

## **1. Facteurs pré-analytiques importants en pathologie clinique vétérinaire**

### **1.1. Généralités concernant l'hématologie, l'endocrinologie, la biochimie et la sérologie**

#### **1.1.1. Collecte, manipulation et transport des spécimens au laboratoire.**

Les informations sur les conditions requises pour la collecte, la manipulation, et la livraison ou l'expédition du spécimen devraient être accessibles aux clients, pour tout test effectué en laboratoire, soit sous forme électronique, soit sous forme écrite (manuel des services du laboratoire, feuillet d'information spéciale, articles de journal ou bulletin d'information), soit par renseignement téléphonique. La collecte des échantillons doit être effectuée selon des méthodes standard. Les notices des fabricants renferment des informations détaillées sur le type d'échantillon approprié, y compris sur les tubes de collecte et les conditions de manipulation. Chaque laboratoire devrait fournir au client les recommandations pour la soumission de l'échantillon. Les spécimens devraient être manipulés avec soin et transportés au laboratoire dans les plus brefs délais, dans des conditions appropriées au type d'échantillon et à sa stabilité. Le type de spécimen (par ex., sang total, sérum, plasma, urine) devrait être clairement indiqué sur l'étiquette du spécimen. Un écart aux protocoles recommandés peut nuire aux résultats des tests. Contactez les fabricants pour les détails spécifiques.

##### **a. Hématologie**

- i. Les frottis sanguins faits à la clinique ne devraient pas être réfrigérés et devraient être protégés de la condensation et du gel durant le transport au laboratoire.
- ii. Les échantillons anticoagulés pour l'hématologie qui révèlent des caillots macroscopiques après inspection visuelle produiront des résultats variablement erronés. La clinique devrait être contactée par écrit ou par téléphone et informée que l'échantillon produira des résultats erronés. Le degré de l'imprécision ne pouvant être prédit, les échantillons coagulés sont impropres à l'analyse et il n'est pas recommandé qu'ils soient analysés. Si des échantillons de qualité douteuse ou subnormale sont analysés, chaque procédure et inexactitude possible devrait être documentée par écrit par le laboratoire. En outre, tout résultat possiblement inexact devrait avoir un commentaire facilement identifiable sur la feuille de résultats destinée au clinicien et indiquer clairement que ces valeurs peuvent être inexactes et trompeuses.

#### **1.1.2. Identification du spécimen.**

Les spécimens devraient être identifiés par une information pertinente telle que déterminée par le laboratoire, concernant par exemple le nom du propriétaire, l'espèce, le signalement de l'animal, le nom de la clinique ou du vétérinaire, l'adresse, les numéros de téléphone et de fax, l'adresse e-mail, le site de prélèvement du spécimen etc. Des identifiants uniques et correspondants devraient être situés sur le formulaire de demande d'analyse ainsi que sur le contenant du spécimen.

### **1.1.3. Identification du test.**

Le(s) test(s) demandés devrait(aient) être clairement noté(s) ou indiqué(s) sur le formulaire de demande d'analyse.

### **1.1.4. Accès au spécimen.**

Les informations sur le spécimen, son identification et les tests demandés devraient être correctement entrés dans le Système d'Information du Laboratoire (SIL). Les renseignements présents dans le SIL peuvent être utilisés pour retrouver l'emplacement de l'échantillon et le mode de conservation approprié, par exemple; immunologie vs. hématologie, congelés vs. réfrigérés. L'aliquotage des spécimens et leur transport à la section du laboratoire ou aux départements appropriés devraient être coordonnés. Tout problème concernant la qualité de l'échantillon, notamment (mais non limité à) l'hémolyse, la lipémie, la gélification du spécimen, ou tout autre condition analytiquement significative devraient être enregistré et communiqué aux clients et au personnel du laboratoire. Si le degré d'imprécision associé à la qualité de l'échantillon est susceptible d'être significatif, l'échantillon ne devrait pas être analysé et / ou les résultats ne devraient pas être transmis. Tout problème avec les résultats transmis ou non transmis devraient être communiqué au client et, si possible, un nouvel échantillon devrait être obtenu.

### **1.1.5. Communication et éducation du client.**

La communication entre le personnel du laboratoire et les clients (internes ou externes) devrait se faire à des moments opportuns et de façon courtoise, en ce qui concerne les facteurs pré-analytiques influençant les résultats des tests de laboratoire (par ex. formulaire de demande d'analyse incomplet, type d'échantillon ou transport inapproprié, mauvaise qualité de l'échantillon). Les clients devraient être informés de la date prévue de réception des résultats préliminaires et définitifs. De la même façon, les commentaires des clients devraient être encouragés. Toute plainte/commentaire/suggestion, orale ou écrite, devrait être documentée et transmise à la personne approprié. Des réunions de gestion et bilans

organisationnels doivent être menés pour assurer le suivi des actions correctrices, dans un délai opportun et approprié.

#### **1.1.6. Sécurité du personnel.**

Les conditions devraient être confortables et appropriées pour la saisie des données informatiques, la transcription des données, la manipulation et l'élimination des spécimens et toutes les autres tâches. Une attention particulière devrait concerner le travail répétitif. Les Équipements de Protection Individuelle (EPI) devraient être adaptés à la manipulation des spécimens et à l'utilisation de l'équipement présent dans toutes les sections du laboratoire. Les procédures de sécurité pour l'élimination des échantillons, déchets, et autres substances devraient être adaptées à la nature du matériel en question. Le personnel devrait suivre une formation d'hygiène et sécurité concernant l'exposition aux produits chimiques potentiellement dangereux ou aux agents pathogènes infectieux présents dans les matières biologiques. Les documents d'hygiène et sécurité devraient être disponibles et facilement accessibles pour chaque membre de l'équipe. La formation devrait inclure les bases de la prévention de la contamination bactérienne ainsi que de l'information sur les zoonoses. Toute formation devrait être documentée.

#### **1.1.7. Environnement du laboratoire.**

L'environnement du laboratoire devrait respecter les normes standards nécessaires pour des performances rapides, efficaces et sans danger. L'espace de travail devrait être bien éclairé et aménagé afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité. L'équipement et les instruments devraient être en état de marche. Des protocoles de procédure à jour devraient être facilement accessibles pour consultation si nécessaire. Les installations de laboratoire devraient être en conformité avec les agences gouvernementales appropriées.

#### **1.1.8. Exigences concernant le personnel.**

Le personnel devrait répondre aux exigences de formation recommandées pour les domaines spécifiques du laboratoire. La formation, la formation continue, et la recertification pour des tâches spécialisées devraient être régulièrement programmées et documentées. Le laboratoire devrait avoir suffisamment de personnel pour répondre à la charge de travail.

#### **1.1.9. Système D'Information du Laboratoire (SIL).**

Les Systèmes d'Information du Laboratoire (SIL) sont destinés à améliorer le flux de travail et l'efficacité du laboratoire. Avant d'être utilisé, un SIL doit être soigneusement évalué et sa capacité à maintenir des enregistrements précis doit être vérifiée. Un SIL inefficace et

difficile à utiliser devrait être mis à jour ou amélioré en fonction des besoins du laboratoire. Les SIL devraient respecter la réglementation légale régissant l'archivage des dossiers médicaux. Tout problème d'accès à l'échantillon ou d'archivage devrait être corrigé immédiatement.

#### **1.1.10. Identification de tests envoyés en sous-traitance.**

Les clients devraient être informés des tests qui sont référés à d'autres laboratoires.

### **1.2. Hématologie manuelle d'espèces non-mammaliennes.**

#### **1.2.1. Collecte, manipulation et transport des spécimens au laboratoire.**

Le délai acceptable pour le transport de sang d'oiseaux est plus court que celui du sang de mammifères et de reptiles. Des études contrôlées ont montré que le sang d'oiseaux réfrigéré se détériore dans les douze heures quel que soit l'anticoagulant utilisé (Harr et al, 2005). Le délai acceptable pour le transport des frottis sanguins d'oiseaux est semblable à celui des frottis sanguins de reptiles et de mammifères. Une agrégation leucocytaire/plaquettaire visualisée dans l'hématimètre devrait être signalée pour indiquer que la numération et la formule leucocytaires sont erronées. Les échantillons hématologiques de requins devraient être traités dans les 5 heures (Arnold, 2005). L'EDTA (7,5% ou 1-2 mg/mL de sang) est acceptable pour la plupart des espèces animales, mais ne convient pas à toutes. Le sang de raies, de certains poissons osseux et de certains oiseaux réagit de façon anormale dans les tubes EDTA commercialisés. En raison d'une osmolalité plasmatique élevée (~1000mmol/kg), le sang d'élastombranches (requins et raies) devrait être placé sur anticoagulant sec. Les anticoagulants liquides peuvent être utilisés s'ils sont ajustés pour l'osmolalité.

#### **1.2.2. Exigences concernant le personnel.**

Le personnel de laboratoire devrait avoir une formation spécifique pour la manipulation et la préparation de spécimens provenant d'espèces exotiques. La formation devrait inclure les bases de la prévention de la contamination bactérienne ainsi que de l'information sur les zoonoses, y compris Chlamydia, le virus de West Nile, Salmonella, l'influenza aviaire et Giardia. La documentation de la formation spécifique, de la formation continue et de l'évaluation périodique des compétences devrait être laissée à la discrétion du directeur du laboratoire.

### **1.3. Analyse d'Urine**

### **1.3.1. Collecte, manipulation et transport des spécimens au laboratoire.**

L'identification du mode de prélèvement de l'urine est importante lors de l'interprétation qualitative et quantitative de contaminants potentiels, comme le sang et les bactéries. Le prescripteur de l'analyse devrait indiquer clairement la méthode par laquelle l'urine a été obtenue, soit par miction (début, milieu, fin), cathétérisme, cystocentèse, collection à partir du sol ou d'une cage métabolique. Si l'examen de l'urine s'effectue dans les 30 minutes suivant le prélèvement, des récipients transparents peuvent être utilisés afin de faciliter l'examen macroscopique. Si l'analyse ne pouvait être effectuée dans les 30 minutes, l'urine devrait être protégée des rayons UV pour prévenir la dégradation des composants urinaires, (par ex., la bilirubine). Les couvercles devraient être sécurisés pour éviter l'évaporation et / ou la volatilisation de composants urinaires (par ex., les corps cétoniques).

### **1.3.2. Stockage de l'urine**

Idéalement, l'urine devrait être analysée dans les 30 minutes suivant le prélèvement. Si l'analyse immédiate n'est pas possible, l'urine devrait être conservée au réfrigérateur pour minimiser les changements physico-chimique de l'urine et d'inhiber la croissance bactérienne. Des recommandations strictes ne peuvent être effectuées sur la durée du stockage de l'urine réfrigérée, car elles dépendent des composants spécifiques de l'urine (Rabinovitch, 2009). Il est généralement recommandé d'entreposer l'urine au réfrigérateur pour une période maximale de 24 heures (Osborne suggère avec précautions 6-8 heures), mais l'urine peut être stable sur des périodes plus ou moins longues en fonction de sa composition initiale. Les constituants chimiques particulièrement instables comprennent la bilirubine, le glucose et le pH si des bactéries sont présentes (Rabinovitch, 2009; Osborne, 1999). La stabilité des éléments formés dépend du pH et de la concentration de l'urine. Des cristaux peuvent se former *in vitro* lors du stockage à température ambiante ou au réfrigérateur. (Albasan, 2003; Sturgess, 2001). Si la cristallurie est une préoccupation clinique, de l'urine fraîchement recueillie devrait être examinée immédiatement. Les échantillons réfrigérés devraient être ramenés à température ambiante avant analyse. Les résultats d'analyse d'urine pouvant être affectés par la durée et la température de stockage, l'heure du prélèvement, l'heure d'arrivée au laboratoire, et la méthode de stockage devraient être enregistrées. Des méthodes alternatives de conservation sont disponibles pour la stabilisation du profil biochimique, pour l'inhibition de la croissance bactérienne et pour la préservation des éléments formés. Les recommandations du fabricant devraient être suivies concernant l'utilisation d'agents

de conservation particuliers et de la durée de stockage.

### **1.3.3. Culture microbiologique.**

Des techniques quantitatives de culture microbiologique sont recommandées pour déterminer la présence d'une bactériurie significative. Les spécimens d'urine recueillis par cystocentèse sont préférables, mais ceux obtenus correctement par cathétérisme ou miction sont acceptables si des méthodes de cultures quantitatives sont utilisées. Afin d'éviter la contamination du spécimen, l'urine devrait être soumise à la culture microbiologique avant de procéder à l'analyse d'urine. Une aliquote stérile peut être mise de côté pour une éventuelle culture microbiologique suite à l'analyse d'urine. Les échantillons d'urines réfrigérés sont acceptables pour la culture microbiologique pour au moins 6 heures et souvent jusqu'à 24 heures. La réfrigération de spécimens urinaires pendant 24 heures peut entraîner des résultats de culture faussement négatifs (Padilla, 1981). Si un milieu de transport bactériostatique est utilisé, les échantillons n'ont pas besoin d'être réfrigérés.

## **1.4. Cytologie/Microbiologie**

### **1.4.1. Collecte, manipulation et transport des spécimens au laboratoire.**

L'information concernant les demandes d'analyses cytologiques/microbiologiques devraient être fournies au client dans un manuel de service de laboratoire, fiche d'information spéciale, article de journal, bulletin d'information, documents écrits ou instructions verbales. Les instructions devraient concerner les modes de prélèvement, les milieux de prélèvement (avec ou sans anticoagulants), la préparation des étalements et la fixation des spécimens, si pertinents. Une collecte appropriée des spécimens cytologiques/microbiologiques augmentera la probabilité d'une interprétation significative.

**1.4.2.** Les spécimens cytologiques non fixés et les étalements cytologiques séchés à l'air et non colorés devraient être protégés contre l'exposition au formol et aux vapeurs de formol, qui interfèrent avec la coloration. Le transport des spécimens devrait s'effectuer dans des contenants hermétiquement fermés ou séparément des biopsies fixées au formol.

**1.4.3.** L'identification du site, de la méthode et de l'heure du prélèvement est très importante pour une préparation et une interprétation optimales. Le cytologiste vétérinaire ou cytopathologiste devrait être bien informé des effets des différentes

méthodes de prélèvement, du délai de préparation et de mauvaises manipulations des spécimens de cytologie, en particulier pour les liquides biologiques, pour ce qui concerne les caractéristiques cytologiques attendues et leur interprétation. Pour les liquides biologiques, un ou plusieurs étalement(s) direct(s) devrait(ent) être fait(s) à partir de l'échantillon, avant toute autre procédure de concentration ou de fixation. Le(s) étalement(s) peut(vent) être coloré(s) ou laissé(s) non coloré(s) et devrait(aient) être soumis avec le tube du liquide prélevé. Ceci permettra d'estimer le nombre de cellules et les proportions des différents types cellulaires. Ceci peut fournir de précieuses informations qui influencent l'interprétation cytologique et permet un contrôle de qualité supplémentaire : le cytologiste/cytopathologiste veille à ce que la numération cellulaire corresponde raisonnablement aux estimations faites à partir des étalements directs. Cela évite également la gêne engendrée par la densité extrême de cellules après concentration de l'échantillon.

## **1.5. Hémostase (Coagulation)**

### **1.5.1. Collecte, manipulation et transport des spécimens au laboratoire.**

Pour la coagulation, le respect des modes de prélèvement et de stockage est obligatoire pour obtenir des résultats de tests précis. Le sang total devrait être recueilli sur citrate trisodique dans un ratio de 9:1 et adéquatement mélangé. Ceci est réalisé en remplissant le tube jusqu'à la marque indiquée. Les spécimens qui ne sont pas conformes à cette dilution devraient être rejetés (Adcock, 1998). Il peut être nécessaire d'ajuster le volume de citrate pour les spécimens provenant d'individus très anémiés ou polycythémiques. (Stockham and Scott, 2008, p. 277). Pour les tests nécessitant du plasma, le tube citraté est centrifugé et réfrigéré à 2-8°C. Le plasma devrait être séparé des cellules sanguines et transféré dans un tube en plastique (et non en verre) (Fiebig, 2005, Kratz, 2006). La stabilité des spécimens à température ambiante ou au réfrigérateur (2-8 ° C) est de 4 heures pour le TCA (*Activated Partial Thromboplastin Time*, Temps de Céphaline Activée) et 24 heures pour le TQ (*Prothrombine Time*, Temps de Quick). Si les tests ne sont pas effectués dans ces délais, les spécimens devraient être congelés à -20°C. (Adcock, 1998). Idéalement, un spécimen frais de sang total citraté utilisé pour un test de fonction plaquettaire ou autre analyse de coagulation devrait être conservé moins d'une heure (Giger, par communication). Si les échantillons sont envoyés par voie postale dans un laboratoire plutôt que par dépôt direct, le plasma devrait être placé dans un tube en plastique puis congelé, emballé et expédié sur glace afin d'arriver congelé dans les 24 heures.

### **1.5.2 Veuillez consulter le bulletin d'information de laboratoire 1 1.5.1.A**

Des détails supplémentaires étaient ajoutés ici comme le fait que plus de 90% des erreurs de tests hémostatiques pourraient être attribuées à des facteurs pré-analytiques de transport et de manipulation. (Lippi, 2006; Valenstein, 2009; Bonini, 2002; Dale, 2002)

## **1.6 Test de compatibilité (crossmatch)**

### **1.6.1 Collecte, manipulation et transport des spécimens au laboratoire.**

Du sérum ou du plasma peuvent être utilisés pour le test de compatibilité ; cependant, l'espèce à tester et des procédures particulières peuvent influencer ce choix. Des sérums frais pourraient servir de source de complément, utilisé pour détecter l'hémolyse chez le chien et le chat, mais ce n'est pas typiquement effectué. Les échantillons utilisés pour le test majeur de compatibilité incluent le sérum (tube sans additif) ou le plasma (EDTA ou citrate) du receveur et le sang total anti-coagulé (EDTA, ACD, ou citrate) ou les hématies concentrées du(des) donneur(s). Les échantillons utilisés pour le test mineur de compatibilité incluent le sang total anti-coagulé du receveur et le sérum ou le plasma du(des) donneur(s). Les échantillons du receveur et des donneurs devraient avoir moins de 24 heures si possible. Les échantillons des donneurs peuvent être aussi vieux que l'unité de sang à tester. Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, ils devraient être stockés à 4°C. Pour certaines procédures, du sang total est utilisé, alors que d'autres nécessitent une suspension d'hématies lavées avec au PBS. Les recommandations générales pour le prélèvement, la manipulation et le transport des spécimens hématologiques doivent être suivies.

**1.6.2. Identification du spécimen.** Les spécimens du receveur et du(des) donneur (s) devraient être clairement identifiés en tant que receveur et donneur (s), avec la date, l'heure et l'identification du receveur et de chaque échantillon de donneur soumis. Des formulaires de demande d'analyse, spécifiques à chaque individu, devraient être utilisés afin d'identifier clairement les receveurs et les donneurs.

## **1.7. Méthodes Radioimmunologiques (section laissée intentionnellement vide pour l'instant)**

Se reporter à Hegstad-Davies, 2006 pour une revue de littérature.

## 2. Facteurs analytiques importants en pathologie clinique vétérinaire

### 2.1 Généralités

#### 2.1.1 Contrôle

- a. Contrôle interne.** Le contrôle interne de tout équipement est recommandé pour tout ce qui concerne la sécurité électronique, le calibrage, l'entretien du matériel et les performances de l'équipement. Un registre de performance de l'appareil est recommandé pour chaque instrument, contenant les informations sur les problèmes rencontrés, leur investigation et résolution. L'utilisation de matériels pour le contrôle de qualité interne est détaillée en section 2.1.5 Contrôle de Qualité. Les résultats accumulés de ces contrôles de qualité devraient être vérifiés de façon systématique et régulière en utilisant les tracés de Levey-Jennings; des actions appropriées devraient être prises si les résultats sont en dehors des limites ou montrent des tendances indésirables. (Westgard, 2006).
- b. Contrôle externe (Test de compétence).** Le contrôle externe devrait comprendre la participation à un programme externe d'évaluation de la compétence, spécifique aux laboratoires vétérinaires de diagnostic. Pour une description plus complète du contrôle de compétence, se référer à Bellamy et Olexson (Bellamy, 2000).
- i. Tous les laboratoires participants devraient analyser le même matériel.
  - ii. Les résultats devraient être listés régulièrement (mensuellement, trimestriellement ou annuellement) et distribués aux participants avec des résumés statistiques exprimant la proximité des résultats de chaque laboratoire à la moyenne du groupe.
  - iii. Les moyennes devraient être calculées et analysées selon la méthode analytique utilisée (les mêmes méthodes sont comparées).
  - iv. Chaque laboratoire devrait évaluer soigneusement la validité de ses résultats de performance. Un écart marqué par rapport à la moyenne du groupe devrait inciter une investigation.

**2.1.2 Validation de méthode.** Avant l'adoption d'une nouvelle procédure ou de l'utilisation d'un nouvel instrument, la validation de la méthode ou de l'instrument devrait

être effectuée pour s'assurer que la procédure est conforme aux standards du laboratoire et aux affirmations du fabricant. Les procédures de validation d'une méthode ou d'un instrument devraient évaluer la linéarité, la précision, l'exactitude, la gamme analytique, la limite basse de détection (LLD) / la limite biologique de détection (BLD) / la sensibilité fonctionnelle (FS) du test et examiner les effets de substances interférentes. Les intervalles de référence ainsi que les procédures du contrôle de qualité devraient être établis avant l'utilisation du test sur des patients. Si les données disponibles pour la détermination des intervalles de références sont insuffisantes, ceci devrait être expliqué dans une note ainsi que les bases pour l'interprétation (Linnet, 2006)

Les recommandations de qualité analytique, telles que l'erreur totale acceptable ( $TE_a$ ) ou les limites de décision clinique devraient être établies pour chaque test, méthode ou instrument avant toute étude de validation. (Westgard, 1974). Ces exigences servent de référence pour les performances du test. Toute nouvelle méthode ou nouvel appareil dont l'erreur totale, telle que déterminée au cours des études de validations, ne répondant pas aux critères de recommandations devra être rejeté. (Westgard, 2006)

Les procédures de validation d'un instrument ou d'une méthode sont listées dans l'ordre dans lequel elles sont réalisées. De nombreux logiciels sont disponibles pour faciliter l'analyse statistique des résultats obtenus lors d'études de validation. Des informations supplémentaires ainsi que des outils graphiques pour la validation de méthode sont disponibles sur le site [www.westgard.com](http://www.westgard.com).

a. **Étude de linéarité.**

i. Cinq niveaux de solutions sont recommandés et peuvent être préparés comme suit.

L'utilisation de solution matricielle se rapprochant des échantillons réels est préférable aux dilutions à l'eau ou aux solutés salés. (Westgard, 2008a)

Niveau 1: Proche de la limite de détection du test

Niveau 2: 3 parts d'un mélange à basse concentration plus 1 part d'un mélange à haute concentration

Niveau 3: 2 parts d'un mélange à basse concentration plus 2 parts d'un mélange à haute concentration

Niveau 4: 1 part d'un mélange à basse concentration plus 3 parts d'un mélange à haute concentration

Niveau 5: Excédant la limite supérieure attendue du test

ii. Trois à quatre mesures de chaque spécimen sont recommandées. (Westgard, 2008a)

- iii. La valeur moyenne obtenue pour chaque spécimen est placée sur l'axe y alors que la valeur attendue est placée sur l'axe x. (Westgard, 2008a)
  - iv. Le tracé est ensuite inspecté visuellement pour repérer les valeurs aberrantes, évaluer la linéarité et déterminer la courbe de tendance. (Westgard, 2008a)
  - v. Si les résultats du test ne sont pas linéaires dans la gamme analytique recommandée par le fabricant, la méthode doit être rejetée. La gamme analytique peut être éventuellement changée pour tomber dans la région linéaire.
- b. **Étude de répétabilité à court terme**; estimation de l'imprécision («*random error*») de la méthode sur un intervalle de temps de courte durée. Les échantillons sont analysés sur une période de 8 heures ou au cours d'une même série analytique. (Westgard, 2008c)
- i. Des solutions standards, solutions de contrôle ou des pools d'échantillons frais de patients peuvent être utilisés.
  - ii. Les niveaux de chaque analyte devraient être proches des seuils de décision clinique. Un minimum de deux niveaux (normal et élevé) est recommandé si une élévation de l'analyte d'intérêt est médicalement significative. Au moins trois niveaux sont recommandés (bas, normal et élevé) si l'analyte d'intérêt est médicalement significatif si diminué ou augmenté.
  - iii. Au moins vingt réplicats sont conseillés durant l'intervalle de temps d'intérêt.
  - iv. Les données sont reportées et la normalité de la distribution est vérifiée. Si la distribution n'est pas gaussienne, des valeurs aberrantes devraient être recherchées. Les causes des valeurs aberrantes devraient être déterminées et si possible, corrigées. Si la distribution n'est toujours pas gaussienne après l'élimination des possibles valeurs aberrantes, la transformation des données peut alors être recommandée pour les analyses statistiques supplémentaires.
  - v. L'analyse des données comprend les calculs des moyennes, écart-types (SD) et coefficients de variation (CV).
  - vi. Comparer SD et CV (représentant des mesures de l'erreur aléatoire) au standard de laboratoire (erreur totale acceptable ou seuil de décision clinique). Si SD ou CV dépasse ce standard, la méthode devrait être rejetée. Pour cette évaluation initiale, le biais est considéré comme nul. Des analyses supplémentaires incluant le biais (déterminé à partir d'une comparaison des méthodes) devraient être réalisées pour que cette information soit disponible.
- c. **Étude de répétabilité à long terme** (reproductibilité ou variabilité inter-essai) : estimation de l'erreur aléatoire, ou imprécision, de la méthode sur une plus longue

période, représentant des conditions de travail réel. Au moins 20 échantillons sont analysés sur différentes séries analytiques et sur une période d'au moins 20 jours. Pour la sélection des échantillons et l'analyse des données, se référer à la méthode d'étude de répétabilité à court terme.

- d. **Comparaison de méthodes** : Estimation du biais (erreur systématique) d'une méthode à tester (nouvelle méthode) par rapport à une méthode de comparaison (référence) si elle existe.
- i. Choisir la méthode de comparaison (référence) en fonction de sa précision et de sa qualité. La méthode de comparaison peut être une méthode définitive, de référence ou une autre méthode de terrain tel que défini par Tietz. (Tietz 1979). La comparaison à des données techniques peut aussi être considérée; cependant, une attention particulière quant à l'exactitude de ces données est recommandée.
  - ii. Un minimum de 40 spécimens de patients testés par les deux méthodes est recommandée. (Jensen 2006; Westgard 2008d)
  - iii. Les spécimens devraient représenter la gamme des résultats attendus en clinique et couvrir la gamme analytique entière, avec un nombre adéquat d'échantillons aux extrémités de la gamme. (Jensen, 2006)
  - iv. Des mesures en doublon sont préférées mais des mesures uniques sont acceptables. (Jensen 2006). Les résultats devraient être examinés au moment de l'analyse. Si une différence significative est détectée entre les valeurs obtenues par les deux méthodes, l'échantillon devrait être retesté immédiatement pour vérifier si la divergence est répétable ou si une erreur est survenue.
  - v. Les spécimens devraient être analysés sur une période de deux heures par la méthode testée et la méthode de référence (ou plus rapidement, en fonction de la stabilité de l'analyte). Le traitement des échantillons devrait être défini pour éviter une variation étrangère aux méthodes. Si les échantillons sont analysés dans des laboratoires différents (avec plus de 2h d'intervalle entre les tests), la stabilité de l'échantillon doit être prise en compte.
  - vi. L'étude devrait être conduite sur une période de 5 à 20 jours, une période plus longue étant préférable (par exemple, 2 à 5 spécimens par jour pendant 20 jours).
  - vii. Analyse des données
    1. Un tracé de comparaison entre les deux méthodes est recommandé pour une inspection visuelle; la méthode testée étant placée sur l'axe des y et la méthode de référence sur l'axe des x. Les échantillons donnant des valeurs aberrantes doivent être réanalysés si la stabilité de l'analyte d'intérêt le

permet. Une courbe de tendance peut être tracée selon l'évaluation visuelle des données (Jensen 2006).

2. Le calcul du coefficient de corrélation ( $r$ ) détermine l'équation statistique qui estimera l'erreur systématique (biais). Pour les analytes qui varient sur de larges intervalles, une régression statistique est nécessaire pour déterminer cette erreur systématique (biais). (Jensen 2006, Westgard 2008d). Pour des analytes qui varient peu (électrolytes par exemple), des analyses statistiques de type t-test sont utilisées pour estimer le biais (erreur systématique).

(Westgard 2008d).

- Si  $r \geq 0.99$  pour des données qui varient sur de larges intervalles ou si  $r > 0.975$  pour des données qui varient sur de petits intervalles, une régression linéaire standard peut être utilisée pour estimer l'erreur systématique à des concentrations de décisions cliniques. (Jensen 2006, Westgard 2008d, Stockl 1998). Le biais à un niveau de décision particulier ( $X_c$ ) peut être déterminé en calculant la valeur correspondante selon l'équation de régression linéaire :

1.  $Y_c = a$  (pente)  $X_c + b$  (ordonnée à l'origine)

2. Erreur Systématique (biais) =  $Y_c - X_c$

- Si  $r < 0.99$  ( ou  $< 0.975$ ), les données peuvent être améliorées en collectant plus de résultats ou en diminuant la variance par des mesures en doublons, ou en utilisant des statistiques de type t-test apparié pour estimer le biais correspondant à la différence entre deux moyennes obtenues par deux méthodes. (Jensen 2006, Westgard 2008d). Cependant, le t-test apparié ne peut pas être utilisé s'il existe une erreur proportionnelle (Westgard 2008e). Alternativement, les outils statistiques d'analyses de régression Passing-Bablok ou Deming peuvent être utilisés. La subdivision de résultats en catégories (inférieurs, supérieurs ou compris dans l'intervalle de référence) peut être utilisée pour apporter une évaluation supplémentaire de résultats compris dans des intervalles cliniquement significatifs. (Jensen 2006)

- viii. Un tracé de différence (Bland-Altman) est aussi recommandé. La différence entre la méthode testée et la méthode comparative est tracée sur l'axe des ordonnées (axe y) alors que la moyenne de chacune des deux méthodes est tracée sur l'axe des abscisses (axe x). La droite de différence identifie l'erreur systématique (biais). Pour des tests sans biais, les résultats sont répartis de part et d'autre de la

droite correspondant à une différence nulle, avec approximativement la moitié des résultats situés au dessus et l'autre moitié des résultats situés au dessous de cette droite. (Bland 1986, Jensen 206, Hyloft 1997).

- ix. Les critères d'acceptation de la performance dépendent de l'erreur totale acceptable (TEa) du test utilisé par chaque laboratoire. L'erreur totale calculée (TE calc) comprend l'erreur systématique (biais) et l'erreur aléatoire (S).  $TE\ calc = \text{Biais mesuré} + 3S\ mesurée$ . La performance de la méthode est considérée acceptable si  $TE\ calc < TEa$ . Un diagramme de décision d'évaluation des méthodes, prenant en compte la TEa, le biais (erreur systématique ES) et l'erreur aléatoire (RE) peut aussi être utilisée pour déterminer si la méthode est acceptable ou non. (Westgard 2008b).
  
- e. **Étude d'interférence** : Estimation de l'erreur systématique causée par la présence de substances dans le spécimen à analyser. Ces erreurs sont constantes et proportionnelles à la concentration de la substance causant l'interférence. (Westgard 2008f). Les interférences fréquentes sont l'hémolyse, la lipémie et l'ictère. (Bellany 2000). Des comparaisons supplémentaires peuvent être faites entre le plasma hépariné et le sérum, le sérum collecté sur tubes secs par rapport aux tubes contenant des gels séparateurs et autres interférents possibles tels qu'indiqués par le test ou l'appareil en question.
  - i. Des solutions standards, des spécimens de patients ou des pools d'échantillons de patients peuvent être utilisés. Ces derniers étant préférables compte tenu de leur disponibilité et de la complexité de leur matrice. (Westgard 2008f). Les échantillons contenant des niveaux variés d'analytes compris dans l'intervalle clinique devraient être choisis (Westgard 2006).
  - ii. Des quantités prédéfinies d'hémoglobine, de lipides (solutions commerciales disponibles) et de bilirubine (solutions standard commerciales) sont ajoutées aux échantillons pour atteindre des concentrations croissantes pouvant être présentes dans échantillons de patients (Westgard 2008f)
  - iii. Le volume de substance interférente devrait être minimal afin d'éviter des changements de la matrice. (Westgard 2008f). Il est recommandé d'analyser les échantillons en doublon; de petites différences causées par la substance interférente pouvant être masquées par l'erreur aléatoire inhérente à la méthode d'analyse. (Westgard 2008f).
  - iv. Les mesures devraient être réalisées par la nouvelle méthode et la méthode comparative (de référence) si elle existe. Si chacune des méthodes montre une erreur systématique comparable causée par la substance interférente, la présence

du biais seul ne peut être la cause du rejet de la nouvelle méthode. (Westgard 2008f).

- v. Calcul du biais relatif à l'interférence. (Westgard 2008f)
    - 1. Calculer la moyenne des doublons des échantillons contenant la substance d'interférence et du contrôle.
    - 2. Calculer la différence (biais) entre l'échantillon contenant la substance d'interférence et son contrôle.
    - 3. Calculer la différence moyenne (biais) pour tous les spécimens contenant la substance interférente à différentes concentrations.
  - vi. Un t-test apparié est recommandé pour comparer les échantillons contenant la substance d'interférence et leurs contrôles respectifs. Les statistiques de régression ne sont pas applicables. Le t-test évalue le nombre de déviations standard entre un échantillon altéré (contenant la substance d'interférence) et un échantillon non altéré. (Westgard 2008f)
  - vii. La performance est considérée acceptable si l'erreur systématique mesurée est inférieure à l'erreur totale autorisée. Si ce n'est pas le cas, le laboratoire devrait décider si des spécimens susceptibles de contenir la substance d'interférence peuvent être identifiés et rejetés le cas échéant ou si l'effet de l'interférence potentielle pourrait être évalué de façon quantitative ou semi-quantitative aux moyens d'études supplémentaires.
- f. **Étude de récupération** (*Recovery study*). Estimation de l'erreur systématique (SE) proportionnelle. La SE proportionnelle se présente lorsqu'une substance de la matrice de l'échantillon réagit avec l'analyte et entre en compétition avec le réactif d'analyse. L'ampleur de la SE augmente de façon proportionnelle à la concentration de l'analyte. L'erreur systématique proportionnelle est déterminée par le calcul du pourcentage de récupération après qu'une quantité standardisée d'analyte ait été ajoutée au spécimen du patient. (Westgard 2008f)
- i. Des solutions standards de hautes concentrations sont fréquemment utilisées puisqu'elles permettent de minimiser l'effet de dilution lorsqu'elles sont ajoutées aux spécimens d'intérêt, tout en induisant un changement significatif de la concentration d'analyte. La dilution du spécimen original ne devrait pas excéder 10%.
  - ii. La quantité d'analyte à ajouter doit aboutir à un échantillon qui atteint le prochain seuil de décision médicale pour cet analyte. De la même façon que pour les études

d'interférence, des petites additions seront plus affectées par l'imprécision inhérente à la méthode que de grosses additions.

- iii. Il est recommandé d'analyser les échantillons modifiés et leurs contrôles respectifs en doublons. Les échantillons de récupération devraient être analysés par la méthode à tester et par la méthode comparative. Le nombre d'échantillons de patients à analyser dépend du nombre et des types de réactions susceptibles de provoquer une erreur systématique.
- iv. Quand une étude de récupération est faite dans le cadre de l'évaluation d'une nouvelle méthode, celle-ci devrait être réalisée par la nouvelle méthode et par la méthode de référence.
- v. Calcul des données (pour un exemple, se référer à Westgard 2008f ou au lien suivant <http://www.westgard.com/lesson27.htm#4>)
  1. Calculer la quantité d'analyte ajoutée :  
Concentration standard ajoutée x (volume de la solution standard ajoutée / (volume de la solution standard ajoutée + volume de l'échantillon)), volumes exprimés en mL
  2. Calculer la moyenne des résultats obtenus pour chaque échantillon (doublons)
  3. Calculer la différence entre l'échantillon altéré et le contrôle
  4. Calculer la récupération en divisant la différence par la quantité d'analyte ajoutée
  5. Calculer la moyenne des récupérations pour toutes les paires testées
  6. Calculer l'erreur systématique proportionnelle ainsi: 100% - récupération %
- vi. La performance est considérée acceptable si la SE mesurée est inférieure à l'erreur totale acceptable. Une erreur systématique proportionnelle de faible amplitude est acceptable; cependant, la méthode devrait être rejetée si l'erreur systématique proportionnelle est importante et plus grande que l'erreur totale acceptable.
- g. **Intervalle de référence pour une nouvelle méthode / nouvel appareil** : La création d'un nouvel intervalle de référence ou la validation d'un intervalle de référence existant est nécessaire à la prise de décision clinique.  
**Se référer aux nouvelles recommandations de l'ASVCP pour la génération et le maintien d'intervalle de références et du seuil de décision.**

- h. **Étude de limite de détection** : Estimation de la plus faible concentration pouvant être mesurée. La vérification de la limite de détection est recommandée pour tous les tests pour lesquels une valeur basse a un intérêt clinique (Westgard 2008g).
- i. Un échantillon « blanc » et un échantillon contenant une quantité faible de l'analyte sont utilisés. L'utilisation de plusieurs échantillons contenant l'analyte à des concentrations proches de la limite de détection telle que déterminée par le fabricant est recommandée.
  - ii. L'analyse de 20 doublons pour chacun des échantillons est recommandée.
  - iii. Les analyses du « blanc » (*ie*, ne contenant pas l'analyte d'intérêt) peuvent être réalisées lors de séquence analytique simultanée (*within-run*) ou différée (*across-run*) la même journée. Toutefois, les échantillons contenant l'analyte devraient être analysés sur une période de temps plus longue afin de prendre en compte les variations inter-essai. (Westgard 2008g)
  - iv. Les estimations quantitatives peuvent être reportées comme suit :
    1. Limite basse de détection (LLD) ou Limite de Quantification (LoQ) est définie comme étant la moyenne des résultats du « blanc » + 2-3 Écart-types  $LLD/LoQ = \text{Moyenne}_{\text{blanc}} + 2-3 \text{ Écart-types}$
    2. La limite biologique de détection est la moyenne des résultats du blanc +2-3 Écart-types de l'échantillon contenant l'analyte.
    3. La sensibilité fonctionnelle est la moyenne de l'échantillon contenant l'analyte qui a un coefficient de variation de 20%. Ceci représente la limite basse pour laquelle l'information quantitative est fiable. Plusieurs échantillons contenant l'analyte doivent être testés pour déterminer celui qui a un coefficient de variation de 20%.
- i. Sélection des Règles de contrôle de qualité (QC) pour le suivi statistique de la performance de la méthode (Validation du contrôle de qualité)
- i. La validation du QC peut être réalisée manuellement en utilisant des outils normalisés comme les chartes OpSpecs (OpSpecsCharts), des calculateurs (EZRUNS calculator, [www.westgard.com](http://www.westgard.com)) ou autre programmes d'assurance de qualité normalisés. (Friedrichs 2005)
  - ii. La validation QC utilise les critères d'erreur totale acceptable (TEa) (ou intervalle de décision clinique) pour le test avec le coefficient de variation (CV, Erreur Aléatoire) et le biais (Erreur Systématique) déterminé à partir de la réplication de l'expérience et de la comparaison des méthodes de

l'expérience, afin de déterminer des règles de contrôle pouvant être appliquées à des fins statistiques QC.

- iii. Pour la plupart des méthodes automatisées, une probabilité de détection d'erreur de 90% et une probabilité de faux rejets de <5% sont suffisants. Pour des dosages très stables avec peu de problèmes anticipés, une probabilité de détection d'erreur aussi faible que 50% peut être acceptable. (QP15 Foire aux questions sur la qualité de la planification. Disponible à l'adresse: [www.westgard.com](http://www.westgard.com) Consulté le 10 Novembre, 2009)
- iv. Différentes règles de QC peuvent être nécessaires pour un même analyte (*Multi-level QC*). Par exemple, des règles plus rigoureuses peuvent être recommandées afin détecter des erreurs à des faibles concentrations d'analytes, ce qui ne sera pas exigé pour des niveaux plus élevés.
- v. Différentes règles de QC peuvent être nécessaires pendant l'adoption d'une nouvelle méthode ou de sa calibration. Ces règles QC sont généralement plus rigoureuses que celles appliquées lors de l'utilisation habituelle d'une méthode de routine pour une méthode déjà établie (*Multistage QC*).

### 2.1.3. Instrumentation

- a. **Performance de l'appareil** : L'instrumentation et les méthodologies utilisées doivent pouvoir fournir des résultats conformes aux caractéristiques de performance du laboratoire (Linnet 2006). Ces dernières comprenant :
  - i. L'intervalle analytique contenant la limite de détection et la linéarité
  - ii. La précision
  - iii. L'exactitude
  - iv. La spécificité analytique (mesure du composé-cible). Ceci devrait définir les substances susceptibles de provoquer des interférences. Puisque les interférences ne peuvent pas toujours être évitées, le développement d'interférographes examinant l'effet des lipides, de la bilirubine et de l'hémoglobine sur les résultats d'analyse devrait être considéré. Les interférences étant spécifiques d'espèce, il est important d'établir des interférographes pour chaque analyte et espèce testés.
  - v. Sensibilité analytique
  - vi. Points supplémentaires à considérer :

1. Les appareils permettant des ajustements de réglages en fonction de l'analyte et de l'espèce devraient faire l'objet d'un contrôle attentif concernant la conformité de leurs résultats.
2. Les critères de performance du laboratoire et du fabricant devraient être comparés et donner lieu à des ajustements, si nécessaire.
3. S'assurer que les différences interspécifiques soient adressées. Le soutien technique du fabricant de l'instrument peut généralement assister à cette étape de qualification et d'installation de l'instrument.

#### **b. Vérification des fonctions**

- i. Des vérifications appropriées de chaque caractéristique opérationnelle critique devraient être faites sur tous les instruments (lumière parasite, mise à zéro, niveaux électriques, alignement optique, bruit de fond, etc.).
- ii. Avant d'analyser l'échantillon, le personnel de laboratoire devrait réaliser un contrôle de qualité et calibrer chaque appareil de façon quotidienne et à chaque utilisation. Les instruments devraient être utilisés selon les instructions du fabricant.

#### **c. Calibration.**

- i. Les appareils devraient être calibrés au moins tous les six mois. Des calibrations plus fréquentes peuvent être nécessaires: (Westgard 2008a)
  1. Selon les recommandations du fabricant
  2. Suite à une opération de maintenance majeure
  3. Quand les valeurs de QC sont hors des limites ou indiqué par le processus de résolution de problèmes (*troubleshooting*)
  4. Quand la charge de travail, la performance de l'équipement ou la stabilité des réactifs nécessitent une calibration plus fréquente
- ii. Suite à la calibration, les contrôles devraient être passés selon la procédure d'opération standardisée (SOP).

#### **2.1.4. Connaissance de base du personnel de laboratoire**

Le personnel du laboratoire devraient avoir des connaissances de base concernant les appareils et leur utilisation ainsi que des notions concernant les points suivants :

- a. Différences de linéarité entre les échantillons humains et animaux
- b. Effets de l'hémolyse, de la lipémie, de l'ictère, des caroténoïdes (grands animaux) et de différents anticoagulants sur chacun des tests
- c. Intervalles rapportés
- d. Intervalles de référence spécifiques d'espèce et/ou de souche

- e. Valeurs physiologiques habituelles. Des critères qui entraînent une ré-analyse peuvent être définis. Les critères qui entraînent une ré-analyse devraient inclure tout message d'erreur ou « *flag* » ou résultats fortement éloignés des valeurs physiologiques. Il est d'ailleurs possible de préprogrammer des « valeurs paniques » dans les appareils d'analyse biochimique. Le client doit être informé de chaque test supplémentaire réalisé pour confirmer un résultat aberrant (dans le rapport).
- f. Problèmes fréquemment rencontrés avec des échantillons vétérinaires et procédures à suivre en fonction des différents messages d'erreur signalés par l'instrument d'analyse
- g. Établir un programme d'entretien régulier des appareils (quotidien, hebdomadaire, mensuel, et au besoin)
- h. Remplacement d'équipement endommagé ou inadéquat
- i. Procédures de résolutions de problèmes techniques
- j. Les communications directes avec les clients devraient être réservées au personnel qualifié pour l'interprétation des résultats de laboratoire

**2.1.5. Contrôle de Qualité.** Les contrôles et calibrateurs devraient être identifiés de façon adéquate; leur utilisation devrait être documentée dans le cadre d'un programme de contrôle de qualité afin d'assurer l'exactitude des résultats.(Westgard, 1998). La documentation et la génération d'actions requises devrait suivre les règles et les politiques établies pour l'analyse des paramètres du contrôle de qualité. Ces dernières incluent la confirmation de résultats et l'utilisation de chartes, graphes tels qu'établis par le laboratoire pour chacun des départements ou type d'instrument. Une structure de rapport pour informer la gestion de problèmes de QC devrait être mise en place. Les problèmes nécessitant une attention particulière devraient être transmis aux endroits appropriés au sein de l'organisation. Des contrôles sur les actions correctrices devraient être mises en place afin d'en évaluer l'efficacité.

**a. Sélections des règles du contrôle de qualité pour le suivi statistique de la performance de la méthode (Validation du contrôle de qualité)**

- i. La validation QC peut être réalisée manuellement en utilisant des outils normalisés comme les chartes OpSpecs, le calculateur EZRUNS ([www.westgard.com](http://www.westgard.com)) ou d'autres programmes d'assurance qualité normalisés. (Friedrichs 2005)
- ii. La validation QC utilise les critères utilisés pour déterminer l'erreur totale acceptable (TEa) (ou intervalle de décision clinique) pour le test du coefficient de

variation (CV, Erreur Aléatoire) et du biais (Erreur Systématique) à partir de la réplication de l'expérience et de la comparaison des méthodes de l'expérience, afin de déterminer les règles de contrôle possibles qui peuvent être appliquées à des fins statistiques QC.

- iii. Pour la plupart des méthodes utilisées, une probabilité de détection d'erreur de 90% et une probabilité de faux rejet de moins de 5 % sont suffisants. Pour des tests très stables avec peu de problèmes attendus, une probabilité de détection d'erreur de 50% est acceptable
  - iv. Différentes règles de QC peuvent être nécessaires pour un même analyte (Multi-level QC). Par exemple, des règles plus rigoureuses sont recommandées pour détecter des erreurs à des faibles concentrations d'analytes, ce qui ne sera pas exigé pour des niveaux plus élevés.
  - v. Différentes règles de QC que celles utilisées en routine pour une méthode déjà établie peuvent être nécessaires pendant l'adoption d'une nouvelle méthode ou sa calibration, ces dernières étant typiquement plus rigoureuses.
- b. Les réactifs et matériels** devraient être identifiés avec la date de réception et d'ouverture et entreposés selon les recommandations du fabricant. Les dates d'expiration devraient être respectées et les réactifs périmés éliminés de façon appropriée. Les solutions de contrôle utilisées contiennent en général des concentrations en analyte correspondant à des résultats bas ou élevés par rapport à des conditions pathologiques spécifiques de la médecine humaine. Si ces niveaux ne correspondent pas à des conditions pathologiques relative à une espèce, il peut être nécessaire d'utiliser des solutions contrôle supplémentaires contenant des niveaux d'analyte correspondant à des conditions pathologiques dans l'espèce d'intérêt.
- c. Le nombre de contrôles** à utiliser dépendra en partie de la performance de l'équipement, ce qui est déterminé par le processus de validation du contrôle de qualité. En général, 2 à 3 solutions de contrôle sont utilisées mais pour certains tests, des contrôles supplémentaires peuvent être utilisés pour augmenter la probabilité de détection d'erreur et diminuer la probabilité de faux rejet.
- d. Les contrôles** doivent être effectués une fois toutes les 24 heures, à moins que le fabricant recommande une fréquence plus élevée.

**e. La stabilité du réactif** pendant la durée du cycle d'analyse doit être vérifiée au cours de la validation de la méthode en testant des contrôles à différents moments pendant un cycle d'analyse typique et en comparant les moyennes et écart types obtenus avec ceux des tests de précision intra-essai.

**f. La fréquence des QC s'établit selon les considérations suivantes:**

- i. La fréquence des tests (fréquence d'utilisation) et le nombre d'analyses réalisées chaque jour ou sur un même cycle d'analyse.
- ii. Degré selon lequel les exigences de la méthode et de la qualité du test dépendent d'une performance technique précise.
- iii. Stabilité du réactif et de l'analyte.
- iv. Fréquence des échecs aux contrôles de qualité.
- v. La formation et l'expérience du personnel.
- vi. Coût des contrôles de qualité (une hausse de la fréquence des contrôles de qualité augmente le « coût -par-test »).

**g. Paramètres du contrôle de qualité**

- i. Les laboratoires devraient établir des critères, ou vérifier les critères du fabricant pour une gamme acceptable de performance pour le matériel utilisé pour le contrôle de qualité. La moyenne, l'écart-type, et le coefficient de variation devraient être calculés sur un minimum de 20 mesures. Il est recommandé que les contrôles proviennent du même numéro de lot.
- ii. Les contrôles devraient être testés de la même façon que les échantillons de patient.
- iii. Au moins un niveau de contrôle devrait être testé à chaque nouveau lot de réactif.
- iv. Un mécanisme devrait être mis en place afin de s'assurer que le personnel technique suit correctement les politiques et procédures d'opération.
- v. L'utilisation des procédures de Westgard ou autres règles de validation de QC est recommandée.
- vi. Le cumul des résultats du contrôle de qualité devrait être examiné sur une base régulière et de manière systématique en utilisant les tracés de Levey-Jennings. Prendre les mesures appropriées lorsque les résultats des contrôles de qualité dépassent les limites ou démontrent des tendances indésirables.
- vii. Les politiques et procédures doivent être rassemblées dans un manuel. La révision annuelle (ou plus fréquemment) des politiques et procédures doit être effectuée et documentée par le personnel.
- viii. Les résultats du QC devraient être révisés fréquemment afin de s'assurer que les mesures adéquates ont été prises si les critères d'acceptabilité n'étaient pas

- rencontrés. Les mesures correctrices devraient être décrites pour le personnel de laboratoire.
- ix. Le matériel de contrôle, de préférence obtenu commercialement, devrait provenir du même lot. Si des calibrateurs sont utilisés comme contrôle, il est préférable d'utiliser des calibrateurs provenant de lots différents. Si des échantillons poolés sont utilisés, il est nécessaire d'établir la valeur moyenne des analytes (minimum N= 10 afin d'établir une moyenne).
  - x. Il est nécessaire de contrôler les résultats de spécimen cliniques par rapport à différents types d'erreurs en utilisant des paramètres comme le trou anionique (anion gap), en comparant les résultats d'analyses précédentes pour le même paramètre (contrôle delta) et en cherchant la cause de résultats aberrants (contrôle limite).
  - xi. Les instructions du fabricant quant à la maintenance (quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle) et la calibration de l'appareil d'analyse devraient être suivies à moins que des recommandations intrinsèques au laboratoire soient justifiées et documentées de façon appropriée. Chaque maintenance, calibration ou réparation devrait être répertoriée et conservée dans le laboratoire ou l'unité de métrologie.

**2.1.6 Manuel de procédures.** Cf. Westgard et Klee pour les grandes lignes du contenu du manuel de procédures recommandées (Westgard 2006). Les protocoles devraient être imprimés dans des manuels et/ou conservés dans des ordinateurs. Chaque procédure en fonction devrait être décrite dans un manuel de procédures facilement accessible au personnel du laboratoire chargé de l'appliquer. La rédaction de ces procédures devrait être effectuée par une personne assignée. L'organisation du/des manuel(s) varie selon le volume dudit manuel, les besoins et les recommandations du laboratoire. Il se peut que certaines organisations accréditées aient des recommandations spéciales nécessitant des procédures d'opération standardisées (SOP). Une fois le nouveau personnel entraîné, il est recommandé de documenter toute nouvelle compétence technique et connaissance relatives au test au moyen d'une liste de contrôle. Il est nécessaire de s'assurer que le personnel soit à l'aise avec chaque procédure, nouvelle ou révisée. Certains organismes d'accréditation peuvent avoir des exigences spécifiques et de procédures standards d'opération (SOP) spécifiques sont recommandés. La plupart des procédures de laboratoire devraient être correctement couvertes par la liste des catégories ci-dessous. À l'issue de la formation de nouveau membre du personnel, une liste de case à cocher devrait être utilisée afin de déterminer la compétence du personnel dans l'exécution du test et la connaissance des aspects connexes de l'essai. Lorsque le document des procédures est en cours de révision, une revue des procédures avec le

personnel impliqué est recommandée afin de s'assurer que tous soient bien familiers avec les procédures révisées.

**a. Index**

**b. Généralités**

- i. Politiques et Procédures générales
- ii. Assurance Qualité
- iii. Traitement et durée de conservation des échantillons
- iv. Traitement et archivage des données brutes
- v. Émissions de routine
  1. Information concernant le service d'analyse
  2. Recommandations concernant les échantillons
  3. Recommandations de transport
  4. Temps d'exécution

**c. Procédures d'Opération Standardisée (SOP) pour chaque procédure.** Les informations contenues dans une SOP peuvent varier mais les sujets suivants sont recommandés (Westgard 2006)

- i. Titre (incluant la date ou le numéro de la version)
- ii. Objectif et application de la procédure
- iii. Les principes de la technique
- iv. Gestion des échantillons
  1. Préparation du patient (ex., information spécifique d'espèce)
  2. Collection et traitement des spécimens (volume minimal, ...)
  3. Critères de rejet des échantillons
- v. Précautions et Limites opérationnelles
  1. Dangers
  2. Interférences
    - Hémolyse, ictère, lipémie
    - Anticoagulants
    - Médicaments, etc.
  3. Intervalle
  4. Sensibilité et Spécificité, si applicable.
- vi. Réactifs
  1. Conditions et lieu de conservation
  2. Préparation
  3. Durée de conservation une fois ouverts

4. Fabricant
- vii. Équipement
  1. Équipement ou outils nécessaires pour compléter la procédure
  2. Lieu
  3. Mesures à prendre lorsque le système est hors d'état (se référer à la section "Tests envoyés en sous-traitance" ou fournir des informations supplémentaires)
- viii. Procédures de calibration et du contrôle de qualité
  1. Matériels
  2. Fréquence
  3. Interprétation (quand vérifier les résultats, retester un échantillon, résoudre un problème, etc)
- ix. Procédure (instructions étape par étape).
- x. Intervalles de références pour chaque espèce.
- xi. Interprétation et Rapport : valeurs critique (actions recommandées).
  1. Chaîne de Communication.
    - Interne.
    - Information provenant du représentant technique.
  2. Étapes de résolution de problèmes
    - Contrôle de qualité.
    - Répétition d'un test.
    - Dilutions (diluant approprié).
- xii. Références bibliographiques
- xiii. Documentation
  1. Nom, date et signature du rédacteur (date d'implémentation si différente de celle de la rédaction).
  2. Nom, date et signature du relecteur (si applicable).
  3. Registre de formation du personnel.
- xiv. Appendices
  1. Registre et Feuilles de Travail
    - Documentation de l'observation et de la résolution des problèmes
    - Documentation des résultats
  2. Les notices du fabricant. (La plupart des informations ci-dessus peuvent être obtenues directement à partir de la notice du fabricant. Si tel est le cas, le SOP peut référer à certaines sections applicables de la notice.)
  3. Feuille "Aide Memoire"

- Guide de référence rapide
- Titre et version de la procédure

**2.1.7. Comparaison des résultats.** Si le laboratoire effectue le même test avec plus d'une méthode, sur plusieurs sites, ou à l'aide d'un laboratoire de référence, des comparaisons devraient être effectuées au moins annuellement afin de définir les corrélations entre les différentes méthodes d'analyses et les différents sites. Des Recommandations pour la Comparaison des Méthodes sont actuellement en rédaction. Se référer au site internet de l'ASVCP.

Les mesures suivantes devraient être incluses:

- a. Comparer au moins 20 échantillons dont les résultats couvrent la gamme analytique
  - i. Construire un tracé de comparaison x-y à partir des données
  - ii. Calculer la pente et l'ordonnée à l'origine en utilisant la méthode des moindres carrés.
  - iii. L'utilisation d'un logiciel de statistique spécifique à la pathologie clinique (ex, EP Evaluator) permet la comparaison des méthodes grâce à un ensemble d'intervalles analytiques et de cibles de performance acceptable (CLIA)
- b. Le directeur du laboratoire ou le personnel qualifié devrait définir les limites acceptables de performance.
- c. Si des résultats de tests réalisés sur un même patient ou matériel ne corrélaient pas entre eux (ex, concentrations en urée/créatinine, équilibre électrolytique), il est impératif d'en trouver la cause, de documenter la situation et d'entreprendre une action corrective.
- d. Le contrôle de résultats d'activité enzymatique devrait être effectué au moins tous les 6 mois ainsi qu'après chaque service ou problème technique. Une étude de linéarité et la comparaison des résultats de chacun des appareils d'analyse par régression linéaire devraient être réalisées.

## 2.2 Biochimie Clinique

### 2.2.1 Contrôle

- a. Le contrôle interne devrait comprendre :

- i. La qualité de l'eau (comme spécifié par l'instrumentation ou le test)
  - ii. La stabilité de l'alimentation électrique (comme spécifié par l'instrumentation)
  - iii. La température des bains d'eau, réfrigérateurs et congélateurs (contrôle quotidien recommandé). Les gros équipements électriques devraient être branchés sur un système d'alarme afin d'alerter les utilisateurs si les températures sont hors de limites préétablies.
  - iv. La calibration régulière des balances analytiques et des pipettes (contrôle annuel recommandé).
  - v. La mise à jour des manuels de procédures standardisées, les dates d'implémentation initiale et de révision devraient apparaître clairement et être disponibles. Un système devrait être mis en place afin de n'utiliser que les dernières versions mises à jour et d'archiver les versions anciennes qui ne doivent pas être en circulation.
  - vi. Entreposage, manipulation appropriée et entretien de l'inventaire
  - vii. Rédaction et maintien d'un répertoire comprenant les changements de procédure, les problèmes de méthodes ou instrumentaux, les mesures entreprises pour résoudre les problèmes. Toutes les entrées devraient être clairement datées et signées par le personnel de laboratoire. Cette fonction peut être réalisée par l'unité de métrologie et entretenue de façon électronique pour un accès aisé lors d'une inspection réglementaire ou d'assurance de qualité.
- b. Contrôle externe. Cf Recommandations générales**
- i. Validation de méthode - Cf Recommandations générales
  - ii. Instrumentation - Cf Recommandations générales
  - iii. Connaissance du personnel - Cf Recommandations générales
  - iv. Contrôle de Qualité - Cf Recommandations générales
  - v. Manuel de Procédures - Cf Recommandations générales
  - vi. Comparaison de Tests - Cf Recommandations générales
  - vii. Identification des tests réalisés à l'externe

## **2.3. Hématologie**

**2.3.1 Contrôle** - Cf Recommandations générales

**2.3.2 Validation de Méthode** - Cf Recommandations générales. Il se peut que certaines étapes de validation décrites en section 2.1.2 ne s'appliquent pas à l'évaluation des analyseurs d'hématologie. Il est nécessaire d'adapter la méthode de validation à ces appareils

afin de s'assurer que leur fonctionnement suit les critères du laboratoire et les recommandations du constructeur.

### **2.3.3 Instrumentation** -Cf Recommandations générales

### **2.3.4. Connaissance de base du personnel** - Cf Recommandations générales

### **2.3.5. Contrôle de Qualité en Hématologie** - Cf Recommandations générales

#### **a. Tests automatisés, indices calculés et microscopie**

- i. Comptage des hématies (RBC)
- ii. Concentration en Hémoglobine
- iii. Hématocrite
- iv. Morphologie des hématies incluant le RDW (ou IDR, indice de distribution des rouges), indice de distribution de l'hémoglobine (HDW), volume globulaire moyen (VGM), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCH)\*CH et concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine MCHC/CHCM\* (mesure directe au laser de l'analyseur d'hématologie ADVIA)
- v. Comptage des leucocytes
- vi. Formule leucocytaire (manuelle et automatisée)
- vii. Morphologie des érythrocytes et leucocytes (microscopie)
- viii. Comptage des plaquettes
- ix. Indices plaquettaires (MPV et PCT)
- x. Comptage des réticulocytes (manuel et automatisé)
- xi. Les frottis sanguins devraient être préparés et colorés afin d'en permettre la lecture si celle-ci est jugée nécessaire par le pathologiste clinique.

#### **b. Recommandations**

- i. Il est recommandé de vérifier manuellement les formules leucocytaires obtenues de façon automatisée. Etablir des critères de lecture des frottis pour confirmer les résultats obtenus (exemple, confirmer un comptage leucocytaire  $> 20\,000/\mu\text{L}$ ).
- ii. Comptages manuels: Les comptages manuels réalisés à l'aide d'un hématimètre doivent être faits en duplicata. Si les résultats obtenus diffèrent de plus de 10%, les chambres de lecture devraient être rechargées et le comptage refait en doublon. Si un contrôle est utilisé pour le comptage manuel des globules blancs, rouges et de plaquettes, un niveau de compte cellulaire ou un contrôle de procédure (défini ci-dessous) devrait être effectué à chaque fois que cette méthode est utilisée ou une fois par période de travail.
  - i. Une procédure de contrôle est définie comme étant l'un des suivants :
    - a. Dilutions en doublon soit d'un contrôle de dosage ou d'un échantillon de patient préalablement testés. Les résultats peuvent ainsi être

comparés à des limites définies précédemment comme acceptables pour les différences entre les doublons. (C'est le seul contrôle de procédure acceptable pour le comptage manuel des hématies).

- b.** Le nombre de globules blancs et des plaquettes peut être comparé à une valeur estimée à partir d'un frottis de sang périphérique.
- iii. Les frottis colorés au Bleu de Méthylène Nouveau peuvent être lus afin d'estimer le comptage réticulocytaire. Si les comptages sont faits en doublon, il ne devrait pas y avoir une différence de plus de 10% entre les résultats.
- iv. Les comptages de réticulocytes obtenus par l'appareil devraient correspondre au degré de polychromatophilie observé sur les frottis.
- v. Les microhématocrites doivent correspondre aux hématocrites calculés par les analyseurs (en utilisant le VGM et la numération en hématies). Le laboratoire devrait définir la différence maximale permise, ce qui peut varier selon les espèces.
- vi. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) peut être artificiellement augmentée en cas d'hémolyse (pathologique ou *in vitro*), de lipémie et de présence de corps de Heinz. Si aucune de ces conditions n'est présente, une erreur instrumentale doit être envisagée.

**2.3.6. Manuel de Procédures** - Cf Recommandations générales

**2.3.7. Comparaison des Tests** - Cf Recommandations générales

**2.3.8. Identification des Tests réalisés à l'Externe (en sous traitance)** - Cf Recommandations générales

## **2.4 Hématologie manuelle pour les espèces non-mammifères**

**2.4.1. Contrôle** : Le contrôle interne doit comprendre les éléments suivants: la préparation des réactifs de diluant pour le comptage (Eau pure de qualité analytique, vérification de la qualité du nouveau lot comparé aux lots précédents).

**2.4.2. Validation de méthode** : Cf Recommandations générales. Il se peut que certaines étapes de validation décrites en section 2.1.2 ne s'appliquent pas à l'évaluation des méthodes utilisées en hématologie des animaux exotiques. Il est nécessaire d'adapter la méthode de validation à cette spécialité afin d'assurer que ces méthodes suivent les critères du laboratoire et les recommandations du fabricant.

**2.4.3. Instrumentation** - Cf Recommandations générales. L'équipement (hématimètre, lamelles, compteurs, pipettes calibrées, ...) nécessaire aux procédures d'hématologie devrait être en bon état de fonctionnement. Le contrôle quotidien et la maintenance régulière de cet équipement (ex, calibration annuelle des pipettes) devraient être documentés. Les rapports de maintenance, de dysfonctionnement et de réparation devraient être conservés. Abbott Diagnostics, Inc (Abbott Park, Illinois) a validé et supporte les comptages cellulaires automatisé à l'aide d'appareils d'hématologie de type Cell Dyn 3500 ou supérieur chez certaines espèces non mammifères. Cette validation a été effectuée dans les laboratoires Sea World.

**2.4.4. Connaissance de base du personnel.** Les techniciens doivent savoir reconnaître les différents types cellulaires pour ces espèces. Il est aussi nécessaire de comprendre que certaines variations spécifiques peuvent influencer les résultats de cytométrie de flux et de savoir si une vérification manuelle est requise le cas échéant.

**2.4.5. Contrôle de Qualité.** Les comptages leucocytaires manuels sont fondamentalement imprécis et possèdent des coefficients de variation de 20-40 % (Schalm, Harr et al, 2005); par conséquent, l'implémentation d'un contrôle de qualité et d'analyses statistiques peuvent produire des résultats démontrant une signification qui peut être ou ne peut pas être approprié au fonctionnement quotidien de l'appareil. Les études de validation de méthode réalisées chez le requin par J. Arnold (2005) ont démontré des coefficients de variation de comptages leucocytaires manuels comparables à ceux retrouvés dans les notices d'informations provenant du fabricant d'Unopette 365855 utilisé en médecine humaine quand les échantillons sont analysés dans les 5 heures suivant le prélèvement.

**a. Réactifs et Matériels.** Les protocoles de comptages cellulaires comprennent le comptage direct utilisant le Violet de Méthyle (Natt et Herrick, 1952) pour déterminer les comptages des hématies, des leucocytes et des plaquettes, le comptage direct sans coloration (Hawkey, 1988) ou une méthode indirecte utilisant la Phloxine B (Campbell, 1988) pour le comptage leucocytaire total seulement. Dans cette dernière méthode, seules les cellules contenant des granules éosinophiles sont colorées et la numération leucocytaire est calculée en fonction des pourcentages d'hétérophiles et d'éosinophiles obtenus à partir de la formule leucocytaire.

Les études de validation de méthode entre les méthodes directe et indirecte sont contradictoires (Dein, 1994; Arnold, 1995) et nécessitent de plus amples informations. Il est préférable de suivre les recommandations de Westgard pour la validation de méthode avec un

nombre plus représentatif d'espèces animales. Il se peut que cette disparité de résultats soit due à l'imprécision de chacune des méthodes. Par exemple, le diluant décrit par Natt et Herrick peut être préparé en laboratoire et être utilisé pour toute espèce vertébrée non mammifère. Cependant, si ce diluant est utilisé pour certains chéloniens (tortues) et élasmobranches (requins, raies), l'utilisation de sels supplémentaires est nécessaire pour ajuster l'osmolalité de la solution (Arnold, 2005). La technique d'Hawkley utilisait le kit WBC Unopette de Becton Dickinson. La méthode de Campbell utilisant le diluant à la Phloxine B n'est plus disponible pour le kit Eosinophil Unopette 5877 mais un diluant comparable peut être préparé par l'utilisateur.

**b. Actuellement, aucun matériel de contrôle n'est disponible sur le marché pour le comptage des cellules sanguines chez les espèces non mammifères. Les contrôles de procédure incluent donc :**

i. Des dilutions d'échantillons de patients en doublon et dans un délai acceptable pour s'assurer de la stabilité du spécimen.

ii. L'estimation du comptage leucocytaire total à partir du frottis sanguin. Chaque institution devrait rédiger un protocole décrivant une méthode fiable évaluant l'exactitude des comptages cellulaires obtenus à l'hématimètre. L'estimation du comptage leucocytaire totale peut être difficile à cause de la ressemblance entre les lymphocytes et les plaquettes lorsque les frottis sont évalués à faible grossissement (normalement utilisé pour l'estimation de comptage leucocytaire chez les mammifères).

**c. Les tests de compétence des techniciens** devraient être documentés tous les ans ou plus fréquemment, selon les critères de chaque laboratoire. Les tests devraient inclure la comparaison de comptages totaux et de formules leucocytaires d'un même échantillon. La sélection des échantillons devrait être représentative de la population testée habituellement (aviaires, reptiles, téléostéens, élasmobranches, etc.). Une différence de 15% entre les techniciens pour les comptages totaux obtenus à l'hématimètre est acceptable; les résultats de la formule leucocytaire pour chaque type cellulaire devrait être compris dans les 95% de l'intervalle de confiance.

**Méthode directe de comptage cellulaire- Erreur Lymphocyte/Plaquette.** Il peut être difficile de différencier les lymphocytes des plaquettes à l'hématimètre pour un nouveau technicien. Un bon moyen de contrôle des résultats obtenus est de compter à l'hématimètre toute cellule qui n'est pas une hématie dans chacun des neuf carrés et de calculer le nombre total (cette valeur n'est évidemment pas exacte mais sera corrigée une fois la formule

réalisée). La deuxième étape de ce contrôle est de faire la formule deux fois : la première fois en incluant les plaquettes, et la deuxième fois en les excluant. Le second résultat est rapporté comme étant le différentiel réel. En utilisant le pourcentage de plaquettes déterminé à l'occasion du premier différentiel, il est possible d'en calculer la quantité et de la soustraire au comptage total obtenu précédemment pour finalement avoir le comptage leucocytaire total réel.

Exemple : Comptage manuel obtenu à l'hématimètre, à partir d'une dilution 1/100 = 750 cellules non hématies;  $750 \times 1.1 \times 100 = 82,500/\mu\text{L}$  pour le comptage de cellules non érythrocytaires. Résultats du premier différentiel= Monocytes (1%), Lymphocytes (9%), Hétérophiles (8%) et Plaquettes (82%). Par conséquent, la valeur totale de plaquettes est =  $0.82 \times 82,500 = 67,650$ . Le comptage leucocytaire total est donc =  $82,500 - 67,650 = 14,850/\mu\text{L}$ .

**2.4.6. Manuel de procédures** - Cf Recommandations générales

**2.4.7. Comparaison des Tests** - Cf Recommandations générales

**2.4.8. Identification des tests réalisés en externe** - Cf Recommandations générales

## **2.5 Analyse Urinaire**

**2.5.1. Manuel de Procédures** - Cf Recommandations générales

**2.5.2. Validation** de méthode - Cf Recommandations générales. Il se peut que certaines étapes de validation décrites en section 2.1.2 ne s'appliquent pas à l'évaluation des analyses d'urine. Il est nécessaire d'adapter la validation de méthode à ces analyses/appareils d'analyse afin de s'assurer que leur fonctionnement suit les critères du laboratoire et les recommandations du constructeur. Par exemple, la validation de méthode pourrait inclure, entre autres, la comparaison des méthodes, les tests d'interférences (par exemple, l'effet de la couleur de l'urine sur la lecture, visuelle et automatisée, des bandelettes) et les limites de détection.

**2.5.3. Instrumentation.** - Cf Recommandations générales. L'instrumentation employée pour les analyses d'urines se limite aux lecteurs de bandelettes urinaires. Ces lecteurs automatisés doivent être entretenus et leur utilisation devrait être réalisée selon les recommandations du constructeur.

**2.5.4. Connaissance de base du personnel.**

- a. Compréhension des effets de l'état de l'échantillon sur les paramètres de test, par exemple, l'effet de l'hémoglobinurie sur la détermination des protéines.

- b. Connaissance de spécificités d'espèce (ex, cristallurie, changements attendus)
- c. Connaissance des problèmes reliés à l'analyse d'échantillons urinaires vétérinaires pouvant engendrer des artefacts comme l'effet de la préservation sur les résultats ou l'analyse d'échantillons d'urine incorrectement analysés en mode sérum.
- d. Connaissance des bandelettes urinaires utilisées dans le laboratoire et interférences possibles.
- e. Critères définissant la nécessité de tester à nouveau un échantillon: Ils sont établis par le laboratoire et basés sur la signification clinique des résultats (par exemple, identification des cristaux urinaires, confirmation de la protéinurie par des méthodes quantitatives ou semi-quantitatives, confirmation de la glycosurie). Des méthodes utilisant des comprimés peuvent être utilisées quand l'urine est trop intensément pigmentée et interfère avec la lecture des bandelettes. Si nécessaire, la réalisation d'une nouvelle analyse doit être documentée sur la feuille de travail et/ou sur les rapports.

#### **2.5.5. Contrôle de Qualité- Cf Recommandations générales**

##### **a. Tests**

i. Tests physiques (apparence [couleur, turbidité], densité urinaire [estimée par réfractométrie])

##### **ii. Tests chimiques**

1. Bandelettes urinaires
2. Tests de confirmation (glucose [comprimé], bilirubine [comprimé], corps cétoniques [poudre ou comprimé], précipitation à l'acide sulfosalicylique pour les protéines)

**b. Procédures du contrôle de qualité** pour les bandelettes et la densité urinaire. Le matériel de contrôle des analyses urinaires humaines est utilisé afin de vérifier l'exactitude des bandelettes. La fréquence du contrôle de qualité dépend du nombre d'analyses réalisées par chaque laboratoire et peut varier du contrôle quotidien au contrôle réalisé à chaque utilisation d'un nouveau set d'analyse. L'exactitude des réfractomètres devrait être contrôlée régulièrement et réalisée en utilisant de l'eau distillée (Densité urinaire 1.000). (George, 2001)

**c. Examen microscopique des sédiments urinaires** : standardisation de la procédure.

- i. L'examen microscopique des sédiments urinaires vétérinaires nécessite une formation. Des textes, diagrammes et affiches d'éléments formés dans l'urine pour

différentes espèces devraient être accessibles aux techniciens comme référence. La réalisation de cet examen peut être détaillée dans une procédure opérationnelle standardisée (SOP).

- ii. Un volume standard d'urine est utilisé pour préparer les sédiments urinaires (par exemple, 5 ou 10 mL), en fonction de l'espèce et des tests requis. La centrifugation des tubes coniques doit être effectuée à basse vitesse (400-500g pendant 5 min). Une vitesse élevée et une centrifugation trop longue pourraient endommager les cylindres et autres éléments cellulaires.  $RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times$  rayon du rotor (en cm) x Révolutions/min.
- iii. Le surnageant est retiré après décantation à l'aide d'une pipette afin d'en laisser un volume constant (en général 0.5 mL) et re-suspendre les éléments contenus dans le culot.
- iv. Un colorant peut être ajouté une fois que les éléments du culot ont été re-suspendus pour en faciliter l'identification. Un nombre constant de gouttes de colorant doit être ajouté, puis le mélange agité doucement. La dilution secondaire à l'ajout d'un volume de colorant doit être prise en compte dans les résultats finaux. Une autre alternative est de remplacer une partie du surnageant par du colorant afin de conserver un volume constant de sédiment.
- v. Une pipette est utilisée pour transférer une ou deux gouttes de sédiment sur une lame en verre, en fonction de la taille des lamelles. Il est important que le volume de sédiment, le nombre de gouttes de sédiment et la taille de la lamelle utilisée soit constants au sein du laboratoire.
- vi. Des méthodes alternatives pour standardiser les sédiments urinaires sont disponibles (grilles volumétriques, méthodes automatisées) mais ne sont pas fréquemment utilisées en médecine vétérinaire. Chaque nouvelle méthode doit être précédemment validée.

#### **d. Examen microscopique du sédiment : énumération des éléments.**

- i. Le sédiment doit être examiné à faible grossissement (x 100 ou LPF) puis à fort grossissement (x 400 ou HPF, sans immersion) et rarement à l'immersion (x 1000). Il existe plusieurs façons de quantifier les éléments observés sur le sédiment urinaire. Le rapport de la quantité absolue a plusieurs avantages. La quantité de chacun des éléments observés sur 10 champs, ou leur moyenne, est rapportée. L'utilisation de résultats semi quantitatifs (0 a 3 + ou 0 a 4 +) est possible si des critères précis sont définis pour les techniciens. Ces critères doivent aussi être accessibles aux cliniciens et aux clients. Une SOP pour

l'analyse urinaire devrait être rédigée et décrire de façon claire et précise la méthodologie à suivre pour réaliser l'examen microscopique des sédiments urinaires et en rapporter les résultats.

- ii. L'observation à faible grossissement est utilisée pour rapporter les cylindres. Les cylindres sont quantifiés et rapportés en fonction de leur type. L'observation à faible grossissement permet également une évaluation générale du sédiment et la distribution des différents éléments le constituant (mucus, spermatozoïdes, lipides, levures, etc.).
- iii. L'observation à fort grossissement permet de quantifier la présence d'hématies, de leucocytes, des cristaux, de cellules épithéliales et de bactéries.
- iv. L'observation à l'immersion permet de rapporter la concentration et la morphologie de certains éléments cellulaires et bactériens.
- v. L'observation de micro-organismes (bacilles ou coques, levures, etc.) sur des sédiments colorés ou non colorés devrait être confirmée sur des frottis (cytospin ou étalement direct) colorés avec un kit de coloration rapide ou avec une coloration de Gram.

2.5.6. Manuel de procédures - Cf Recommandations générales

2.5.7. Comparaison des Tests - Cf Recommandations générales

2.5.8. Identification des tests réalisés à l'externe - Cf Recommandations générales

## **2.6. Cytologie.**

**2.6.1. Contrôle.** L'équipement et les réactifs utilisés en analyse cytologique devraient être contrôlés selon les bonnes pratiques de laboratoire telles que décrites dans les sections de biochimie et d'hématologie de ces recommandations.

**2.6.2. Validation de méthode** - Cf Recommandations générales. Il se peut que certaines étapes de validation de méthodes décrites en section 2.1.2 ne s'appliquent pas à l'évaluation des méthodes utilisées en cytologie. Il est nécessaire d'adapter la méthode de validation à ces analyses/appareils d'analyse afin de s'assurer que leur fonctionnement suit les critères du laboratoire et les recommandations du fabricant.

**2.6.3. Instrumentation** - Cf Recommandations générales.

**2.6.4. Connaissance de base du personnel.**

- a. Les techniciens devraient pouvoir évaluer l'aspect macroscopique des prélèvements (ex., couleur, turbidité) et savoir réaliser les tests de routine ou spéciaux (ex., test de coagulation à la mucine).

- b. Les techniciens devraient connaître les problèmes potentiels lors de la préparation des échantillons et être capables de suivre les procédures de résolution de problèmes.
- c. L'interprétation de spécimens vétérinaires doit préférablement être réalisée par des pathologistes vétérinaires après avoir suivi une formation documentée en cytopathologie et avoir une connaissance des résultats cytologiques de toutes les espèces et types d'échantillons cytologiques évalués par le laboratoire.
- d. Un système adéquat devrait exister pour obtenir un deuxième avis, révision supplémentaires ou de consultation avec un cytopathologiste, si nécessaire ou demandé.
- e. Les démarches visant à vérifier l'exactitude du diagnostic des interprétations cytologiques devraient être effectuées. Celles-ci peuvent inclure, mais ne sont pas limités à :
  - i. Corrélation avec les résultats d'histopathologie ou avec l'analyse d'échantillons cytologiques supplémentaires
  - ii. Suivi de l'état du patient et réponse éventuelle au traitement
  - iii. Révision des échantillons par un cytologiste/cytopathologiste pour s'assurer qu'il n'y a pas eu d'erreur d'analyse ou d'interprétation.
  - iv. Corrélation avec d'autres examens complémentaires (radiographie, échographie, culture, etc.).
    - 1. Le cytologiste devrait pouvoir comprendre les résultats de tests annexes
    - 2. Le cytologiste devrait vérifier les techniques de prélèvements, du traitement des échantillons et apporter un soutien si nécessaire.
    - 3. Le cytologiste devrait pouvoir discuter des facteurs pré-analytiques, analytiques et post-analytiques avec les clients. Ces facteurs comprennent:
      - i. La pertinence des informations concernant le prélèvement
      - ii. Adaptation de certaines techniques
      - iii. Examens complémentaires envisageables
      - iv. Diagnostics et diagnostic différentiel
      - v. Pronostic ou suivi
      - vi. Recommandations thérapeutiques ou possibilité de référer à un spécialiste.

**2.6.5. Contrôle de qualité.** Cf Recommandations générales. Les cytopathologistes sont indispensables au contrôle de qualité car ils voient la quasi-totalité des échantillons cytologiques dont la préparation peut avoir un impact sur leurs interprétations et recommandations. Par conséquent, les relations entre les techniciens du laboratoire et les cytopathologistes est essentielle. Le contrôle de qualité devrait être adapté aux différents types d'échantillons, de colorations et de procédures de préparation et d'analyse des

spécimens cytologiques. Celles-ci peuvent varier selon les laboratoires, les types d'échantillons et les préférences des cytopathologistes. Les comptages cellulaires obtenus de façon automatisée ou manuellement (hématimètre) devraient corrélés entre eux et avec la cellularité estimée des échantillons si des frottis sont réalisés. L'équipement nécessaire à la détermination du comptage cellulaire devrait être contrôlé de la même façon que les analyseurs d'hématologie.

**2.6.6. Manuel de procédures-** Cf Recommandations générales.

**2.6.7. Comparaison de tests-** Cf Recommandations générales.

**2.6.8. Identification des tests réalisés à l'externe** - Cf Recommandations générales.

## **2.7 Tests de l'Hémostase**

**2.7.1. Contrôle-** Cf Recommandations générales.

**2.7.2. Validation des méthodes** - Cf Recommandations générales. Il se peut que certaines étapes de validation de méthodes décrites en section 2.1.2 ne s'appliquent pas à l'évaluation des méthodes utilisées pour l'exploration de l'hémostase. Il est nécessaire d'adapter la méthode de validation à ces analyses/appareils d'analyse afin de s'assurer que leur fonctionnement suit les critères du laboratoire et les recommandations du fabricant.

**2.7.3. Instrumentation** - Cf Recommandations générales.

**2.7.4. Connaissance de base du personnel** - Cf Recommandations générales.

**2.7.5. Contrôle de qualité pour les tests de coagulation** - Cf Recommandations générales.

### **a. Tests**

- i. Comptage plaquettaire et estimation du comptage plaquettaire
- ii. Morphologie des plaquettes
- iii. Tests de fonction plaquettaire (adhésion, agrégation, sécrétion, PFA100, temps de saignement buccal, tests ADN)
- iv. Tests d'anticorps antiplaquettaires
- v. Temps de thromboplastine partiel activée (APTT)
- vi. Temps de prothrombine (PT)
- vii. Temps de thrombine (TT) ou thrombin clot time (TCT)
- viii. Concentration en fibrinogène
- ix. Tests de facteurs de coagulation (tests fonctionnels et ADN)
- x. Tests du facteur Von Willebrand (analyse quantitative ELISA, analyse qualitative CBA, analyse des multimères, temps de saignement buccal, tests de fonction plaquettaire), analyse ADN pour mettre en évidence les mutations spécifiques

- xi. Produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF), D-dimères
- xii. Activité en Antithrombine
- xiii. Tests pour la Protéine C et la Protéine S
- xiv. Thrombéléstographie
- xv. Génération de thrombine
- xvi. Tests de fibrinolyse

#### **b. Recommandations**

- i. Les laboratoires doivent adapter leur emploi du temps en fonction des tests de coagulation demandés. Les études nécessitant de la thromboélastographie devraient être prévues à l'avance.
- ii. Les instruments portables sont calibrés régulièrement selon les recommandations du fabricant. Si un QC électronique est disponible, il devrait être réalisé selon les recommandations du fabricant. Un QC externe est recommandé lors de changement de lot(s) de réactif(s), de rotor, d'instrument endommagé, ou tout intérêt clinique. Au moins un contrôle par période de travail est recommandé pour les instruments de table si un test de coagulation est prévu. Celui-ci peut être réalisé préalablement ou pendant l'analyse de l'échantillon du patient.
- iii. Les spécimens de contrôle et du patient devraient être analysés en doublon.
- iv. Les résultats sont exprimés en % d'un pool d'échantillons; en général des intervalles de pourcentages issus d'échantillons contrôles sont fournis.

**2.7.6. Manuel de Procédures** – Cf. recommandations générales

**2.7.7. Comparaison des tests** – Cf. recommandations générales

**2.7.8. Tests réalisés à l'externe** – Cf. recommandations générales

### **2.8 Test de Compatibilité**

**2.8.1. Contrôle** – Cf. recommandations générales

**2.8.2. Validation de Méthode** - Se référer aux recommandations générales. Il se peut que certaines étapes de validation de méthodes décrites en section 2.1.2 ne s'appliquent pas à l'évaluation des méthodes utilisées pour les tests de compatibilité. Il est nécessaire d'adapter la validation de méthode à ces analyses/appareils d'analyse afin de s'assurer que leur fonctionnement suit les critères du laboratoire et les recommandations du fabricant.

**2.8.3. Instrumentation** – Cf. recommandations générales

**2.8.4. Connaissance de base du personnel** – Cf. recommandations générales

**2.8.5. Contrôle de Qualité** - Se référer aussi aux recommandations générales

### **a. Tests**

- i. Le test de compatibilité majeur consiste à tester le plasma/sérum du patient avec une suspension d'hématies du donneur dans du soluté salé.
- ii. Le test de compatibilité mineur, réalisable uniquement si le sang total du donneur a été soumis, consiste à tester une suspension saline dhématieess du patient avec le sérum/plasma du donneur.

### **b. Recommandations.**

- i. Si les sera sont utilisés pour les tests de compatibilité, ils devraient être séparés des hématies le plus rapidement possible après coagulation. La présence d'hémolyse doit être vérifiée et gradée de 1+ (légère) à 4+ (sévère) le cas échéant. Des sera (ou plasmas) avec une hémolyse 3 ou 4+ devraient être refusés, à moins que des critères de rejet plus restrictifs soient appliqués. Des sera/plasmas hémolysés peuvent masquer une réaction hémolytique incompatible (Lippi, 2006; Giger, communication personnelle).
- ii. Des autocontrôles du patient et du donneur doivent être réalisés pour s'assurer que les réactifs tels que le diluant par exemple, et l'équipement fonctionnent correctement. Les autocontrôles devraient être réalisés en parallèle et de la même façon que les tests de compatibilité majeur et mineur.
  1. L'autocontrôle du patient consiste à tester du sérum/plasma du patient avec une suspension saline d'hématies du même patient.
  2. Quand du sang total du donneur est soumis, l'autocontrôle du donneur consiste à tester du sérum/plasma du donneur avec une suspension saline d'hématies du même donneur.
- iii. Évitez de secouer ou taper excessivement, ce qui peut produire des résultats faux négatifs en perturbant les agglutinats fragile.
- iv. La formation de rouleaux peut imiter le phénomène d'agglutination vraie. La dilution de l'échantillon à l'aide de soluté salé peut être effectuée afin de disperser les rouleaux.
- v. Des résultats faux positifs peuvent être secondaires à un lavage inadéquat.
- vi. Puisque le plasma peut contenir de petits caillots de fibrine qui peuvent provoquer de la pseudo-agglutination, des résultats faux positifs peuvent donc se produire quand le plasma est utilisé afin de procéder aux tests de compatibilités.
- vii. Des résultats faux négatifs peuvent se produire secondairement à des suspensions de globules rouges trop diluées ou trop concentrées.

2.8.6. **Manuel de Procédures** – Se référer aux recommandations générales. Les procédures de test de compatibilité varient selon le laboratoire et les espèces testées. Des recommandations spécifiques sur les protocoles sont au-delà du champ d'application de ces directives. Il est recommandé d'établir des procédures de test de compatibilité, ou d'adopter des procédures provenant d'un autre laboratoire de référence.

2.8.7. **Comparaison des Tests** – Se référer aux recommandations générales.

2.8.8. **Identification des tests réalisés à l'externe** – Se référer aux recommandations générales.

2.8.9. **Examen des données** – Se référer aux recommandations générales.

## 2.9. Méthodes Radioimmunologiques

2.9.1. Réglementation gouvernementale sur les méthodes radioimmunologiques. La réglementation gouvernementale et les exigences de licence peuvent varier selon la ville, l'état, la province et le pays. En général, des exigences minimales pour la manipulation de radio-isotopes sont indiquées. Les exigences comprennent la formation sur la sécurité personnelle, le contrôle des isotopes radioactifs, l'élimination adéquate des isotopes, et l'inspection périodique. Une licence est nécessaire pour l'achat d'isotopes radioactifs. Un laboratoire envisageant utiliser des méthodes radioimmunologiques devrait d'abord déterminer s'il répond à ces normes et obtenir un permis avant d'établir les procédures diagnostiques.

2.9.2. Contrôle

2.9.3. Validation des méthodes. Toute méthode radioimmunologique devrait être validée pour les espèces auprès desquelles ces méthodes vont être utilisées. La validation devrait inclure l'une des méthodes décrites ci-dessous.

- a. Articles scientifique de journaux vétérinaires à comité de lecture. Il n'est pas de bonne pratique de se fier uniquement aux tests du fabricant. Le test devrait être validé de façon indépendante.
- b. Si la méthode ne peut être corroborée par un processus de validation indépendant, l'évaluation minimale suivante est nécessaire:
  - i. Précision Inter-Séries (Run-to-run) - minimum de 10 donnés
  - ii. Précision Intra-Séries (Within-run) - minimum de 10 donnés
  - iii. **Procédure de récupération** (*Recovery procedures*). – Utiliser une substance naturelle purifiée pour chaque espèce, si possible. La récupération devrait être réalisée en utilisant des échantillons de hautes et de basse concentration.
  - iv. Évaluation de substances interférentes telles l'hémolyse, la lipémie, la bilirubinémie, les interactions médicamenteuses, etc.

- v. Parallélisme - Dilutions et information sur la linéarité.
- vi. Un minimum de 30 animaux considérés «normaux» pour la substance à analyser devraient être évalués pour chaque espèce. L'évaluation clinique d'efficacité est également requise par l'étude d'individus malade.
- vii. Les courbes d'étalonnage sont nécessaires pour chaque test. Certains compteurs gamma peuvent stocker des courbes d'étalonnage. Si cette procédure est employée dans les tests de routine, la validation de la procédure devrait être effectuée.

2.9.4 Instrumentation – Se référer aux recommandations générales.

2.9.5 Connaissance de base du personnel – Se référer aux recommandations générales.

2.9.6 Contrôle de Qualité

- a. Un minimum de 3 contrôles doit être testé avec chaque test. Ceux-ci peuvent inclure des contrôles commerciaux pour des valeurs élevées, normale et basses ou des échantillons développés à l'interne.
- b. L'interprétation des résultats des méthodes radioimmunologiques dépend souvent de la méthodologie et des valeurs de référence établies en interne, ce qui rend difficile l'utilisation de certains types de systèmes de contrôle externe. Il est recommandé que lors de l'utilisation de substance de contrôle externe, des substances internes soient également analysées afin de comparer l'interprétation des analyses.
- c. Les substances de contrôles externes doivent être utilisés et reportés de façon graphique au moins trimestriellement.
- d. Tous les résultats des contrôles devraient être enregistrés et les valeurs et représentations graphiques devraient être facilement accessibles au personnel effectuant les tests. Les graphiques Levey-Jennings sont acceptables.
- e. Un plan d'action doit être mis en place détaillant l'acceptation ou le rejet des résultats des tests des patients basé sur des valeurs de contrôle.
- f. Si la procédure, indiquée par le fabricant ou des articles scientifique publiés, est modifiée (par exemple, seulement 1 tube par patient), la documentation devrait être disponible afin de démontrer que, suite a la (aux) modification(s), la précision et l'exactitude du test sont encore acceptables.

2.9.6. **Manuel de Procédures** – Se référer aux recommandations générales.

2.9.7. **Comparaison des résultats** – Se référer aux recommandations générales.

2.9.8. **Identification de tests envoyés en sous-traitance («send-outs»).** – Se référer aux recommandations générales

### **3. Facteurs Post-analytiques Importants en Pathologie Clinique Vétérinaire**

- 3.1. **Examen des Données.** Le laboratoire devrait établir une procédure de contrôle afin de passer en revue, soit par 2 technicien(ne)s, superviseur et/ou pathologiste, le spécimen et/ou les résultats. La revue peut être spécifique pour les tests problématiques, les paramètres de l'échantillon et /ou l'importance clinique des résultats de test.
- 3.2. **Entrée des données et Rapports.** Les rapports doivent être exacts, qu'ils soient créés manuellement ou électroniquement dans une base de données. Les données doivent être présentées dans un format standard tel qu'établi par le laboratoire. Si une inexactitude cliniquement significative est connue, les résultats reportés devraient définir clairement l'erreur ou les résultats ne devraient pas être rapportés.
- 3.3. **Génération de Rapports.** Les rapports doivent être présentés dans un format lisible et facile à comprendre avec les références appropriées ou des explications au besoin. Ils doivent être générés en temps opportun par rapport aux composants pré-analytiques et analytiques. Le laboratoire doit conserver une copie de tous les rapports ainsi que les feuilles d'accompagnement. Les rapports doivent être paraphés et datés par le technicien ou le pathologiste impliqué dans l'exécution ou l'interprétation de n'importe quel stade de la procédure.
- 3.4. **Remise des Rapports.** Les rapports devraient être remis au bon client, et d'une manière convenue par le client et le laboratoire.
- 3.5. **Entreposage des Échantillons** Les échantillons devraient être stockés dans des conditions appropriées pour une période de temps préétablie, déterminée par la stabilité des échantillons, la politique du laboratoire et/ou les exigences de certification/d'accréditation. Les lames de microscopes colorées peuvent être conservées indéfiniment, tandis que les échantillons tels que l'urine, le sang, ou fluides cavitaires ont une durée de conservation limitée. En général, les échantillons d'hématologie aviaire ne devraient pas être entreposés (y compris le transport) pour plus de douze heures, tandis que les échantillons provenant de reptiles peuvent être entreposés pour une période de 24 heures. Les échantillons sanguins peuvent être congelés à -29°C pour l'analyse d'ADN et -57°C pour l'analyse d'ARN. Les échantillons entreposés dans un congélateur à dégivrage automatique (auto-dégivrant) peuvent être dégradés par les cycles répétés de gel-dégel.
- 3.6. **Élimination des Échantillons.** Les laboratoires devraient éliminer les matières biologiques dangereuses et non dangereuses de manière appropriée et sécuritaire. Cela devrait inclure la vidange rapide de tous les conteneurs et poubelles.
- 3.7. **Sécurité du Personnel** – Se référer aux recommandations pré-analytiques

**3.8. Environnement de Laboratoire.** Au terme d'une procédure, l'espace du laboratoire devrait être nettoyé et organisé en prévision des procédures ultérieures. L'équipement devrait être entretenu de façon à ce qu'il soit prêt à tout moment. Se référer à la section pré-analytique pour des recommandations supplémentaires.

**3.9. Exigences concernant le personnel.** Se référer à la section Préanalytique.

**3.10. Divers.** Une fois les analyses de laboratoire terminées, l'inventaire des réactifs et des stocks d'approvisionnement devrait être évalué, et les articles épuisés doivent être commandés. Un système d'inventaire bien maintenu ainsi qu'une liste des fournisseurs agréés font en sorte que des matériaux de qualité sont disponibles en tout temps.

**Acknowledgement:**

ASVCP thanks Anne Geffré (Département des Sciences Cliniques, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France) and Eric Morissette (Abaxis, USA) for their translation.