

Université Pierre et Marie Curie
Paris VI

**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME UNIVERSITAIRE
ASSURANCE QUALITE ET GBEA**

**TRACABILITE ET CONTROLES DE QUALITE
DE L'IMMUNO-HISTOCHIMIE
EN ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES**

Maillard Sophie
2007-2008

Directeur du mémoire
Cadre supérieur
Llopis Elisabeth

Maillard Sophie

Technicienne de laboratoire

Service d'anatomie cytologie pathologiques Hôpital Européen Georges Pompidou

Directeur de mémoire

Llopis Elisabeth

Remerciements

Je remercie mes collègues techniciens, médecins et particulièrement le technicien référent en immunohistochimie Didier Verot, le docteur Tchao Méatchi ainsi que mon cadre Odile Chabert.

Je remercie également mon directeur de mémoire Madame Llopis pour sa disponibilité.

SOMMAIRE

	Page
Glossaire	6
Introduction	7
I. Le contexte	9
A. Le service d'Anatomie et Cytologie Pathologique de l'Hôpital Européen Georges Pompidou	
B. Le rôle de l'immuno-histochimie	10
C. Objectifs	10
II. Etat des lieux	11
A. Réglementation : Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques	11
1. L'immuno-histochimie et contrôles de qualité internes	11
2. Les anticorps et caractéristiques techniques	11
3. La gestion des anticorps et réactifs associés à l'immuno- histochimie	12
4. Evaluation des pratiques professionnelles	12
B. Existant	13
1. L'immuno-histochimie et contrôles de qualité internes	13
2. Les anticorps et caractéristiques techniques	14
3. La gestion des Ac et réactifs associés à l'immuno-histochimie	15
4. Evaluation des pratiques professionnelles	15
C. Dysfonctionnement	15
1. L'immuno-histochimie et contrôles de qualité internes	15
2. Les anticorps et caractéristiques techniques	16
3. La gestion des anticorps	16
4. Evaluation des pratiques professionnelles	16
III. Mise en place de la démarche	17
A. Groupe de travail	17
B. Planification des actions, calendrier	17
DU Assurance Qualité 2007-2008	4

C. Plan de communication, de formation	19
IV. Actions à mettre en place	19
A. Contrôles de qualité internes	19
1. Matériels	19
2. Fréquence des contrôles de qualité internes	20
3. Validation des contrôles de qualité internes	20
B. Les caractéristiques techniques des anticorps	21
C. Gestion et traçabilité des Ac	21
D. Evaluation des pratiques professionnelles	21
V. Evaluation et limites de l'étude	22
A. Contrôles de qualité internes	22
B. Les caractéristiques techniques des anticorps	23
C. Traçabilité des anticorps	23
D. Evaluation des pratiques professionnelles	23
Conclusion	24
Références bibliographiques	25
Annexes	26

GLOSSAIRE

AFAQAP : Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques

Ana-Path : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

Ag-Ac : Antigène-Anticorps

CQI : Contrôle de Qualité Interne

CQE : Contrôle de Qualité Externe

EPP : Evaluation des Pratiques Professionnelles

HEGP : Hôpital Européen Georges Pompidou

IHC : Immuno-histochimie

RAQ : Responsable en Assurance Qualité

RBPACP : Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques

Introduction

La phase analytique pour contribuer à une meilleure prise en charge du patient doit être évaluée, validée ; elle doit être en constante amélioration. C'est pourquoi les contrôles de qualité interne et externe en constituent les éléments clés.

En Anatomie et Cytologie Pathologiques, l'interprétation de l'immunohistochimie est qualitative : présence ou absence d'antigène ; sa valeur n'est pas chiffrée sinon en pourcentage (intensité de l'immunoréaction), comme dans d'autres spécialités biologiques telle la biochimie.

Toutefois l'interprétation des images est beaucoup plus délicate que l'interprétation quantitative. Dans le cadre de l'immunohistochimie, l'intérêt premier est d'avoir des techniques fiables, efficaces et reproductibles.

Pour atteindre cette fiabilité, il est indispensable de valider ces techniques par des contrôles de qualité interne, d'assurer une bonne traçabilité des réactifs et techniques qui leur sont associés.

Les anatomo-cytopathologistes se heurtent à l'absence de standard de référence et de contrôle de qualité interne disponible aisément. Reste à eux la constitution d'une banque de tissu servant de contrôle de qualité interne.

Le GBEA II stipule que :

Le contrôle de qualité interne est indispensable pour permettre de déceler les anomalies et les erreurs de mesures pour y remédier immédiatement. Les modes opératoires doivent préciser la fréquence de passage des échantillons de contrôle.

La période d'utilisation de chaque lot de réactif doit être consigné et de sorte qu'en cas de besoin on puisse rapprocher un résultat avec les réactifs ayant permis de les obtenir.

Il est recommandé que le laboratoire participe à des contrôles de qualité externe organisés par des groupements de biologistes ou tout autre organisme présentant les garanties nécessaires.

Quant à la Norme NF ISO 15189, elle nous dit que :

Les laboratoires y compris ceux d'Anatomie et Cytologie Pathologiques doivent concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est obtenue.

Le laboratoire doit avoir une politique définissant la durée de conservation des divers enregistrements comme : la documentation sur les lots.

Le laboratoire doit participer à des comparaisons inter laboratoires telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité.

Pour répondre à ces exigences, ce mémoire analysera l'existant et les dysfonctionnements au niveau de la phase analytique de l'immunohistochimie(IHC). Il aura pour premier objectif la mise en place de contrôles de qualité interne en IHC ; le second sera l'optimisation de la traçabilité des Ac et le troisième objectif la mise en place d'un contrôle de qualité externe ; il se basera plus particulièrement sur les attentes de notre référentiel, le RBPACP.

I. LE CONTEXTE

A. Le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (Ana-path) de l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP)

Le groupe HEGP - Broussais développe 3 axes essentiels d'activité portés par 4 pôles cliniques :

- Pôle urgences réseaux (urgences, réanimation médicale, immunologie clinique, médecine interne...)
- Pôle de cancérologie et spécialités médicales et chirurgicales (chirurgie gynécologique, thoracique, digestive, oncologie médicale ...)
- Pôle cardio-vasculaire (cardiologie, néphrologie, chirurgie cardio-vasculaire)
- Pôle prévention et réadaptation cardio-vasculaire

Et 2 pôles d'activités médico-techniques :

- Pôle d'imagerie et exploration fonctionnelles
- Pôle biologie et produits de santé dont le service d'Anatomie et Cytologie Pathologique fait partie.

Le département d'anesthésie et de réanimations chirurgicales ainsi que les blocs opératoires sont hors pôles.

L'activité est de 45000 séjours d'hospitalisation et 226500 consultations par an.

L'activité du service d'Ana-path est de 10 millions de PHN (équivalent B)

Le service d'Ana-path reçoit des prélèvements des services de chirurgie (cardio-vasculaire, gynécologie, ORL, thoracique, viscérale) et des services de médecine (néphrologie, immunologie, médecine interne), de réanimations...

Ces prélèvements sont tissulaires (histologiques : biopsies, pièces opératoires, prélèvements post-mortem), cytologiques directs (lavages, empreintes, frottis) et indirects (ponctions, sécrétions).

Compte tenu du recrutement du pôle de cancérologie, certains prélèvements nécessitent des techniques complémentaires comme l'IHC pour contribuer à l'établissement d'un diagnostic précis.

B. Le rôle de l'immuno-histochimie

Les techniques d'IHC permettent notamment de caractériser l'origine et la différenciation de populations cellulaires tumorales ou non, morphologiquement peu différenciées ou indifférenciées. Elles sont devenues un complément utile voire indispensable à la précision du diagnostic histopathologique et contribuent à l'établissement du pronostic ainsi qu'une aide au traitement.

Ces techniques ont pour but la mise en évidence d'un antigène sur coupes histologiques ou sur frottis cytologiques à l'aide d'une réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) et permettent de préciser la topographie de l'antigène : extracellulaire, nucléaire, membranaire, intra cytoplasmique.

Les Ag peuvent être détectés par des Ac spécifiques à condition d'être couplés à une enzyme, la peroxydase à l'origine d'une réaction colorée ou à une substance fluorescente, le fluorochrome.

L'Ag est défini comme toute substance (molécule ou cellule) susceptible d'induire une réponse immunitaire spécifique. Il est complémentaire du site Ac des immunoglobulines qui lui correspond ; il est dit immunogène s'il est capable d'induire la formation d'Ac.

Les Ac ou immunoglobulines se lient de façon spécifique à l'Ag qui a induit leur production.

La liaison Ag-Ac est réversible. Son intensité ou affinité est conditionnée par l'existence de groupements atomiques appropriés entre les molécules d'Ag et d'Ac et par leur complémentarité tridimensionnelle.

L'autre caractéristique fondamentale des réactions entre Ag et Ac est leur spécificité : les sites Ac dirigés contre les déterminants d'un Ag ne sont pas complémentaires de ceux portés par un autre Ag.

Les Ac utiles en IHC sont des Ac de forte avidité et de spécificité étroite.

(annexe I).

La validation technique de l'IHC repose sur le seul contrôle visuel des lames ; elle impose une traçabilité des Ac et des réactifs associés.

C. Objectifs

La phase analytique de l'IHC sur coupes histologiques nécessite des contrôles internes et externes.

Les objectifs de ce mémoire sont :

- la mise en place de contrôles de qualité interne
- la traçabilité des Ac
- la mise en place de contrôles de qualité externe.

II. ETAT DES LIEUX

A. Réglementation : RBPACP

Voici ce que nous dit notre référentiel

1• L'immuno-histochimie et contrôles de qualité internes

- *La réponse de l'IHC :*

Pour les protocoles particuliers (par exemple, l'IHC à visée pronostique et/ou thérapeutique), des détails seront donnés quant à l'intensité de l'immunoréaction, le pourcentage des cellules tumorales marquées, la positivité des contrôles internes et externes et ce, en application des recommandations spécifiques émises par les groupes d'assurance de qualité nationaux correspondants.

- *Témoins externes*

Pour chaque anticorps, il est recommandé de transcrire dans un cahier spécial (sous réserve alors de la mise à jour constante) les références du cas considéré comme témoin positif. De même, seront stockées à part, accessibles et référencées les lames blanches issues de ce cas et prêtes à l'emploi.

2• Les anticorps et caractéristiques techniques

- *Cahier des anticorps :*

Tous les anticorps primaires et secondaires, kits inclus, seront listés dans un cahier spécifique. Pour chaque anticorps, sera accessible la fiche technique éditée par le fournisseur ou le fabricant et seront précisés l'appellation commerciale, le nom de la firme distributrice ou du fabricant, la référence du produit, le numéro de lot, la nature

de l'anticorps (monoclonal ou polyclonal), le nom du clone pour les monoclonaux, l'animal d'origine (souris, rat, ...), le support concerné (paraffine, congélation ...), le (s) fixateur (s) adéquat (s), la présentation du produit (pré-dilué prêt à l'emploi, pur liquide, lyophilisat, anticorps reconstitué, anticorps dilué), la température du stockage (+ 4°, - 20 °, ...), la nécessité éventuelle et la description d'un système de démasquage des sites antigéniques, le kit de révélation, le substrat, les témoins internes attendus, les références d'un témoin externe si nécessaire.

•Cahier des mises au point :

Ce cahier collige les différentes manipulations entreprises pour les nouveaux lots d'anticorps, destinées à vérifier les conditions d'utilisation (dilutions de travail, systèmes de démasquage et de révélation).

•Cahier des techniques IHC :

Il est recommandé à chaque structure d'ACP pratiquant l'IHC de tenir à jour un cahier des différentes techniques utilisées. Pour chaque support et pour chaque protocole, seront précisées les différentes étapes de la manipulation : temps, pH, nature des produits utilisés (tampons, anticorps primaires et secondaires, systèmes de démasquage des sites antigéniques, système d'amplification et de révélation, kits, milieux de montage). Ce cahier concerne aussi bien les techniques manuelles que les techniques automatisées et doit refléter toutes les modifications apportées au fil du temps.

3. La gestion des Ac et réactifs associés à l'IHC

Stockage des anticorps :

Il est recommandé de stocker les anticorps de façon rationnelle et "lisible" (boîtes de rangement spéciales). Les dates d'achat et de péremption et le numéro du lot doivent être mentionnés pour chaque anticorps.

4. Evaluation des Pratiques Professionnelles (EPP)

Le contrôle est effectué par des pairs (anatomopathologistes diplômés).

Chaque fois que cela est possible, la pratique du contrôle interne par les pairs doit être encouragée. Un tel programme doit être défini en fonction des possibilités de la structure.

L'activité de contrôle par des pairs doit être enregistrée dans un document spécifique. Elle peut s'intégrer dans un programme de contrôle de qualité mis en place par l'hôpital ou par la profession

Ces programmes sont généralement rétrospectifs. Ils sont parfois prospectifs.

Un programme de contrôle par des pairs peut comprendre l'un des mécanismes suivants

- *séances de travail régulières où sont examinés tous les cas intéressants de la structure d'ACP.*
- *réseaux régionaux ou nationaux de pathologistes pour revoir les cas intéressants et les problèmes.*

B. Existant

Voici l'état des lieux au sein du laboratoire.

1. L'immuno-histochimie et contrôles de qualité internes

- La réponse de l'IHC

Les comptes rendus médicaux d'IHC répondent aux attentes du RBPACP.

- La technique d'IHC

Le poste d'IHC est occupé par 2 techniciens par roulement.

La technique d'IHC est réalisée sur coupes histologiques à l'aide d'un automate (annexe II, III)

Le principe de la technique d'IHC de l'automate est une technique dite indirecte.

Le kit de révélation détecte les Ac liés à un Ag dans les coupes histologiques.

L'Ac est localisé grâce à un Ac secondaire conjugué à la biotine. Cette étape est suivie par l'addition d'un conjugué enzyme-streptavidine qui se fixe sur la biotine présente sur l'Ac secondaire. Le complexe est alors visualisé à l'aide d'un produit de précipitation enzymatique de coloration brune (diaminobenzidine).

L'automate est dit « fermé » car il oblige à utiliser les réactifs du fabricant, ce qui implique un coût élevé.

Cet automate permet une traçabilité de ces réactifs et assure une bonne reproductibilité. Il a son propre logiciel, il n'est pas relié au système de gestion du laboratoire.

Le fabricant nous communique les exigences et recommandations en terme d'assurance qualité pour l'IHC (annexe IV).

- Les témoins

Certains Ag sont présents dans les tissus de façon normale (exemple : dans le sein normal, présence de progestérone) ce sont des témoins internes.

D'autres Ag ne sont présents que dans certaines pathologies. Ils nécessitent des contrôles de qualité positifs ou "lames témoins" (témoins externes) : il nous faut donc des coupes histologiques représentatives testées dans la même série.

Nous possédons des lames témoins pour certains Ac, mais aucun numéro de témoins n'est répertorié.

Ces contrôles positifs n'ont de valeur que s'ils sont effectués sur l'automate à chaque cycle ou avec chaque lame de patient.

2. Les anticorps et caractéristiques techniques

- Cahier des anticorps

Les fiches techniques des réactifs éditées par le fournisseur sont colligées par ordre alphabétique dans un classeur : classeur des Ac.

Les numéros de lots sont reportés sur ces fiches.

Chaque fiche est conservée pour une durée de 5 ans.

- Cahier des mises au point techniques

Une liste des Ac utilisés dans l'automate est établie, elle comporte les caractéristiques techniques : le pré-traitement éventuel, la dilution de l'Ac. Cette liste ne comporte pas les numéros des témoins associés à chaque Ac.

Lors de la demande de mise au point d'un nouvel Ac par un médecin, les détails des essais sont notés sur un cahier de transmission propre à l'IHC. La liste est mise à jour lorsque toutes les caractéristiques techniques sont au point.

3. La gestion des Ac et réactifs associés à l'IHC

Les Ac et réactifs associés à l'IHC font l'objet d'une gestion informatisée à l'aide du logiciel SAPA au sein du magasin biologique.

Les Ac sont ensuite aliquotés pour être congelés, leur gestion est alors réalisée à l'aide d'un tableau Excel.

Le technicien d'IHC réalise le déstockage des aliquots en cochant l'Ac utilisé dans le tableau Excel.

Les numéros de lots font l'objet d'un enregistrement dans le logiciel de l'automate lui-même :

- pour les kits de révélation et les "distributeurs remplissables" du fabricant (flacons contenant l'Ac); elle est obligatoire, automatique grâce à une lecture de puce (annexe V).

- pour les Ac ou les réactifs non commercialisés par le fabricant ; le technicien d'IHC rentre les données (numéro de lot, concentration) dans le logiciel de l'automate (annexe VI).

4. Evaluation des pratiques professionnelles

A ce jour, les anatomo-pathologistes se réunissent lors de séances de travail régulières où sont examinés tous les cas intéressants de la structure d'Ana-Path. Les EPP ne sont pas réalisées par des pairs.

C. Dysfonctionnements

Nous avons donc constaté les écarts suivants

1. L'immuno-histochimie et contrôles de qualité internes

Il n'existe pas de contrôles de qualité interne commercialisés, ils doivent être réalisés par nos soins. Ce sont les lames témoins.

Notre liste d'Ac ne comporte pas les numéros des témoins que nous possédons.

Seul l'Ac Cerb2 (oncogène, impliqué dans le cancer du sein) bénéficie de contrôle de qualité interne quotidien.

L'Ac Cerb2 doit être examiné en regard d'un témoin d'intensité +++ (échelle de + à +++). Selon l'intensité, la patiente bénéficiera ou non d'une chimiothérapie adjuvante.

L'absence de lames témoins pour l'ensemble des Ac implique l'absence des CQI pour ces Ac. Notre validation technique repose uniquement sur un contrôle visuel des lames techniquées.

La baisse d'intensité ou l'absence du signal nous oblige à réaliser de nouvelles techniques car la validation médicale n'est pas possible. Ce qui implique un délai allongé dans le rendu de diagnostic.

2. Les anticorps et les caractéristiques techniques

Certains techniciens ne mettent pas à jour la liste des Ac même s'ils ont réalisé et noté les détails de la mise au point d'un nouvel Ac dans le cahier d'IHC.

Les techniques sont alors parfois réalisées avec les mauvaises caractéristiques car elles sont basées sur la liste non tenue à jour. La recherche de ces données n'est pas effectuée dans le cahier, celle-ci étant peu aisée, ce qui implique également de réaliser de nouvelles techniques avec les caractéristiques exactes.

Là encore, le délai de rendu de diagnostic est allongé.

3. La gestion des Ac et réactifs associés à l'IHC

L'enregistrement dans le logiciel de l'automate des numéros de lots des nouveaux Ac n'est pas effectué de façon systématique par l'ensemble des techniciens.

La traçabilité n'est donc pas optimale.

4. Evaluation des Pratiques Professionnelles (EPP)

Le contrôle devant être effectué par des pairs (Anatomo-cytopathologistes diplômés) n'est pas instauré, car le personnel médical et paramédical du service n'est pas inscrit à l'AFAQAP pour réaliser ces EPP.

L'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Cytologie Pathologique (AFAQAP) a mis en place un système d'évaluation au test technique, dont des contrôles de qualité externes pour l'IHC.

Des tests sont proposés aux pathologistes en 2008. Ils entrent dans un des 11 programmes d'Evaluation des pratiques professionnelles (EPP) prévus sur 3 ans. Les tests d'assurance qualité sont ouverts aux seuls adhérents à l'AFAQAP. Ce sont des contrôles par des pairs (Anatomo-cytopathologistes diplômés) (annexe VII). Les contrôles de qualité externes ne sont pas réalisés.

III. Mise en place de la démarche

A. Groupe de travail

Un groupe de travail a été constitué. Il se compose du médecin Responsable Assurance Qualité (RAQ), du cadre du service, du technicien référent en IHC et de moi-même.

Le technicien référent en IHC est le formateur sur l'automate d'IHC.

Ensemble, nous avons réalisé les relevés d'informations auprès de l'ensemble des médecins, ainsi que les travaux de rédaction des documents de qualité concernant la phase analytique de l'IHC.

Le RAQ et le cadre sont les valideurs de ces documents.

B. Planification des actions, calendrier

Le groupe a établi une planification des réunions et des formations.

Une fiche de diffusion est affichée pour informer l'ensemble des techniciens des différents points abordés aux réunions (annexe VIII) ; elle comporte également l'émargement pour permettre une communication personnelle aux absents.

Réunion	Date	Objectifs	Travail fourni
Information	10 -01-2008	Présentation du sujet du mémoire Mise en place du Groupe de travail	Constitution du groupe
Travail	17-01-2008	Etats des lieux de la phase analytique de l'IHC	<ul style="list-style-type: none"> • Traçabilité insuffisante • CQI insuffisant • CQE inexistant
Travail	24-01-2008	Planification des réunions information / formation	<ul style="list-style-type: none"> • Calendrier : réunions tous les 15 jours • Fiche de diffusion/émargement
Travail	07-02-2008	CQI : Délai de 6 mois	Liste de témoins
Information	21-02-2008	CQI Délai de 6 mois	<ul style="list-style-type: none"> • Réalisation des lames • Procédure de gestion des CQI
Travail	06-03-2008	Liste des Ac, caractéristiques techniques	Fiche de mise au point d'un nouvel Ac
Information	20-03-2008	<ul style="list-style-type: none"> • Optimisation de la traçabilité des Ac et des caractéristiques techniques 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilisation à la traçabilité / exigences • dénombrement des techniciens nécessitant une formation sur automate • Fiche de mise au point
Travail	20-03-2008	Préparation à la formation des techniciens	Fiche d'enregistrement des numéros de lots
Formation	Individuelle	Traçabilité des Ac	Enregistrement des numéros de lots dans le logiciel de l'automate
Information	03-04-2008	CQE à mettre en place	<ul style="list-style-type: none"> • Inscription à l'AFAQAP • EPP de l'IHC

C. Plans de communication et de formation

1. Plan de communication

Destinataires	Techniciens Médecins	Techniciens	Techniciens	Techniciens Médecins
Date	10-01-2008	21-02-2008	20-03-2008	03-04-2008
Quels messages	Sujet de mémoire	Mise en place des CQI	Traçabilité des Ac	Réalisations des EPP
Quels supports	Diapositives	Oral : Site AFAQAP Internet	Oral : Site AFAQAP Internet	Orale / fiche d'inscription AFAQAP
Quelles modalités	Réunion	Réunion : Information	Réunion : Information	Réunion : Information
Qui prend en charge	Moi-même	Moi-même	Moi-même	RAQ, cadre

2. Plan de formation

Objectifs de changement	Compétences attendues	Thèmes de formation	Public concerné	Coût
Traçabilité de numéros de lots des Ac	Enregistrement dans le logiciel de l'automate	Utilisation du logiciel	Techniciens : 7/14	Temps

IV. Actions à mettre en place

Pour le suivi du travail, nous avons réalisé un plan d'action (annexe IX)

A. Contrôles de qualité internes

1. Matériels

Pour réaliser les CQI pour l'ensemble des Ac de la phase analytique de l'IHC, il nous faut ajouter à notre liste d'Ac les numéros des témoins pour chacun d'entre eux. Il nous faut également réaliser les coupes histologiques qui sont les lames témoins. Le technicien référent de l'IHC et moi-même avons recueilli auprès des médecins les numéros de cas intéressants pour compléter celle-ci (annexe X).

Elle sera complétée dans un délai de 6 mois.

Au fur et à mesure, l'ensemble des techniciens réalisera les lames dans ce même délai.

La mise à jour de la liste sera réalisée après l'ajout de nouveaux Ac mis au point ou lors d'un changement de numéro de témoin (après épuisement du bloc de paraffine).

2. Fréquence des CQI

Le groupe de travail a déterminé que la réalisation d'une procédure de gestion et de fréquence du mode de passage des CQI (annexe XI) était nécessaire.

Il a également déterminé la date de mise en application.

Les CQI se feront dans le même temps technique :

- à l'ouverture d'un nouvel Ac
- à l'ouverture d'un aliquot d'Ac

Ils seront effectifs à partir du 1^{er} septembre 2008.

J'ai donc réalisé et écrit cette procédure, le cadre l'a validée et le RAQ l'a approuvée.

3. Validation des CQI

Le technicien d'IHC à la paillasse regarde les lames témoins avec le RAQ ; ils valident ensemble les CQI.

Une discussion entre technicien et médecin permet un éventuel réajustement de la dilution de l'Ac si le CQI n'est pas validé. Si un réajustement est nécessaire, le technicien réalise un nouveau CQI avec la nouvelle dilution.

Les lames sont ensuite archivées pour la durée légale de 20 ans comme toutes les lames de patient.

Les CQI nous permettent de valider :

- la manipulation technique
- l'anticorps
- le kit de révélation

Ils permettent également de vérifier la reproductibilité :

- des réactifs utilisés
- du marquage avec un anticorps donné

Les CQI validés permettent la validation des techniques ultérieures pour la durée de vie de l'aliquot.

B. Caractéristiques techniques des Ac

Pour améliorer la recherche des caractéristiques techniques, j'ai réalisé une fiche de traçabilité lors de la mise au point d'un nouvel Ac.

Les différentes étapes techniques y sont spécifiées pour être ensuite approuvées par le médecin ayant effectué la demande de mise au point de la technique (annexe XII). Ces fiches sont ensuite archivées dans le classeur des fiches techniques des Ac et permettent de mettre à jour la liste des Ac utilisés dans l'automate.

C. Gestion et traçabilité des Ac

Les techniciens n'enregistrant pas les numéros de lots dans le logiciel de l'automate ont suivi une formation individuelle avec le technicien référent d'IHC. Cette formation d'environ 30 minutes s'est effectuée sur l'automate avec un support papier réalisé par moi-même, ainsi qu'une copie d'écran (annexe XIII).

Les fiches techniques des Ac éditées par le fournisseur sont stockées dans le classeur des Ac avant leur archivage par le technicien référent d'IHC.

Celui-ci vérifie mensuellement (3^{ème} semaine du mois) si l'enregistrement des numéros de lots a été effectué. Il archive ensuite ces fiches selon l'ordre alphabétique établi.

D. EPP

L'ensemble des techniciens et des médecins s'est inscrit à l'AFAQAP après une réunion d'information où ils ont été sensibilisés à la nécessité de réaliser des EPP qui équivalent à des Contrôles de Qualité Externes pour l'Ana-Path (Annexe XIV).

Deux médecins se sont inscrits pour la réalisation de tests techniques en IHC dédiés aux Ac :

- CD 117 du 15 septembre au 30 octobre 2008.

- récepteurs à l'œstrogène, à la progestérone et le Cerb2 (HER2) du 1^{er} octobre au 31 décembre 2008

Ces tests se déroulent en 2 phases :

L'une technique, consiste à la réalisation par nos soins des lames reçues avec les Ac demandés. Ces lames sont ensuite renvoyées dans les délais fixés par l'AFAQAP pour la seconde phase.

La seconde phase est l'évaluation proprement dite. Des anatomo-pathologistes confirmés de l'AFAQAP évaluent les lames anonymisées des différents laboratoires ayant participé aux tests.

Les résultats sont rendus sous forme d'une note sur 20.

V. Evaluation et limites de l'étude

A. Contrôles de qualité internes

L'ensemble des techniciens a pris part à la réalisation des lames témoins.

A ce jour, la liste des témoins n'est pas complète. Certains Ac n'étant pas réalisés régulièrement, nous n'avons pu obtenir de numéros pouvant servir de témoin.

Nous avons jugé qu'un délai supplémentaire de 6 mois était nécessaire. Lors de nos réunions techniques mensuelles, nous ferons un état des lieux de l'avancement des témoins des Ac peu usités.

Nous avons convenu de réaliser les CQI selon la procédure établie pour les Ac possédants des lames témoins au 1^{er} septembre comme prévu.

La mise en place des CQI permettra de déceler la détérioration des aliquots d'Ac congelés et donc l'éventuel réajustement de la dilution de ceux-ci ou leur changement.

La question du CQI négatif a été soulevée lors d'une réunion. Le CQI négatif consiste à omettre l'Ac et à appliquer l'ensemble des autres réactifs.

Ce type de CQI est indispensable, car il permet de visualiser le bruit de fond résiduel dû à un accrochage non spécifique des réactifs aux coupes histologiques.

Chaque CQI négatif sera donc réalisé en parallèle avec un CQI positif.

Les CQI positifs doivent être visualisés en regard des CQI négatifs, pour pouvoir être validés.

B. Caractéristiques techniques des Ac

La fiche de traçabilité des caractéristiques techniques a reçu un très bon accueil auprès des techniciens et des médecins. Elle répond aux attentes de l'ensemble de l'équipe.

Tous les techniciens ne sont pas passés à ce jour en IHC. Pour ceux qui y sont passés, la mise à jour de la liste des Ac est facilitée et a été réalisée.

C. Traçabilité des Ac

Le technicien référent d'IHC vérifie mensuellement l'enregistrement des numéros de lots des Ac dans le logiciel de l'automate, à l'aide des fiches techniques conservées par le technicien d'IHC dans une pochette identifiée du classeur des Ac ; elles seront ensuite archivées dans ce même classeur.

Le référent a constaté que malgré la formation dispensée sur l'enregistrement des numéros de lots, 3 des techniciens ne l'avaient pas réalisé.

Après discussion avec ces techniciens, l'une a demandé à être reformée, les 2 autres avaient omis d'enregistrer.

Une nouvelle formation leur a été dispensée et il leur a été demandé de venir trouver le référent pour une aide ponctuelle s'ils rencontraient des difficultés.

D. EPP

Courant mai l'ensemble des techniciens et médecins a reçu leur carte de membre de l'AFAQAP (annexe XV).

Les EPP n'ont lieu qu'à partir du mois d'octobre et le délai de rendu des résultats est d'environ 6 mois.

Nous attendons de recevoir les lames pour réaliser les EPP de l'IHC. Les lames seront réalisées par le technicien d'IHC à la paillasse dans le même temps technique que nos lames histologiques. Une fois techniquées, les lames seront ensuite renvoyées à l'AFAQAP.

Un délai de 6 mois après la clôture de renvoi des lames est à prévoir pour l'attente du retour de l'évaluation.

Conclusion

Pour répondre aux exigences des différents référentiels et pour assurer une amélioration constante de la phase analytique de l'IHC, l'instauration de contrôles de qualité ainsi que l'optimisation de la traçabilité ont été jugés essentielles.

Dans un premier temps en regard de notre référentiel, le RBPACP, l'état des lieux réalisé fait ressortir des dysfonctionnements.

Les différentes actions à mettre en place ont été planifiées.

Notre premier objectif étant la recherche de numéro de témoin pour compléter la liste de nos Ac ; ce qui nous a permis de réaliser les contrôles de qualité internes selon une procédure établie à partir du 1^{er} septembre.

Le second objectif a été l'optimisation de la traçabilité des réactifs associés à l'IHC, en formant le personnel à l'enregistrement des numéros de lots des Ac et en créant une fiche technique lors de la mise au point d'Ac.

Le dernier objectif a été la mise en place de contrôles de qualité externes par le biais de l'AFAQAP.

Ce travail a donc permis de constater que les contrôles de qualité internes et externes, peu connus en Anatomie et cytologie pathologiques étaient possible à instaurer.

L'ensemble de l'équipe a compris qu'ils étaient indispensables pour assurer la fiabilité des résultats analytiques et contrôler la traçabilité.

Enfin au-delà de ces contrôles, la mise en place d'un système de qualité est indispensable au niveau du choix des techniques, de la maintenance des automates, de la traçabilité, de la formation du personnel. Il implique également une collaboration importante au sein de l'équipe.

Références bibliographiques

- Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale II, arrêté du 26 novembre 1999 – JO du 11 Décembre 1999
- Norme NF EN ISO 15189, Octobre 2003
- Recommandations de Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques
Strasbourg: AFAQAP ; 1998. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques, Saint-André JP, Donzel J-P, Anger E, Chatelet F.
(Association Loi 1901 : n° d'ordre 90/2606 du 19 juillet 1990)
- Diagnostic Immunohistochemistry, 2nd Edition Churchill Livingstone 2006 828 pages
- Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Recommendations on quality control and quality assurance in anatomic pathology. Hum. Pathol. 1991; 22: 1099-1101.

Annexes

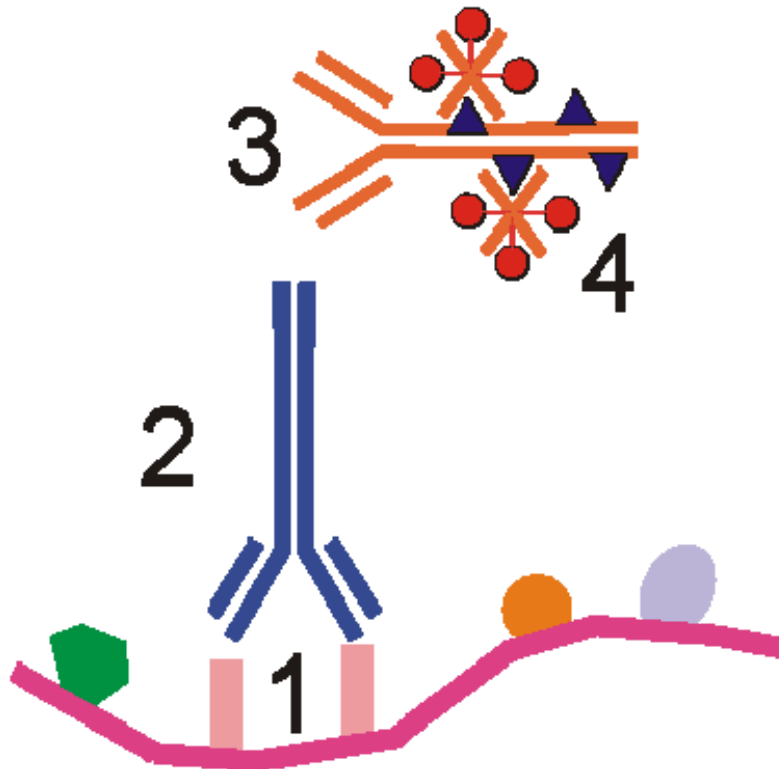
	Page
I . Schéma d'immuno-histochimie	27
II . Photo automate	28
III . Technique d'immuno-histochimie	29
IV . Recommandation Ventana pour les CQI	33
V . Fiche technique d'enregistrement des distributeurs	35
VI . Fiche technique d'enregistrement d'un nouvel Ac	36
VII . Programme d'inscription à l'AFAQAP	37
VIII . Fiche d'avis de réunion technique	39
IX . Plan d'action	40
X . Liste des Ac avec témoins	41
XI . Mode opératoire de gestion et de fréquence du mode de passage des CQI	42
XII . Fiche technique de mise au point d'un Ac	46
XIII . Fiche technique d'enregistrement d'un numéro de lot d'Ac	48
XIV . Inscription à l'AFAQAP	49
XV . Carte de membre de l'AFAQAP	53

ANNEXE I

Schéma d'immuno-histochimie

L'examen immuno-histochimique (IHC) consiste à révéler sur coupe histologique, par réaction antigène-anticorps, la présence de récepteurs antigéniques cellulaires intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques.

Le **schéma technique** est le suivant :



1 - Antigène

2 - Anticorps 1

3 - Anticorps 2

4 - Complexe avidine-biotine-péroxydase : en présence de diaminobenzidine (DAB) forme un complexe de coloration brune

ANNEXE II
Photo automate Nexes de Ventana

ANNEXE III
Technique d'immuno-histochimie par Ventana

ANNEXE IV
Recommandations

ANNEXE V

Fiche technique d'enregistrement des distributeurs

ANNEXE VI

Fiche technique d'enregistrement d'un nouvel Ac

ANNEXE VII
Programme d'inscription à l'AFAQAP

ANNEXE VIII
Avis de réunion

Objet :

Noms	Réunion du	Information personnalisée Reçue le
ALADEL Evelyne		
BOUILLAC Christelle		
GUERFI Houria		
LAURENCE Annick		
LEVIN Nathalie		
MAILLARD Sophie		
MOUSSY Dany		
PFISTER Nicole		
RICHET Sylvie		
ROZOY Angélica		
SALLAGOITY Anne-Marie		
SIMON Hélène		
THOMAS Béatrice		
VEROT Didier		
CHABERT Odile		

ANNEXE IX

Plan d'action

Exigences à atteindre	Types d'actions					Acteurs	Calendrier à respecter
	Organisation	Support	Etude	Formation Information	Procédures		
Traçabilité	Réunion Formation	Logiciel automate	Inventaire des produits	Formation individuelle	Fiche technique	Techniciens	30 min
CQI systématique	Réunion	Référentiel	Inventaire de la liste des Ac (témoins)	<ul style="list-style-type: none"> • Information • réalisation des témoins 	Procédure de gestion des CQI Liste des Ac	Techniciens Médecins	6 mois Application : 1 ^{er} sept. 2008
CQE	Réunion	AFAQAP		Site AFAQAP	Inscription AFAQAP	Techniciens Médecins	Dates précisées par l'AFAQAP

ANNEXE X
Liste des Ac

ANNEXE XI

Mode opératoire de gestion et de fréquence du mode de passage des CQI

I . Gestion des témoins

A . Acquisition de témoins connus

A la demande du technicien référent de l'IHC, les numéros des témoins sont donnés par les médecins dès la macroscopie ou après lecture.

Les numéros de témoins sont notés sur la liste des Ac de l'automate.

B . Réalisations des témoins

Ils sont réalisés par l'ensemble des techniciens sur des lames Super Frost+.

Noter sur la lame :

- le numéro de bloc et le nom du témoin.
- la date de coupe.

Couper les blocs avant épuisement du stock des lames témoins.

Lorsqu'un bloc est épuisé, prendre le bloc témoin suivant ou demander un nouveau numéro de témoin aux médecins.

Le témoin de l'Ac Cerb2 est à couper la veille de la technique (pas de stock possible) compte tenu de la fragilité de l'Ag tissulaire.

C . Conservation et stockage des lames blanches témoins

Toutes les lames témoins sont conservées dans le réfrigérateur à + 4° C de l'IHC (frigo n°2) dans des boîtes hermétiques, à l'abri de la lumière, pendant au maximum six mois.

Ne jamais stocker de lames blanches à l'étuve.

D. Conservation des blocs témoins

Les blocs sont conservés en IHC dans une boîte dite de « blocs témoins » dans le tiroir sous la pailleasse du bain marie.

II . Mode de passage de CQI et fréquence

Les CQI sont réalisés dans le même temps technique, dans les conditions habituelles à l'aide d'une lame témoin.

Les CQI sont à effectuer à l'ouverture d'un nouveau flacon d'anticorps et à l'ouverture d'un aliquot.

L'anticorps Cerb2 bénéficie d'un CQI systématique quotidien.

III . Validation

Les lames témoins sont données avec les cas demandés pour être validées. Si le marquage est satisfaisant, le médecin note OK sur la lame et celle-ci est ensuite archivée.

Si le marquage est insuffisant, le médecin se concerta avec le technicien d'IHC pour :

- réaliser un nouveau contrôle
- pour réaliser un contrôle après ajustement de la dilution de l'Ac.

IV . Archivage des CQI

Les lames sont rangées en IHC par le technicien d'IHC dans une boîte dite « CQI » dans le tiroir sous la paillasse du bain marie.

V. Intérêt des témoins

Il s'agit de tissus normaux ou pathologiques (tumoraux ou non).

Ce sont des témoins positifs connus, contenant de façon certaine l'antigène à révéler exprimé de façon franche et constante.

Les lames témoins permettent de réaliser les CQI.

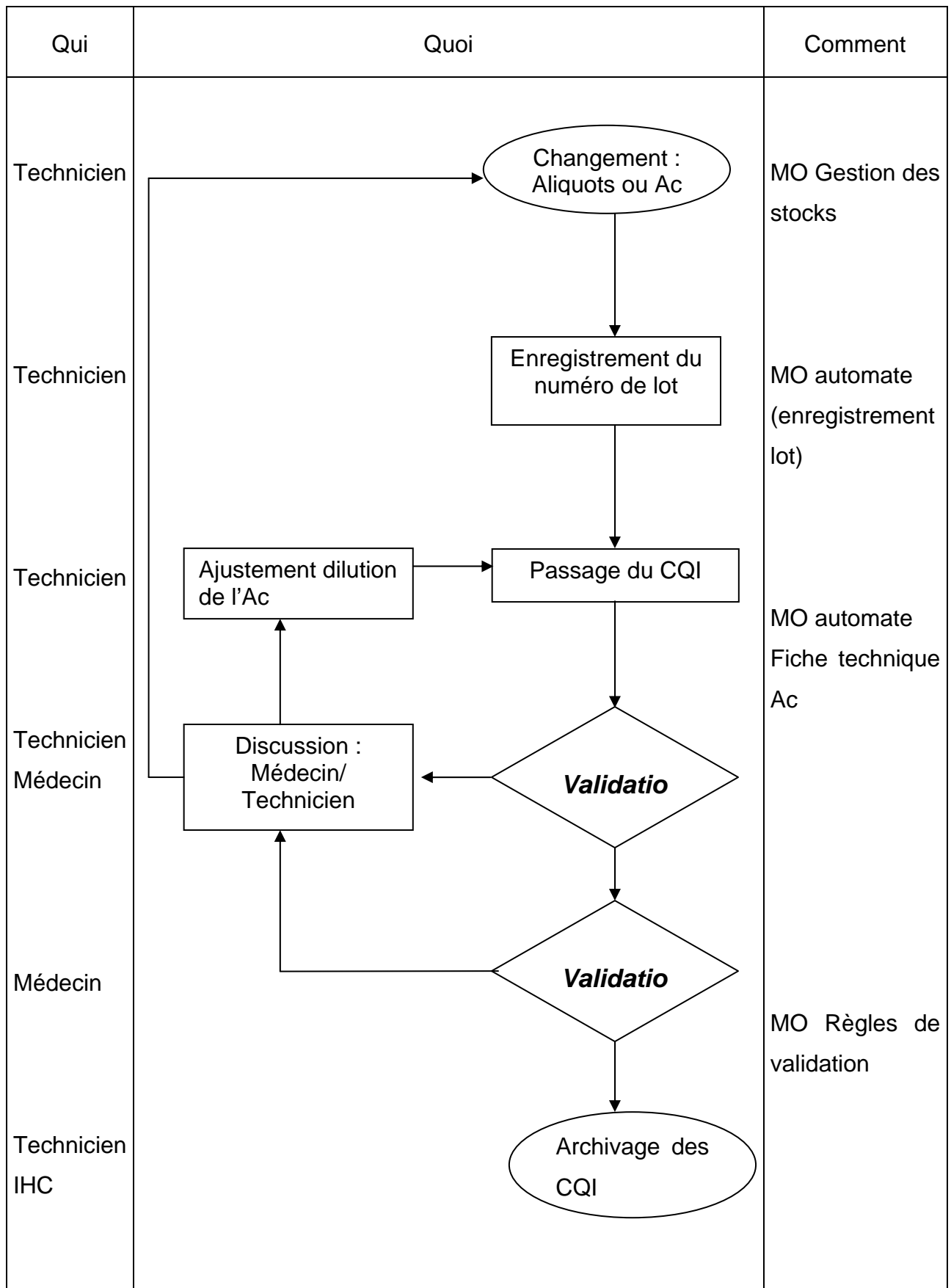
Les CQI permettent la validation des techniques ultérieures pour la durée de vie de l'Ac (et de l'aliquot).

Ils valident :

- La manipulation technique
- L'anticorps
- Le kit

Et vérifient la reproductibilité :

- Des réactifs utilisés
- Du marquage avec un anticorps donné.



ANNEXE XII

Fiche technique de mise au point d'un Ac

I . Mise au point d'un Ac

A . Lecture de la fiche fournisseur

Elle permet de :

- Vérifier le numéro de lot.
- S'informer sur les conditions de prétraitement (démasquage...).
- Connaître la dilution préconisée.

Archiver la fiche du fournisseur dans le classeur des Ac en ayant pris soin d'y noter le numéro de lot.

B . Témoins

Réaliser des témoins (lames blanches) après avoir demandé un numéro de cas intéressant au médecin ayant demandé la mise au point de l'Ac.

C . Enregistrement de l'Ac

Enregistrer l'Ac et son numéro de lot dans l'automate (cf : fiches techniques d'enregistrement d'un Ac et d'un numéro de lot)

II . Technique (Vérification sensibilité/spécificité)

Tester l'Ac en faisant une gamme de dilution par rapport à celle préconisée par le fournisseur selon la technique classique de l'automate.

En parallèle réaliser sur une lame témoin un contrôle négatif en omettant l'Ac.

Noter sur la fiche de mise au point les différentes dilutions et caractéristiques techniques.

III . Validation

Lecture commune au microscope multi têtes du technicien et du médecin ; pour validation de la technique et choix de la dilution.

Si pas de validation, effectuer d'autres tests en faisant varier :

- la dilution
- le prétraitement

Quand la technique est validée, remplir le récapitulatif de la fiche anticorps et l'archivée avec la fiche du fournisseur dans le classeur des Ac.

Nom de l'anticorps :
Numéro d'attribution dans Nexes :

Référence, fournisseur :
Clone :

Dilution	Traitement	Technique	Nom médecin Date et résultats

Récapitulatifs

Prétraitement:

Bain marie, tampon, temps puissance :

Micro-ondes, tampon, temps et puissance :

Dilution :

Caractéristique technique :

Amplification :

Fixative :

ANNEXE XIII

Fiche technique d'enregistrement des numéros de lot d'un Ac

Pour enregistrer un nouveau numéro de lot d'Ac

- Cliquer sur **Enregistrer**, puis **Enregistrer les Anticorps** (autres que Ventana)

- Onglet : Enregistrer un nouveau N° lot d'Anticorps

Chercher l'Ac dans la liste : il doit apparaître en **bleu foncé**

- Taper le nouveau numéro de lot

- Mettre la concentration ou cocher concentration inconnue

- Taper la date d'expiration, puis les unités

- Cliquer sur **Enregistrer**

ANNEXE XIV
Bulletin d'inscription pour les tests (CQE)

ANNEXE XV
Carte de membre de l'AFAQAP