocytaire prédominée par les PN ou panachée

Rendre "Absence de germes visibles à la coloration de GRAM et à l'UF4000, à confronter au résultat de la culture"

Et mise en culture :

- d'une gélose PVX
- d'un bouillon CC
- d'une gélose sang AO
- d'une gélose sang AA

GRAM négatif

Formule leucocytaire prédominée par les MN

Rendre "Absence de germes visibles à la coloration de GRAM et à l'UF4000, à confronter au résultat de la culture"

Et mise en culture :

- d'une gélose PVX
- d'un bouillon CC
- d'une gélose sang AO
- d'une gélose sang AA

Culture négative

Regarder :

- l'analyse virologique et mycologique du LCR
- l'analyse biochimique du LCR
- le contexte clinique

- PCR multplex selon le contexte

Culture positive

Contamination ?

Culture négative

Rendre "Culture négative"

Culture positive

Contamination ?

GRAM positif

Rendre le type de la bactérie visualisée

Et mise en culture :

- d'une gélose PVX
- d'un bouillon CC
- d'une gélose sang AO
- d'une gélose sang AA

Situation très peu probable

Culture négative

Regarder :

- si le patient a eu une antibiothérapie préalable
- l'analyse biochimique du LCR
- le contexte clinique

=> proposer systématiquement une PCR multiplex si leucocytes très augmentés

Culture positive

Situation très peu probable

Rendre l'identification et l'antibiogramme

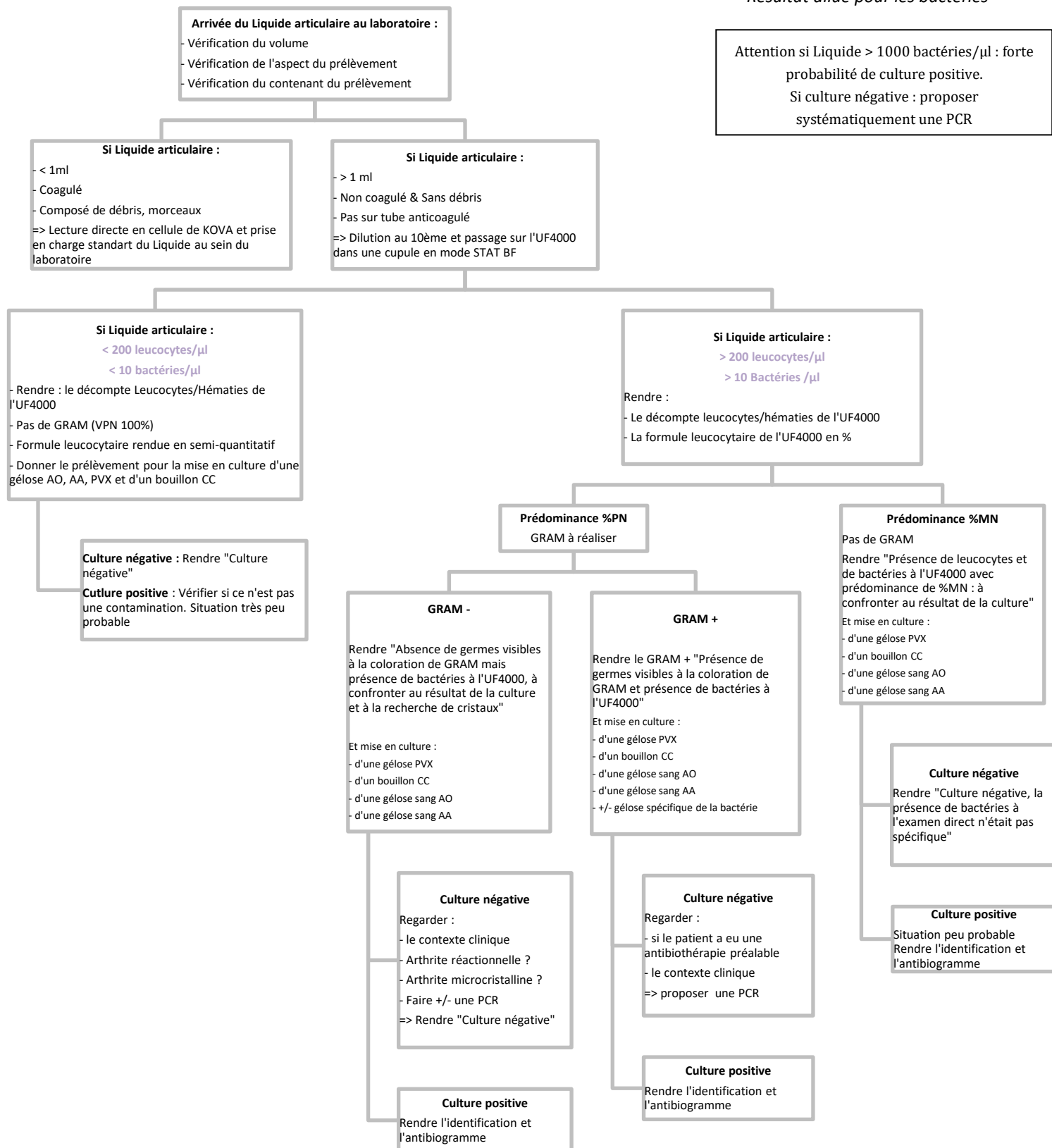
Attention si Liquide > 1000 bactéries/ μ l :
 Forte probabilité de culture positive.
 Si culture négative : proposer systématiquement une PCR

Annexe 29 : Algorithmes de prise en charge d'un liquide articulaire au laboratoire

Prise en charge d'un liquide articulaire au laboratoire Partie 1

*Résultat non dilué pour les leucocytes
Résultat dilué pour les bactéries*

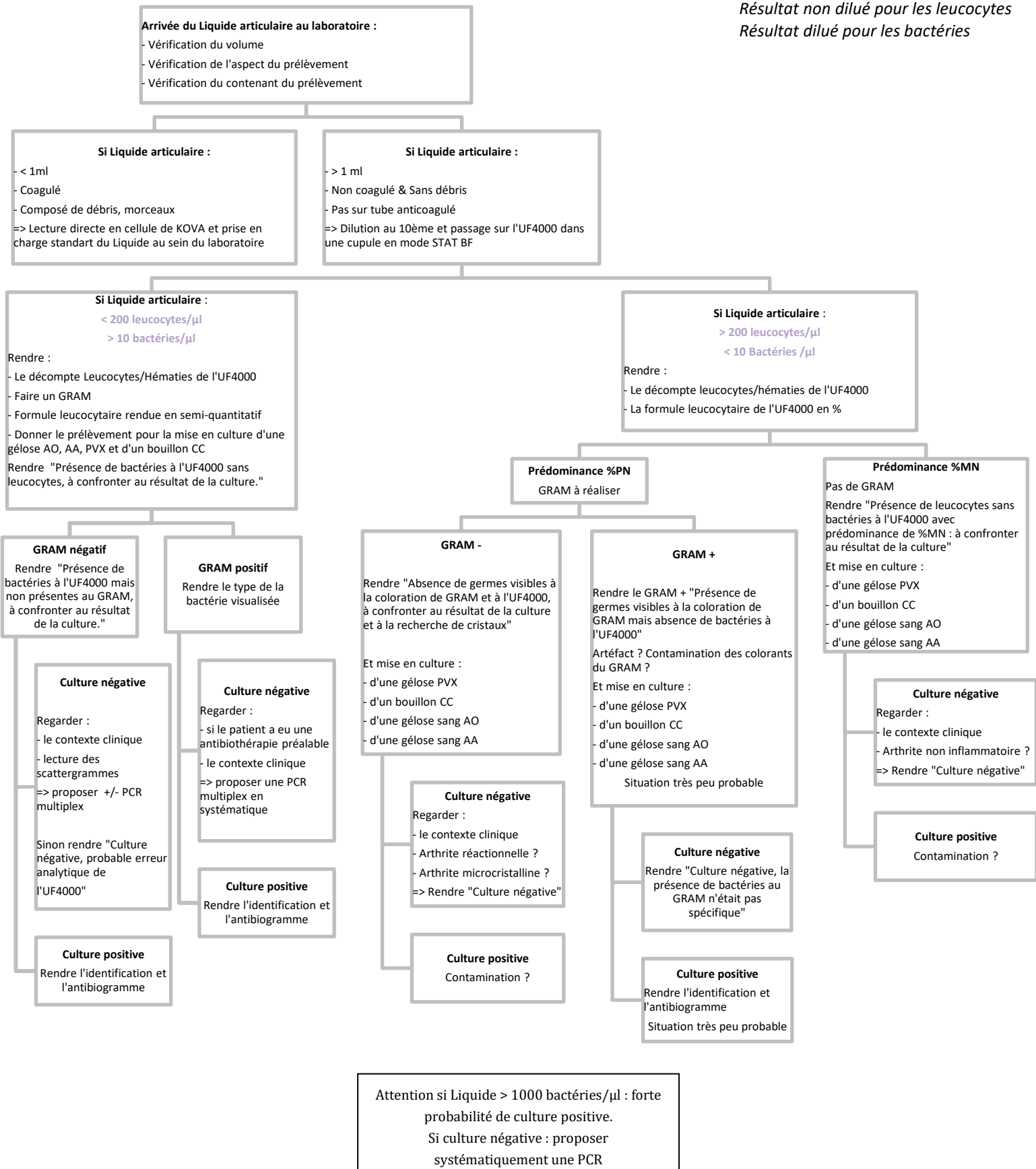
Attention si Liquide > 1000 bactéries/μl : forte probabilité de culture positive.
Si culture négative : proposer systématiquement une PCR



Prise en charge d'un liquide articulaire au laboratoire

Partie 2

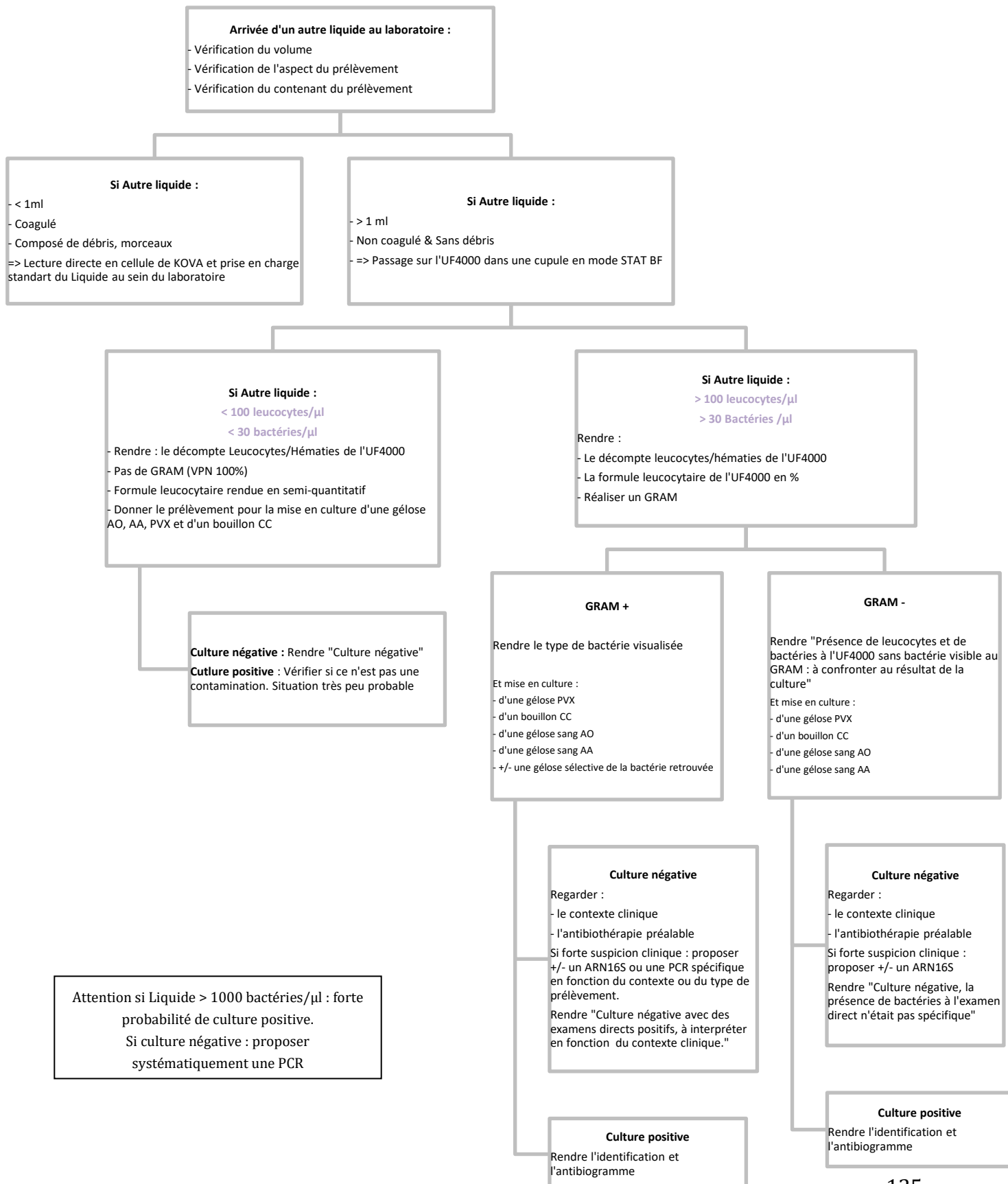
*Résultat non dilué pour les leucocytes
Résultat dilué pour les bactéries*



Annexe 30 : Algorithmes de prise en charge d'un autre liquide au laboratoire

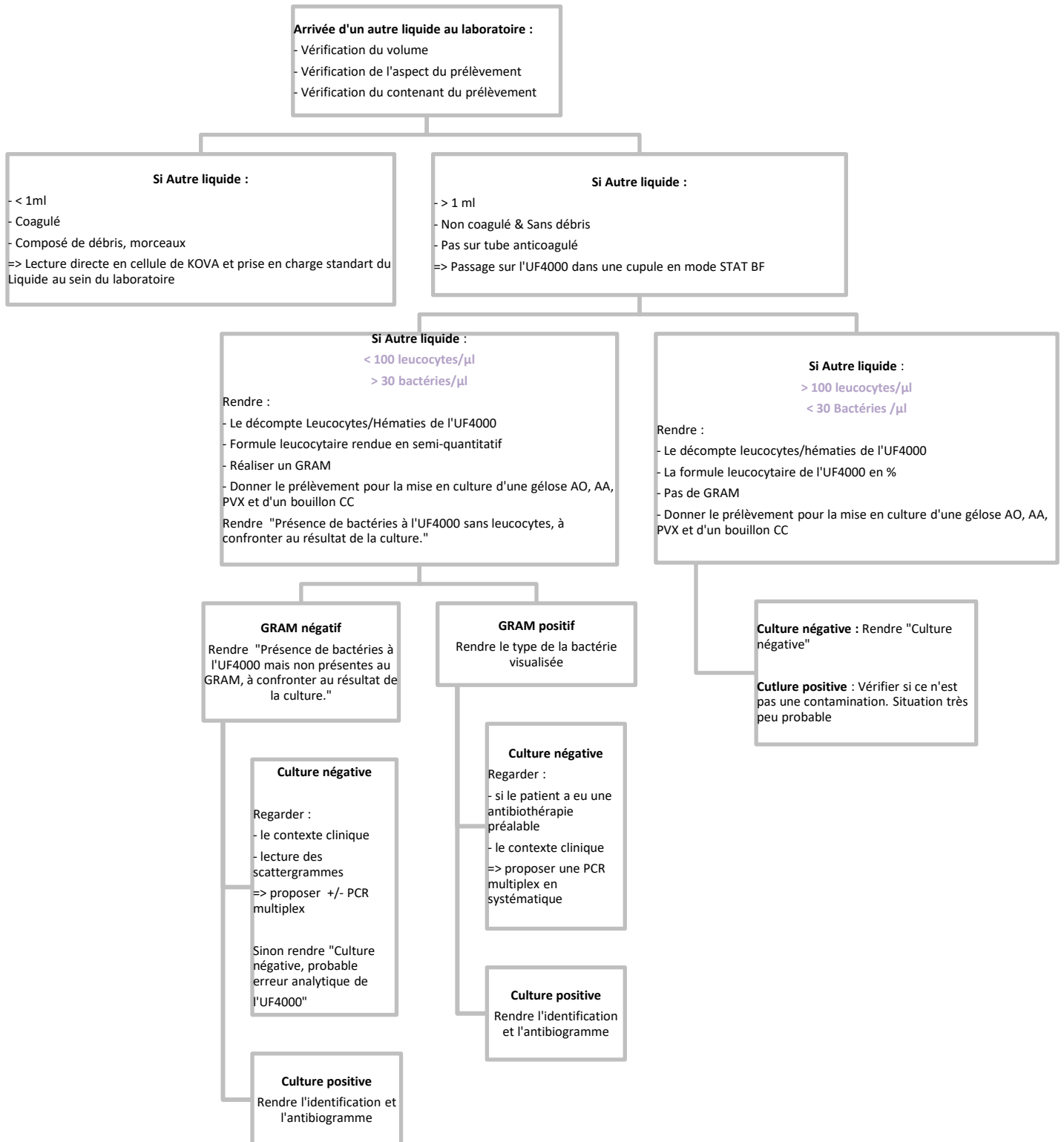
Prise en charge d'un autre liquide au laboratoire

Partie 1



Prise en charge d'un autre liquide au laboratoire

Partie 2



Attention si Liquide > 1000 bactéries/µl : forte probabilité de culture positive.
Si culture négative : proposer systématiquement une PCR

ROSANT-LEGENBRE Chloé

Intérêt de la cytologie automatisée dans la prise en charge des liquides d'épanchement et du liquide céphalo-rachidien en bactériologie.

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE
UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

Année 2020

Mots clés : UF4000, liquides d'épanchement, LCR, cytologie, bactéries, leucocytes, hématies

Résumé

Introduction : le module liquide biologique de l'UF4000, analyseur automatisé de cytologie urinaire, a été étudié en vue d'une automatisation de la cytologie des liquides d'épanchement (ascite, pleural, péricardique, articulaire) et du liquide céphalo-rachidien.

Matériel et méthodes : la vérification de méthode analytique (répétabilité, reproductibilité, incertitude de mesure, linéarité, limite de détection et de quantification, contamination) et la comparaison de méthode ont été effectuées selon 3 groupes de liquides : *LCR*, *Liquide articulaire*, *Autres liquides* (ascite, pleural, péricardique). 632 liquides ont été comparés avec la cellule de KOVA pour les leucocytes et 549 pour les hématies. La formule leucocytaire a été comparée avec le MGG pour 310 échantillons. Une évaluation du rendu des bactéries a également été effectuée en vue d'apporter de nouvelles données.

Résultat : la vérification analytique montre de bonnes performances de l'automate pour les liquides biologiques. La comparaison des leucocytes et des hématies est concluante (minimum 90% de concordance) malgré des tests statistiques montrant des différences. La comparaison de la formule leucocytaire est satisfaisante avec 80% de concordance environ entre les deux méthodes. Les données sur les bactéries semblent apporter une belle perspective de leur utilisation en routine en complément de méthodes manuelles.

Conclusion : l'utilisation en routine de cet automate pour la cytologie des liquides d'épanchement est satisfaisante. Des algorithmes de prise en charge avec l'UF4000 pour ces liquides ont été créés afin d'optimiser la prise en charge des prélèvements et le rendu de résultat.

Jury

Président du jury : Professeur Catherine Mullié-Demailly

Membres du jury : Professeur Nadine Lemaître, Docteur Morgane Choquet, Docteur Emilie Legrand-Pluquet