

Université Pierre et Marie Curie

Sorbonne Universités

MÉMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE »

VALIDATION DE METHODE

QUALITATIVE DE PORTEE B :

HLA B27 PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Ghacham Sybille

2014/2015

NOTE AU LECTEUR

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire » « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.»

Auteur :

Ghacham Sybille
Technicienne de laboratoire

Lieu d'exercice :

Novembre 2014-mai 2015 : laboratoire de Physico-Chimie
BIOMNIS 78, avenue de Verdun 94200 Ivry/Seine

Juin 2015-octobre 2015 : laboratoire d'Hématologie
BIOMNIS 78, avenue de Verdun 94200 Ivry/Seine

- .

REMERCIEMENTS

Aux responsables du D.U « assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » pour m'avoir accueillie au sein de cette promotion 2014/2015, ainsi qu'à l'ensemble des intervenants pour la qualité de leurs enseignements dispensés au cours de cette année.

A Mesdames Isabelle Petit et Cécile Moussa respectivement biologiste et manager du département de Physico-Chimie pour m'avoir permis de m'absenter de leur service afin de suivre l'ensemble des enseignements de ce DU.

A mes collègues, qui m'ont permise de dégager du « temps qualité » pendant ce semestre.

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidée à la réalisation de mon sujet de mémoire et plus particulièrement : A Catherine Coignard biologiste responsable de la validation des HLA B27 pour la confiance qu'elle m'a accordée et à Johanna Fidon, technicienne qualité méthode pour son aide à la finalisation du dossier de validation.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'Hématologie pour m'avoir accompagnée techniquement.

A la direction du laboratoire pour m'avoir permis de participer à ce D.U.

Sommaire

Glossaire	1
1. Introduction	2
1.1 Le laboratoire Biomnis.....	2
1.2 La réforme de la biologie médicale.....	2
1.3 Intérêt et objectifs du mémoire.....	3
1.3.1 Exigences normatives.....	3
1.3.2 Application au service hématologie.....	3
1.3.3 Intérêt de la méthode.....	4
1.3.4 Mise en place de l'étude.....	4
1.3.5 Limites de l'étude	5
2. Objet de l'analyse	5
3. Principe	5
4. Description du processus	7
5. Description de la méthode	8
6. Maitrise des risques	10
7. Evaluation des performances de la méthode	12
7.1 Répétabilité.....	12
7.2 Fidélité intermédiaire.....	14
7.3 Justesse.....	15
7.4 Exactitude.....	16
7.5 Sensibilité et spécificité	18
7.6 Incertitude de mesure.....	19
7.7 Comparaison de méthodes.....	22
7.8 Comparaison d'automate en miroir.....	23
7.9 Intervalle de référence/ Valeurs seuils.....	24
7.10 Interférences.....	25
7.11 Contamination.....	25
7.12 Robustesse.....	26
7.13 Stabilité des réactifs.....	26
7.14 Stabilité du prélèvement.....	27
7.15 Stabilité de la préparation.....	27
7.16 Vérifications des connexions informatiques.....	28

8. Déclaration d'aptitude	29
9. Conclusion	29
10. Bibliographie	30
11. Annexes	
▪ Annexe 1 : Fiche de validation Navios n°05470	31
▪ Annexe 2 : Fiche de validation Navios n°05473	32
▪ Annexe 3 : Fiche de comparaison de 2 méthodes différentes.....	33
▪ Annexe 4 : Fiche de corrélation de 2 automates identiques	40
▪ Annexe 5 : Fiche d'évaluation de la contamination inter-échantillons.....	42
▪ Annexe 6 : Fiche de comparaison de méthodes.....	43
▪ Annexe 7 : Evaluation de la durée de stabilité des échantillons positifs.....	45
▪ Annexe 8 : Evaluation de la durée de stabilité des échantillons ininterprétables.....	46
▪ Annexe 9 : Evaluation de la durée de stabilité des échantillons lysée	47
▪ Annexe 10 : Vérification des connexions informatiques.....	48

GLOSSAIRE

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité

CE : Conforme aux Exigences

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CMF : Cytomètre de Flux.

CIQ: Contrôle Interne de la Qualité

CV : Coefficient de variation

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

FITC: Isothiocyanate de Fluorescéine

FS: Forward Scatter

HLA: Human Leukocyte Antigen

IVD: In Vitro Diagnostic Medical Devices

LBM: Laboratoire de Biologie Médicale

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase

Screening : Détection

SS : Side Scatter

PE : Phycoérythrine

PMT : Photomultiplicateurs

PGP (LPM): Lab Production Manager

1. INTRODUCTION

1.1 Le laboratoire Biomnis

Le laboratoire Biomnis est parmi les leaders français de la biologie médicale spécialisée. Toute l'activité du groupe est tournée vers l'excellence, l'innovation et l'investissement technologique. Les laboratoires du groupe, qui réalisent un panel très large d'examens de biologie médicale, ont fondé leur réputation sur le développement continu de nouveaux tests et la réalisation d'examens à forte valeur ajoutée médicale.

- CA 2013 : 180 M€ en biologie spécialisée.
- 735 collaborateurs dont une cinquantaine de biologistes.
- Plus de 20 000 dossiers patients enregistrés quotidiennement.
- 40 000 analyses par jour.
- Plus de 2 500 examens disponibles.
- 90 % des résultats disponibles dès le lendemain de la transmission des échantillons, hors contrôles, week-ends et jours fériés.
- Plus de 5 000 correspondants de proximité, laboratoires d'analyses médicales privés. ou centres hospitaliers.
- Deux plateformes multidisciplinaires spécialisées : Lyon (Gerland) et Paris (Ivry-sur-Seine)
- Une accréditation Cofrac des deux sites selon les exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025 depuis 2000 puis NF EN ISO 15189 depuis 2010 (En 2015 52% des examens sont accrédités)

1.2 La réforme de la biologie médicale

La réforme de la biologie médicale a pour objectif de permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à son juste prix dans un cadre européen.

L'ordonnance relative à la biologie médicale du 13 janvier 2010 comprend deux mesures phares :

La médicalisation : il s'agit de réaffirmer le rôle du biologiste médical au sein du parcours de soins. Cette reconnaissance se traduit par la création d'une responsabilité pour le biologiste médical qui interprète à présent systématiquement l'ensemble des résultats des examens qu'il réalise.

L'accréditation : La procédure d'accréditation obligatoire garantit une qualité tracée et prouvée des examens de biologie médicale par une vérification de la compétence d'un laboratoire de biologie médicale (LBM) par les pairs que sont les autres biologistes médicaux .L'accréditation est délivrée par un organisme national d'accréditation sur demande du laboratoire de biologie médicale. En France, cet organisme est le Comité français d'accréditation (Cofrac). Cette accréditation est réalisée suivant la norme **NF EN ISO 15189** qui définit les exigences générales concernant la qualité et la compétence

des laboratoires de biologie médicale. La mise en place de ces dispositions est un processus long et exigeant qui doit être réalisé suivant un calendrier bien défini :

-Dépôt des dossiers au Cofrac au plus tard le 30 avril 2015 pour obtenir l'accréditation à 50% en volume avec au moins un examen accrédité par famille au 31 octobre 2016.

-Dépôt des dossiers au Cofrac au plus tard le 30 avril 2017 pour atteindre 70% d'accréditation en volume avec au moins un examen accrédité par famille au 31 octobre 2018.

-Dépôt des dossiers au Cofrac au plus tard le 30 avril 2019 pour être accrédité à 100% au 31 octobre 2020.

1.3 Intérêt et objectifs du mémoire

1.3.1 Exigences normatives

Dans la norme ISO 15189 v. 2012 (5), la vérification et la validation des procédures analytiques sont abordées dans les paragraphes 5.5.1.1, 5.5.1.2 et 5.5.1.3 :

- § 5.5.1.1 : « Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue »

- § 5.5.1.2 : Vérification des procédures analytiques : « Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement »

- § 5.5.1.3 : Validation des procédures analytiques : « le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes : méthodes non normalisées, méthodes conçues ou développées par le laboratoire, méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application prévu, les méthodes validées puis modifiées ».

- Note § 5.5.1.3 : « les caractéristiques de performance tiennent compte : de la justesse de mesure, de l'exactitude de mesure, de la fidélité de mesure, de l'incertitude de mesure, de la spécificité analytique, de la sensibilité analytique, de la limite de détection et de la limite de quantification, de l'intervalle de mesure, de la spécificité et de la sensibilité de diagnostic ».

Le guide SH-GTA-04 (8) du Cofrac explicite les exigences de la norme dans le cadre d'une vérification et d'une validation de méthode. Il propose différents moyens de répondre aux critères de validation : répétabilité, reproductibilité, linéarité, contamination.

1.3.2 Application au service Hématologie

Le service d'hématologie participe activement à la démarche d'accréditation et souhaite l'accréditation de la famille **Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité** (groupage HLA ; ICELHSTOBM), sous domaine Immunologie avec l'examen HLA-B27 par cytométrie en flux (10).

La méthode utilisée par le laboratoire s'inscrit dans une portée B de type qualitatif. Il s'agit d'une méthode mise en place par Beckman Coulter marquée CE IVD pour laquelle nous avons effectué une validation par comparaison à la technique de référence de biologie moléculaire. Le sujet du mémoire est donc consacré à la validation de la méthode HLA B27 par cytométrie en flux selon les recommandations du SH FORM 43 (4), dans le but de satisfaire aux exigences de la norme ISO 15189 version 2012 (5).

1.3.3 Intérêt de la méthode

Aujourd'hui la méthode utilisée au laboratoire Biomnis Lyon pour le typage HLA B27 est une technique de biologie moléculaire (PCR en temps réel).

Le typage HLA-B27 par biologie moléculaire, technique de référence, présente de nombreux avantages par rapport à la technique alternative de cytométrie en flux.

➤ Au niveau pré-analytique :

-la conservation des échantillons sanguins ne pose aucun problème alors que celle-ci est limitée à 72 heures pour la cytométrie.

- Le patient peut être prélevé par son laboratoire quels que soient l'heure ou le jour de la semaine (y compris les samedis et les veilles de jours fériés).

➤ Au niveau analytique

- La technique de biologie moléculaire est spécifique. Il n'existe pas de résultats difficilement interprétables. Ainsi, le patient n'est pas contraint d'effectuer un prélèvement de contrôle.

Néanmoins, devant les difficultés rencontrées pour obtenir les attestations de consultation nécessaires dans le cadre des examens de génétique moléculaire, le coût et le temps de l'analyse, la cytométrie en flux offre une alternative à cette technique.

Du fait de sa rapidité, la technique de phénotypage HLA B27 par cytométrie en flux peut être utilisée comme technique de screening, plus adaptée au fonctionnement d'un laboratoire d'immunologie de routine que la technique de référence.

1.3.4 Mise en place de l'étude

La procédure s'est organisée de la façon suivante :

➤ Une étude préliminaire réalisée par le laboratoire Biomnis Ivry qui a fourni une caractérisation initiale de la méthode en termes de critères classiques de validation (répétabilité, fidélité intermédiaire, ...)

➤ Une étude inter-laboratoire (Biomnis Lyon) qui a permis d'estimer divers critères pour les méthodes qualitatives.

- Une interprétation finale des résultats.

1.3.5 Limites de l'étude

Les difficultés majeures rencontrées ont été :

- La conservation des échantillons
- La mise en place de contrôles de qualités internes
- Le contenu du dossier de validation, intermédiaire entre méthode quantitative et qualitative

2. OBJET DE L'ANALYSE

L'une des plus fortes associations connues entre un phénotype HLA (Human Leukocyte Antigen) et une pathologie est celle de l'antigène HLA B27 avec la spondylarthrite ankylosante.

La fréquence de l'antigène HLA B27 chez les patients atteints de spondylarthrite ankylosante est de l'ordre de 90% tandis qu'elle est inférieure à 10% dans l'ensemble de la population caucasienne (1). Ainsi la recherche de l'antigène HLA B27 fait partie d'un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques utiles au diagnostic de spondylarthrite ankylosante.

3. PRINCIPE

Le test repose sur la capacité d'anticorps monoclonaux spécifiques à se fixer sur des cellules leucocytaires par les déterminants antigéniques qu'elles expriment sur leur surface.

Un double marquage des lymphocytes est réalisé à l'aide d'un anticorps anti HLA B27 et d'un anticorps anti HLA B7 (principale antigène responsable de réaction croisée). Les érythrocytes sont ensuite éliminés par lyse et les leucocytes, non affectés par cette étape sont analysés par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux (CMF) permet d'évaluer individuellement et simultanément plusieurs paramètres sur chaque élément présent dans une suspension, préalablement marqué par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes.

La CMF fait appel à différentes technologies : fluïdique, optique et électronique (cf. Figure 1).

Une suspension cellulaire est introduite par une pompe au centre d'une gaine pressurisée. Les cellules sont hémodynamiquement contraintes par un flux liquidien de s'aligner et de défiler une à une dans la zone d'analyse, devant une ou plusieurs sources d'excitation lumineuse (laser). Des informations morphologiques sont apportées par deux paramètres indépendants de la fluorescence :

- la taille est donnée par la mesure de la lumière diffractée à 180 degrés (Forward Scatter, FS)
- la granularité est indiquée par la mesure de la lumière émise à 90 degrés (Side Scatter, SS).

Les fluorochromes sont capables d'absorber l'énergie lumineuse provenant du laser à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption, puis de la libérer par émission de photons de longueur d'onde supérieure.

Les fluorochromes les plus utilisés sont l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la phycoérythrine (PE).

Les photons émis sont focalisés puis séparés par une alternance de miroirs dichroïques, qui transmettent les longueurs d'onde non réfléchies, et de filtres, qui ont une bande passante sélective. Les signaux optiques détectés sont transformés en signaux électroniques proportionnels par des photomultiplicateurs (PMT) et digitalisés pour être représentés informatiquement sous forme d'histogrammes.

Sur chaque population sélectionnée on peut alors obtenir des informations statistiques quantitatives et qualitatives : nombre de cellules, intensité de fluorescence, etc.

Figure 1 : schéma d'un cytomètre

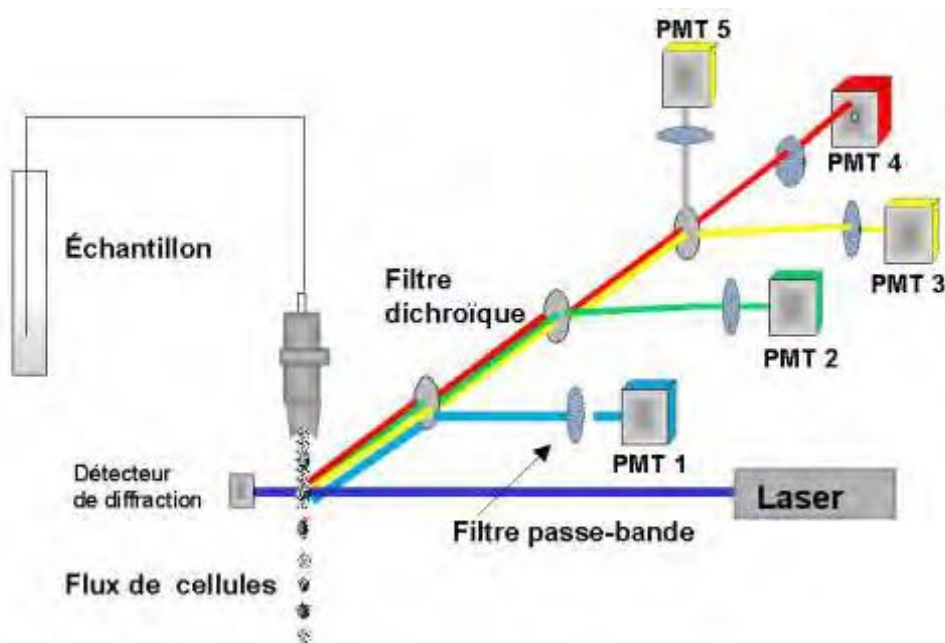




Figure 2 : CYTOMETRE EN FLUX NAVIOS

4. DESCRIPTION DU PROCESSUS

La cytométrie en flux utilisée pour la détection de l'antigène HLA B27 est une méthode qualitative validée par Beckman Coulter mais modifiée pour l'ajuster au besoin du laboratoire. Il s'agit donc d'une portée B entrant dans un processus simple.

Les critères de performances à évaluer cités dans le SH FORM 43 (4) sont au minimum les items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13.

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE	
Identification du paramètre : Détection de l'antigène HLA B27	
<input checked="" type="checkbox"/> Processus simple	<input type="checkbox"/> Processus complexe nombre de sous-processus : ...

DESCRIPTION DU PROCESSUS	
Détection de l'antigène HLA B27	Modalités de vérification/validation <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateur <input checked="" type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthode/automates <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence <input checked="" type="checkbox"/> 14. Vérification des connexions informatiques

La variabilité inter opérateur constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisée, dans notre cas cette maîtrise ne sera pas vérifiée.

L'étendue de mesure n'a pas d'intérêt puisqu'un test de linéarité de marquage n'a pas de signification biologique car chez un individu soit 100% des cellules sont HLA-B27+ soit 100% sont HLA-B27- .

Une étude de stabilité du prélèvement et une étude de stabilité de la préparation ont été effectuées afin de déroger aux recommandations fournisseur qui préconisent une analyse de l'échantillon dans les 24h qui suivent le prélèvement et une fixation de la préparation. Au laboratoire les échantillons sont acceptés jusqu'à 72h après le prélèvement et la procédure opératoire de préparation se termine à la lyse des globules rouges (Annexe 5).

5. DESCRIPTION DE LA METHODE :

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre : Détection de l'antigène HLA B27

SOUS-PROCESSUS 1 : Détection de l'antigène HLA B27	
<input type="checkbox"/> Portée A	<input checked="" type="checkbox"/> Portée B
Famille : Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité (groupage HLA ; ICELHISTOBM) Sous domaine : Immunologie	

DESCRIPTION DE LA METHODE
Analyte / Mesurande : Intensité de fluorescence correspondant à la présence de l'antigène HLA B27
Principe de la méthode (selon SH INF 50) : Double marquage des lymphocytes par des anticorps dirigés contre les antigènes de surface directement conjugués par des fluorochromes puis lyse des globules rouges et quantification des lymphocytes en cytométrie de flux (NAVIOS).
Type d'échantillon primaire : Sang total
Type de récipient, additifs : Tube anticoagulant de type EDTA
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, acidification ...) : Le laboratoire envoie le tube échantillon primaire identifié. Les échantillons sont préparés ainsi :

10 µL d'anticorps monoclonaux marqués sont mélangés à 50 µL de sang total échantillon. Après incubation et lyse, l'échantillon est analysé sur le cytomètre de flux.

Unités :

Sans unité, selon la moyenne l'intensité de fluorescence obtenue le résultat est rendu négatif, indéterminé ou positif.

Critères d'interprétation (Intervalles de référence) :

Intensité de fluorescence <3 → Résultat rendu négatif.

3 ≤ Intensité de fluorescence ≤ 6 → Résultat rendu indéterminé.

Intensité de fluorescence > 6 → Résultat rendu positif.

Marquages CE Oui Non

Codages C.N.Q (s'il existe) :...

Non codé par l'ANSM

Equipement :

Automates	N° de série	N° interne
NAVIOS	AU 14110	05470
NAVIOS	AU 15111	05473

Référence du Mode Opérateur Automate : B-HEM-MOA-004 (Automate NAVIOS)

Référence fournisseur du réactif :

Réactifs	Référence	Fournisseur
IOTest HLA B27-FITC/HLA-B7-PE	A07739	Beckman Coulter
Lysing Solution IOTest 3	A07799	Beckman Coulter
IMMUNO-TROL Low Cells	6607098	Beckman Coulter
CRISP HLA-B27	CRHL-100	Enzo Life Sciences

Version de la notice technique : 2012-06-15-FR

Matériau d'étalonnage (références) :

Réactifs	Référence	Fournisseur
Quik Comp	177017	Beckman Coulter
Flow-Check Pro	A63493	Beckman Coulter
Flow Set Pro	A63492	Beckman Coulter

Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :

Contrôle quotidien :

Des billes de calibration sont passées afin de vérifier la conformité optique et fluide (Flow-Check) ainsi que la sensibilité du cytomètre (Flow-Set).

Contrôle hebdomadaire :

La calibration est effectuée une fois par semaine, elle permet le réglage des voltages et gains des photomultiplicateurs grâce au Flow-Set et le réglage des compensations par l'utilisation d'anticorps monoclonaux CD45-FITC et CD45-PE (Quick Comp).

Contrôle qualité :

Un contrôle négatif et un contrôle positif sont passés quotidiennement en début et fin de série.

6. MAITRISE DES RISQUES : ANALYSE DES 5M

L'analyse de risque selon la méthode des 5M ou méthode d'Ishikawa permet d'établir les éléments de variabilité des processus pré-analytique, analytique et post-analytique.

Kaoru Ishikawa classe les différentes causes d'un problème en 5 grandes familles : les **5M**

- **Matière** : les différents consommables utilisés, matières premières...
- **Milieu** : le lieu de travail, son aspect, son organisation physique...
- **Méthodes** : les procédures, le flux d'information...
- **Matériel** : les équipements, machines, outillages, pièces de rechange...
- **Main d'œuvre** : les ressources humaines, les qualifications du personnel

Cette analyse est réalisée en :

- Identifiant et en listant l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer le résultat de l'analyse,
- Justifiant de l'influence jugée non significative de certains facteurs pris en compte,
- Démontrant la façon dont sont maîtrisés les facteurs dont l'influence est significative de manière à minimiser les risques et les erreurs,

La criticité de chaque facteur d'influence identifié est évaluée sur une échelle de 1 à 5 (1 non critique-5 très critique).

MAITRISE DES RISQUES : ANALYSE 5M

5M	Points critiques	Echelle de criticité	Éléments à maîtriser / Moyens de maîtrises (vérification, référence procédure, référence instruction...)
Matière (échantillon)	<u>Délai et température avant traitement analytique</u> : Transmission de l'échantillon dans les 24 heures suivant le prélèvement à température ambiante	2	- <i>MU-REC-PRO-001</i> Collecte Réception et Enregistrement des échantillons - <i>B-REC-INT-010</i> Déballage
	<u>Identité pré analytique et analytique</u>	5	- <i>REC-PG-026</i> Identitovigilance - <i>B-REC-ENR-007</i> Suivi de formation agent de saisie - <i>B-REC-PRO-002</i> Saisie administrative d'un dossier et identification des prélèvements
	<u>Nature et volume de l'échantillon</u> : 5ml sang total EDTA	2	- <i>Référentiel des analyses</i> - <i>B-REC-INT-025</i> Gestion des non conformités
Milieu	<u>Conditions de conservation des échantillons</u>	2	- <i>B-HEM-MOT-015</i> HLA par cytométrie en flux
	<u>Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs</u> -Respect du mode opératoire technique -Suivi des enceintes thermostatées	2	- <i>B-SMQ-PRO-004</i> Procédure générale Métrologie
	<u>Exigences environnementales pour le matériel et l'opérateur</u>	2	- <i>Manuel d'utilisation</i> du NAVIOS Beckman Coulter
Matériel (équipements)	<u>Qualité et sécurité d'utilisation des automates</u>	2	<i>B-SMQ-PRO-011</i> Réactovigilance Matérovigilance
	<u>Dérive des automates</u> -Calibration journalière et hebdomadaire - Suivi CQI - Maintenances	2	<i>B-HEM-MOA-004</i> Automates NAVIOS <i>B-HEM-MOT-015</i> HLA par cytométrie de flux <i>B-HEM-PRO-001</i> Gestion des CQI en Hématologie <i>B-INF-INT-001</i> Utilisation du logiciel PGP V5 pour les contrôles qualité internes Guide de maintenance GALLIOS-NAVIOS Version 7 juin 2012 Beckman Coulter
	<u>Diluteur/pipettes</u> -Maintenances préventives métrologiques	2	<i>B-HEM-MOA-005</i> Utilisation du TQ Prep/PrepPlus2 <i>B-SMQ-PRO-004</i> Procédure générale Métrologie
	<u>Informatique embarqué</u> Version logiciel, paramétrage, tests, archivage des données	4	<i>MU-INF-INT-016</i> Validation des connexions automates <i>B-HEM-MOA-004</i> Automates NAVIOS

Matériel (réactif)	<u>Qualité et sécurité d'utilisation des réactifs</u>	2	<i>B-SMQ-PRO-011</i> Réactovigilance Matérovigilance <i>B-SMQ-PRO-012</i> Gestion et consultation des fiches de données de sécurité
	<u>Reconstitution des réactifs</u> -Respect du mode opératoire technique -Métrologie des pipettes	4	<i>B-HEM-MOT-015</i> HLA par cytométrie de flux <i>B-SMQ-PRO-004</i> Procédure générale Métrologie
	<u>Gestion des stocks</u> -N° de lot et date de péremption -Version notice	3	<i>B-APP-PRO-001</i> Approvisionnements
Méthode	<u>Risque d'erreur d'identification du tube secondaire</u> -Vérification visuelle	5	<i>-B-HEM-ENR-028</i> Formation interne NAVIOS
	<u>Risque d'erreur dans l'utilisation de la méthode</u> -Respect du mode opératoire	3	<i>-B-HEM-MOT-015</i> HLA par cytométrie de flux
	<u>Validation technique du résultat</u> -respect des règles de validation des CQI -lecture visuelle cytogramme	5	<i>-B-INF-INT-001</i> Utilisation du logiciel PGP V5 pour les contrôles qualité internes <i>-B-HEM-ENR-028</i> Formation interne NAVIOS
Main d'œuvre (personnel)	<u>Formation et évaluation des compétences du personnel</u>	3	<i>B-DRH-PRO-001</i> Règles de recrutement, d'intégration, de formation, d'évaluation à l'embauche d'un salarié <i>B-DRH-PRO-003</i> Organisation de la formation des nouveaux arrivants <i>B-HEM-ENR-028</i> Formation interne NAVIOS <i>B-HEM-ENR-030</i> Formation interne – TQ PREP / PREP PLUS
	<u>Plan de formation</u>	1	<i>B-DRH-PRO-002</i> Gestion de la formation
	<u>Maintien des compétences</u>	3	<i>B-HEM-PRO-003</i> Organisation du service d'hématologie

7. EVALUATIONS DES PERFORMANCES DE LA METHODE

7.1 Répétabilité

Définition

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon pendant une courte période de temps dans des conditions standardisées : même procédure de mesure, même opérateur, même système de mesure, même conditions de fonctionnement et même milieu.

Cette évaluation a pour but de vérifier le bon fonctionnement du système analytique dans des conditions réelles d'utilisation.

Il est recommandé d'utiliser au minimum 2 niveaux de concentrations (9), choisis en fonction des valeurs physiopathologiques. L'effectif idéal est de 30 pour une interprétation statistique optimale.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart type(s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs obtenues de chaque série.

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

Le biologiste vérifie la cohérence des résultats par rapport aux critères d'acceptabilités initialement établit (Fournisseurs, tables savantes...).

Résultats

La répétabilité de la méthode à été évaluée sur les 2 NAVIOS à partir de pool d'échantillons négatifs et positifs.

NAVIOS N°05470 (cf. annexe 1)

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Echantillon niveau 1	30	0,30	0,02	7,48	NC	NA	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
Echantillon niveau 2	30	8,53	0,50	5,87	2,2	10	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme

NAVIOS N°05473 (cf. annexe 2)

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Echantillon niveau 1	29	0,28	0,02	8,68	NC	NA	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
Echantillon niveau 2	29	6,74	0,405	6,00	2,2	10	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme

Conclusions

L'échantillon niveau 1 correspond à un échantillon négatif, le résultat attendu doit être négatif : le CV n'est pas suivi.

Le CQI ayant été utilisé depuis peu, le CV maximum acceptable n'a pas été fixé par l'état de l'art mais en se référant à la validation de méthode d'un paramètre réalisé à l'aide de la même technologie de cytométrie de flux avec utilisation d'anticorps marqués pour la détection d'antigène (dossier HEM DV CD3-4-8, v-1).

Sur chaque automate, pour l'échantillon niveau 2, le coefficient de variation (CV) obtenu est dans les limites d'acceptabilité préalablement fixées et conformes aux exigences du laboratoire. Les CV obtenus pour l'échantillon niveau 2 sont supérieurs au CV admissible du fournisseur mais l'étude menée par celui-ci est différente (12 déterminations et moyenne de l'intensité de fluorescence autour de 30).

7.2 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

📌 Définition

L'essai de reproductibilité consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes. L'opérateur, les lots de réactifs, les calibrateurs et courbes de calibration peuvent être des données variables correspondant à une activité normale et quotidienne du laboratoire. Cette évaluation permet de connaître la variabilité analytique d'une méthode. Ces données sont exploitées pour le calcul de l'incertitude de mesure utile à l'interprétation des résultats de patients.

La fidélité est établie sur au moins 2 niveaux pendant 15 jours avec 30 déterminations minimum.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart type(s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs obtenues de chaque série.

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

Le biologiste vérifie la cohérence des résultats par rapport aux critères d'acceptabilités initialement établis (Fournisseurs, tables savantes...).

📌 Résultats

La reproductibilité de la méthode a été évaluée sur les 2 NAVIOS, les résultats obtenus sont issus des contrôles internes de la qualité (CIQ).

Le niveau 1 correspond à :

-IMMUNO-TROLTM LOW CELLS Réf. 6607098 BECKMAN COULTER

Le niveau 2 correspond à :

NAVIOS N°05470 (cf. annexe 1)

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Echantillon niveau 1	30	1,17	0,10	8,68	NC	15	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
Echantillon niveau 2	30	29,09	2,83	9,73	NC	15	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme

NAVIOS N°05473 (cf. annexe 2)

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Echantillon niveau 1	30	0,69	0,06	8,70	NC	15	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
Echantillon niveau 2	30	27,09	3,18	11,76	NC	15	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme

Conclusion

Les coefficients de variations (CV) de fidélité intermédiaire ne sont pas communiqués par le fournisseur car celui-ci ne commercialise pas de CIQ associé à ce réactif.

Sur chaque automate, pour les deux niveaux de contrôles, les CV obtenus sont dans les limites d'acceptabilité préalablement fixées à 15 %.

7.3 Justesse

Définition

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

Cette évaluation permet de mettre en évidence le biais d'une méthode et fournit une indication sur les erreurs systématiques.

L'estimation du biais de justesse peut éventuellement être établie par l'externalisation des CIQ. Une étude de justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible. L'écart observé correspond au biais. L'externalisation des CIQ permet une estimation pertinente du biais de justesse. La justesse est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire), établie sur des échantillons de CIQ, à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur "vraie" (v) de l'échantillon

testé. Cette valeur est fournie par l'organisateur de CIQ externalisé. La justesse est exprimée par le biais en valeur absolue ou en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

m : valeur moyenne trouvée sur des échantillons de CIQ

v : valeur cible

Dans le cas d'une méthode qualitative l'évaluation de la justesse par le calcul du biais est non applicable puisque les contrôles internes de la qualité sont rendus sous forme qualitatives. La justesse sera évaluée avec la comparaison de méthode.

7.4 Exactitude

Définition

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'un essai et la valeur de référence acceptée ou conventionnellement vraie. L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, c'est-à-dire l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent l'exactitude résulte des erreurs de justesse et de fidélité.

Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle (v). L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude). L'inexactitude est exprimée en valeur absolue ou en pourcentage de la valeur cible à partir des résultats des évaluations externes de la qualité (EEQ) ponctuels, selon le calcul suivant :

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

x : valeur trouvée pour un échantillon d'EEQ

v : valeur cible

Le biologiste vérifie la cohérence des résultats par rapport aux critères d'acceptabilités initialement établis (Fournisseurs, tables savantes...).

Résultats

SH REF 02 ; § 5.6 (11) : Si le LBM dispose de plusieurs systèmes analytiques pour un même examen, il participe aux EEQ pour chacun d'entre eux.

Evaluation Externe de la Qualité :

Organisme : UKNEQAS

Programme : HLA-B27

Nombre d'échantillons par enquête : 2

Fréquence : 4 passages de 2 échantillons /an

NAVIOS 05470

Echantillon	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Inexactitude (%) groupe de paires	Inexactitude (%) toutes techniques	Inexactitude (%) Limite	Conclusion
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			
1B01/2015	Négatif	N/A	Négatif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
1B02/2015	Négatif	N/A	Négatif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
1B03/2015	Négatif	N/A	Négatif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
1B04/2015	Positif	N/A	Positif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme

NAVIOS 05473

Echantillon	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Inexactitude (%) groupe de paires	Inexactitude (%) toutes techniques	Inexactitude (%) Limite	Conclusion
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			
1B01/2015	Négatif	N/A	Négatif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
1B02/2015	Négatif	N/A	Négatif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
1B03/2015	Négatif	N/A	Négatif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme
1B04/2015	Positif	N/A	Positif	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> conforme <input type="checkbox"/> non conforme

Conclusion

Les résultats d'EEQ sont conformes aux résultats attendus.

Ils sont rendus sous forme qualitative, le calcul de l'inexactitude comme décrit ci-dessus n'est donc pas applicable. Une détermination de l'exactitude relative peut s'obtenir par l'utilisation d'une

seconde méthode validée, si possible une méthode de référence. L'exactitude relative exprime le degré de concordance des résultats obtenus à l'aide de la méthode à valider et de la méthode de référence. Pour des méthodes qualitatives, l'exactitude relative en % est calculée par $[(a+d)/n] \times 100$ (figure 3) et donne la probabilité que les deux méthodes de comparaison donnent les mêmes résultats.

Avec les résultats obtenus lors de la comparaison de méthode (figure 4), on évalue l'exactitude à **99.5%** et on conclut que la méthode de cytométrie en flux est exacte.

7.5 Sensibilité et spécificité

Définition

La spécificité est le nombre d'individu diagnostiqués négatifs sur le nombre d'individu réellement négatifs. Cette spécificité désigne la même faculté d'une méthode à valider, en comparaison avec la méthode de référence, de donner un résultat négatif lorsque celui-ci est négatif par la méthode de référence (spécificité relative).

La sensibilité est le nombre d'individu diagnostiqués positifs sur le nombre d'individu réellement positifs. Cette sensibilité désigne la même faculté d'une méthode à valider, en comparaison avec la méthode de référence, de donner un résultat positif lorsque celui-ci est positif par la méthode de référence (sensibilité relative).

Les résultats sont regroupés comme suit :

Méthode à valider		+	-	Total
Méthode de référence	+	(a) VP	(b) FN	a + b
	-	(c) FP	(d) VN	c + d
	Total	a + c	b + d	n = a + b + c + d

(Figure 3)

+ : détection ou jugement positif

- : détection ou jugement négatif

a : nombre de résultats positifs pour les deux méthodes

b : nombre de résultats faux-négatifs par rapport à la méthode de référence

c : nombre de résultats faux-positifs par rapport à la méthode de référence

d : nombre de résultats négatifs pour les deux méthodes

n : nombre total de résultats d'analyse lors de la validation de méthodes

$$\text{Sensibilité \%} = \frac{a}{(a+b)} \times 100$$

$$\text{Spécificité \%} = \frac{d}{(c+d)} \times 100$$

Résultats

(cf. annexe 3)

L'étude a été réalisée sur 194 patients dont 8 ininterprétables exclus des calculs.

Deux méthodes de typage HLA ont été utilisées : la cytométrie en flux et la méthode de référence de biologie moléculaire (PCR temps réel).

Cytométrie en flux		+	-	Total
Biologie moléculaire	+	19	1	20
	-	0	166	166
	Total	19	167	186

(Figure 4)

$$\text{Sensibilité} = (19/20) \times 100 = \mathbf{95\%}$$

$$\text{Spécificité} = (166/166) \times 100 = \mathbf{100\%}$$

Conclusion

La technique de cytométrie en flux présente une spécificité de 100% et une sensibilité de 95%. Les 194 patients testés semblent représentatifs de la population générale puisque nous obtenons environ 10.3 % de prélèvements HLA B27 positifs pour une moyenne de 8 à 10% décrite au sein de la population caucasienne (1).

7.6 Incertitude de mesure

Définition

Le résultat d'une analyse ne peut pas être parfait. Ainsi le résultat rendu ne correspond pas à la « valeur vraie ». A chaque étape du processus analyse, des écarts par rapport à la « valeur vraie » apparaissent.

Le terme incertitude de mesure exprime cet écart à la perfection. Il est nécessaire de la quantifier pour une bonne interprétation d'un résultat notamment lors de la prise de décisions par rapport à des seuils limites.

Résultats

Le concept de l'incertitude de mesure ne peut pas être appliqué directement aux résultats de méthodes qualitatives. Il est possible d'analyser le processus de réalisation de l'analyse afin d'identifier les points critiques et de proposer des actions correctives. Les taux de faux positifs et faux négatifs procurent des indications importantes (1 échantillon faussement négatif identifié mais défaillance contrôlée).

Cette analyse se fait par le processus AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité). L'AMDEC est une méthode d'analyse prévisionnelle des risques qui repose sur l'identification, l'analyse et l'évaluation des défaillances potentielles du système étudié. La cotation de la criticité se fait en combinant les scores attribués à 3 critères :

G : gravité (score de 1 à 5 : impact faible à critique)

F : fréquence (score de 1 à 5 : occurrence faible à récurrente)

D : détection (score de 1 à 5 : détection automatique à non détectable)

C : criticité (G x F x D)

Etapes du processus	Mode de Défaillance	Effets	Causes	G	F	D	C	Moyens de Préventions
Réalisation de l'analyse	Erreur d'identification du tube secondaire	Résultat erroné	Erreur humaine	5	2	4	40	Vérifier la concordance entre le tube primaire et secondaire
	Déréglage du cytomètre	Résultat erroné	Défaillance du cytomètre	5	2	1	10	Test quotidien et hebdomadaire
	Absence d'anticorps	Résultat erroné	Erreur humaine Défaillance matériel de pipetage	5	3	2	30	Vérifier visuellement le dépôt de l'anticorps au fond de chaque tube avant l'ajout du sang total
	Erreur d'anticorps	Résultat erroné	Erreur Humaine	5	2	1	10	Formation du technicien à la lecture des cytogrammes. Validation des CQI
	Absence de sang	Résultat erroné	Défaillance matériel de pipetage	5	1	2	10	Vérifier visuellement le dépôt de sang au fond de chaque tube
	Volumes d'échantillon et/ou d'anticorps et/ou de lyse incorrects	Peu d'impact sur le résultat Dosage semi quantitatif	Défaillance matériel de pipetage	2	2	4	16	Maintenance préventives métrologiques
	Temps d'incubation non respecté	Résultat erroné	Erreur humaine ou défaillance du matériel métrologique	4	2	3	24	Habilitation du technicien Maintenance préventives métrologiques
	Lecture du cytogramme	Résultat erroné	Erreur humaine ou défaillance du cytomètre	5	2	4	40	Habilitation du technicien. Vérification par les biologistes lors de la validation.
	Echantillon hors stabilité	Résultat erroné	Défaillance du processus analytique	5	4	1	20	Alerte PGP : Flag avertissant le technicien que le prélèvement est hors stabilité.

Conclusion

Les deux étapes du processus présentant un risque majeur sont:

- L'identification du tube secondaire

- Validation d'un résultat dont le cytogramme présente une anomalie

Les moyens de prévention mis en place actuellement reposent exclusivement sur la formation/habilitation du technicien. Il est impératif que le technicien vérifie la concordance entre les tubes primaires et secondaires et qu'il soit aguerri à la lecture des cytogrammes.

7.7 Comparaison de méthodes

✚ Définition

La comparaison consiste à évaluer les résultats obtenus avec une méthode par rapport à ceux d'une autre méthode. Si cette dernière est une méthode de référence, des conclusions sur la justesse et la fidélité de la méthode testée peuvent être formulées.

Sinon elle peut permettre de mettre en évidence des différences qui peuvent nuire à l'interprétation des résultats.

Pour la comparaison de méthodes qualitatives on détermine l'indice de concordance kappa. L'indice de concordance kappa est une mesure de la concordance de deux méthodes pour une caractéristique analytique et se calcule de la manière suivante (Figure 1) :

$$\text{Kappa} = \frac{2(ad-bc)}{[(a+c)(c+d)+(a+b)(b+d)]}$$

La concordance est évaluée suivant la valeur kappa d'après le tableau suivant :

Kappa	Concordance
< 0.10	Aucune
0.10 – 0.40	Faible
0.40 – 0.60	Nette
0.60 – 0.80	Forte
0.81 – 1.00	Presque complète

✚ Résultats

(cf. annexe 1)

Il s'agit de comparer les résultats obtenus avec la méthode de cytométrie en flux avec la méthode de référence de biologie moléculaire (PCR temps réel) par une étude des discordances.

L'étude à portée sur 194 échantillons :

- 20 échantillons positifs

-166 échantillons négatifs

-8 échantillons indéterminés

En utilisant les données de la figure 2, on calcule l'index de concordance Kappa :

$$\text{Kappa} = \frac{2[(19 \times 166) - (1 \times 0)]}{[(19 \times 166) + (20 \times 167)]}$$

Kappa = 0.97

On peut également évaluer la justesse et la fidélité :

$$\text{Justesse \%} = \frac{(VP+VN)}{(VP+VN+FP+FN)} \times 100$$

$$\text{Soit } (19+166) / (19+166+0+1) \times 100 = \underline{\underline{99,5\%}}$$

$$\text{Fidélité \%} = \frac{VP}{(VP+FP)} \times 100$$

$$\text{Soit } (19 / 19) \times 100 = \underline{\underline{100\%}}$$

Conclusion

La concordance des 2 méthodes est presque complète (kappa=0.97). Seul un échantillon présente une discordance d'interprétation entre cytométrie et biologie moléculaire. Pour ce patient, la moyenne de fluorescence indique un résultat négatif tandis que la technique de biologie moléculaire donne un résultat positif. La cause de cette discordance peut être due à la date de prélèvement qui est supérieure à 72h. Il est possible qu'il s'agisse également d'une conséquence de la variation de l'expression des antigènes HLA, diminuée dans certaines circonstances, comme par exemple lors d'infections virales ou bactériennes.

Il faut cependant noter que cet échantillon aurait été rendu ininterprétable pour date de prélèvement supérieur à 72h.

Avec des pourcentages égaux à 99.5% et 100%, nous pouvons conclure que la méthode de cytométrie en flux est juste et fidèle par rapport à la méthode de référence.

7.8 Comparaison d'automate en miroir

(cf. annexe 4)

Automate en miroir : dose simultanément le même paramètre pour accroître le débit analytique.

L'étude de comparaison est menée sur au moins 30 échantillons à différentes valeurs.

Les valeurs obtenues par les deux automates de dosage sont exploitées sous forme d'un diagramme des différences $x_i - y_i$ et d'une régression linéaire.

Noms et numéros internes des automates comparés	Automates 1 Nom : NAVIOS Fournisseur : BECKMAN N° interne : 05470	Automates 2 Nom : NAVIOS Fournisseur : BECKMAN N° interne : 05473
Utilisation	<input checked="" type="checkbox"/> Miroir - Fréquence de comparaison : trimestre <input type="checkbox"/> Back-up <input type="checkbox"/> Migration/déplacement automate	
Nombre de mesures	30	
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire	X MEAN*DE 0,20 à 14,9	
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire : Equation de la droite de régression : $Y = 0,90 + 0,10 X$ $R^2 = 0.996$	
Conclusion	Absence de discordance significative : la droite de régression obtenue montre une pente proche de 1 et une ordonnée à l'origine proche de 0. Les 2 Navios peuvent être utilisés en miroir.	

*X MEAN : moyenne de l'intensité de fluorescence

7.9 Intervalle de référence / Valeurs seuils

(cf. annexe 3)

Une étude consistant à confirmer les seuils définis par Beckman Coulter sur les 2 anciens cytomètres FC500 a été menée (2).

185 patients dont le phénotypage B27 était connu par détermination en biologie moléculaire (PCR temps réel) ont été analysés en cytométrie en flux : 166 échantillons négatifs et 19 échantillons positifs.

Le seuil de positivité est égal à la plus faible valeur des moyennes de fluorescence des échantillons positifs connus, le seuil de négativité est égal à la plus haute valeur des échantillons connus négatifs, entre ces deux valeurs est définie une zone grise ne permettant pas de définir le statut B27.

Les moyennes de fluorescence et valeurs extrêmes mesurées sont les suivantes (les échantillons ininterprétables n'ont pas été pris en compte) :

Population négative :

Moyenne de fluorescence ± 2 écart type : $0 < 0,6 < 1,6$

Valeurs extrêmes : 0,15 ; 3,04

Population positive :

Moyenne de fluorescence ± 2 écart type $6,04 < 7,18 < 8,32$

Valeurs extrêmes : 6,10 ; 8,11

Les seuils d'interprétation ont donc ainsi été définis : un échantillon dont la moyenne de fluorescence est inférieur à 3,04 est considéré comme HLA-B27 négatif, un échantillon dont la moyenne de fluorescence est supérieur à 6,10 est considéré comme HLA-B27 positif, un échantillon dont la moyenne de fluorescence est comprise entre 3,04 et 6,10 est considéré comme douteux et nécessite une détermination en biologie moléculaire (PCR).

Les résultats obtenus sont concordants avec ceux déterminés par Beckman Coulter c'est-à-dire la vérification en biologie moléculaire de tous les échantillons dont la moyenne de fluorescence se situe entre 3 et 6.

Arbre décisionnel :

Intensité de fluorescence < 3 = Résultat négatif

$3 \leq$ Intensité de fluorescence ≤ 6 = Résultat indéterminé

Intensité de fluorescence > 6 = Résultat positif

7.10 Interférences

D'après la notice technique fournisseur (12) :

L'anticorps monoclonal HLA-ABC-m3 qui reconnaît l'antigène HLA-B27 croise avec l'antigène HLA-B7 et de manière moins affine avec les antigènes du CREG HLA-B7.

En revanche l'anticorps monoclonal BB7-1 qui reconnaît l'antigène HLA-B7 croise avec l'antigène HLA-B42.

La mise en évidence d'une double positivité apparente HLA-B27+ et HLA-B7+ peut être le résultat de différentes expressions :

- l'expression hétérozygote du génotype HLA-B27/HLA-B7
- l'expression hétérozygote du génotype HLA-B7/HLA-B7
- l'expression homozygote du génotype HLA-B7/HLA-B7

Un test de confirmation par biologie moléculaire (PCR) doit être pratiqué.

7.11 Contamination

Définition

C'est un phénomène qui résulte du transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre tel qu'il produit une modification dont l'effet peut être évalué et quantifié.

Le protocole expérimental consiste à analyser un échantillon positif 3 fois de suite (H1, H2, H3 de moyenne H) suivi d'un échantillon négatif également dosé 3 fois (B1, B2, B3). On détermine ensuite le pourcentage de contamination qui doit être proche de zéro.

$$\text{Contamination\%} = \frac{(B1m - B3m)}{(Hm - B3m)} \times 100$$

B1m = moyenne des B1

B3m = moyenne des B3

Hm = moyenne des H

Résultats / conclusion

(cf. annexe 5)

Inter-échantillons	Vérification en alternant des échantillons positifs et négatifs. Pas de contamination détectée (0,245%)
Inter-réactifs	Une contamination se traduirait par une discordance des résultats avec la méthode de référence, or 99,5% des résultats sont concordants. Absence de contamination inter-réactif.

7.12 **Robustesse**

Définition

La robustesse est la capacité de la technique à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode, et qui fournit une indication sur sa fiabilité dans les conditions normales d'utilisation. Pour mesurer la robustesse, seul l'effet du pipetage sur le test a été étudié, celui-ci pouvant être réalisé avec des pipettes manuelles ou automatisées.

Résultats

(cf. annexe 6)

La méthode utilisée pour l'exploitation des résultats est la droite de régression linéaire.

$$Y = 0,9618 - 0,0536 \quad R^2 = 0,995$$

Conclusion

La droite de régression obtenue montre une pente proche de 1 et une ordonnée à l'origine proche de 0. Les deux méthodes sont donc équivalentes. Il n'y a pas d'influence du mode de pipetage.

7.13 **Stabilité des réactifs**

Définition

La stabilité d'un produit est caractérisée par le maintien des mêmes propriétés dans le temps pour des conditions strictement définies.

Conclusion

Les fiches techniques des réactifs indiquent les conditions de conservation (durée et température). Les réactifs sont utilisés selon les recommandations des fournisseurs. Ces paramètres ne sont donc pas vérifiés sur site.

7.14 Stabilité du prélèvement

Selon la notice fournisseur, les échantillons doivent être analysés dans les 24 h après le prélèvement.

Compte tenu de la particularité de notre structure comme laboratoire de seconde intention, nous avons réévalué la stabilité des prélèvements positifs et ininterprétables de J+1 à J+5.

Le protocole expérimental fut de moyenner les intensités de fluorescence d'échantillons positifs ou ininterprétables obtenues sur une période de 5 jours consécutifs et de calculer les pourcentages d'écart comme suit :

$$\text{Ecart} = \left[\frac{\text{conc. théorique} - \text{conc. mesurée}}{\text{conc. théorique}} \right] \times 100$$

Résultats

(cf. annexe 7 et 8)

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
Ecart : Echantillons positifs	0%	1.21%	2.84%	10.80%	18.66%
Ecart : Echantillons ininterprétables	0%	5.26%	3.44%	13.74%	31.95%

Conclusion

En utilisant les résultats de réproductibilité, on fixe la limite de stabilité théorique à 15%.

Les résultats obtenus montrent que les échantillons positifs ou ininterprétables sont stables pendant 3 jours après le prélèvement.

7.15 Stabilité de la préparation

Selon le protocole fourni par Beckman-Coulter (2), adaptation de la notice fournisseur, l'analyse des échantillons marqués se fait dans les 30 minutes qui suivent.

Nous avons testé la stabilité des préparations :

- A T0 : correspondant à 30 minutes après le marquage (recommandation fournisseur)
- A T30 : soit à 1h après le marquage

- A T60 : soit 1h30 après le marquage
- A T120 : soit 2h30 après le marquage

Nous avons ensuite calculé les pourcentages d'écart comme suit :

$$\text{Ecart} = \left[\frac{\text{conc. théorique} - \text{conc. mesurée}}{\text{conc. théorique}} \right] \times 100$$

Résultats

(cf. annexe 9)

	T0	T30	T60	T120
Ecart : Echantillons lysés	0%	13.59%	18,52%	22.06%

Conclusion

Si on fixe la limite de stabilité à 15%, les résultats obtenus permettent d'établir que les échantillons doivent être analysés dans un délai de 1h, compatible avec les contraintes techniques du cytomètre.

7.16 Vérification des connections informatiques

(cf. annexe 10)

La qualification de la chaîne informatique est effectuée pour chaque logiciel interfacé entre l'appareil et le système central du laboratoire.

A réception du prélèvement, le processus est décrit comme suit :

- Création d'un dossier OpenLab (page 48 annexe 10)
- Edition d'une étiquette code barre collée sur le prélèvement
- Transfert de la demande sur PGP (page 49 annexe 10)
- Transfert de la demande sur la liste de travail du Navios (page 49 annexe 10)
- Navios lit l'étiquette et réalise l'analyse (page 50 annexe 10)
- Le résultat est associé à ce numéro dans la liste des résultats
- Le résultat est validé techniquement sur le Navios et transfert à PGP (page 51 annexe 10)
- Après validation technique sur PGP, le résultat est transmis à OpenLab (page 51 annexe 10) pour validation biologique, puis édité (page 52 annexe 10)

8. DECLARATION D'APTITUDE

Au total, 194 échantillons ont été analysés. Avec une concordance presque totale ($\kappa=0.97$) entre les deux méthodes et l'absence de faux négatifs et de faux positifs, les résultats illustrent la fiabilité de la technique de cytométrie en flux plus adaptée au fonctionnement du laboratoire d'immunologie de routine que la technique de référence. Cette dernière reste néanmoins nécessaire pour les prélèvements trouvés ininterprétables (< 5 %) en cytométrie en flux.

Les automates de cytométrie en flux Navios utilisés avec les marqueurs Beckman Coulter sont donc déclarés aptes à l'utilisation en routine au laboratoire pour la détection des l'antigène HLA B27.

9. CONCLUSION

L'accréditation des LBM est aujourd'hui une démarche obligatoire qui présente de nombreuses contraintes mais qui comporte beaucoup d'avantages pour l'amélioration de la qualité des résultats en apportant la preuve des compétences techniques et organisationnelles du laboratoire.

Dans ce mémoire, je me suis intéressée aux dispositions que le laboratoire doit mettre en place pour maîtriser la phase analytique de la détection de l'antigène HLA B27 par cytométrie en flux, indispensable pour avoir confiance dans la validité des résultats. Cette maîtrise passe par la validation de la méthode qui est une exigence forte de la norme et qui permet d'acquérir une bonne connaissance de la méthode d'analyse utilisée, de ses performances et de ses limites. La suite logique est la mise en place de moyens nécessaires pour garantir la pérennité des performances tout au long de l'utilisation de cette méthode. Une partie de la solution réside dans la mise en place de contrôles de qualité internes et externes et par la gestion des habilitations et compétences du personnel.

10. BIBLIOGRAPHIE

- 1) Monneret G., Seffert O, Debard AL, Gutowski MC, Couprie N, Larbre JP, Tebib J, Bienvenu J. Standardisation et automatisation du typage HLA B27 par une technique cytofluorométrique : validation par comparaison à la microlymphocytotoxicité. Annales de Biologie Clinique. Volume 58, 4, Juillet - Août 2000
- 2) Beckman Coulter : Compte rendu de l'étude portant sur l'analyse de HLA-B27 par cytométrie en flux au moyen du réactif HLA-B27/B7
- 3) Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Technical Note 17 — October 2013
- 4) Issued: August 2004 Amended and reissued: December 2006, April 2009, March 2012, June 2012, October 2013.
- 5) Document Cofrac SH FORM 43 FICHE TYPE de vérification (portée A)/ Validation (portée B) d'une méthode biologie médicale, Révision 01 / date de publication 15/04/2015
- 6) NF EN ISO 15189 décembre 2012 Exigences concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale
- 7) Document Cofrac GTA 01 Guide Technique d'Accréditation en biologie médicale Révision : #00 - 05/2011 Date de publication : 25/07/2011, § 6.14, 6.15 et 6.16 (6)
- 8) Document Cofrac SH GTA 06 Guide Technique d'Accréditation-Contrôle Qualité en Biologie Médicale, révision 00- 06/2012 (7) SH INF 50 : Portées-types d'Accréditation Révision : #01 – 11/2013
- 9) Document Cofrac SH GTA 04 : Guide Technique d'Accréditation de Vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale Révision 01
- 10) Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de Biologie Médicale - Vol. 1 Phase pré-analytique - Phase analytique - Hors série Annales de Biologie Clinique Michel Vaubourdolle 12/2010
- 11) Document Cofrac SH INF 50 Portées types d'accréditation révision 01
- 12) Document Cofrac SH REF 02 Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2007
- 13) Notice Beckman Coulter IOTest HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE A07739 2012-06-15 FR

Paramètre étudié :				HLA B27			
Automate / n°interne				NAVIOS 05470			
REPETABILITE				REPRODUCTIBILITE			
<i>Réactifs</i>	<i>Fourn.</i>	<i>Réf.</i>	<i>Lot</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Fourn.</i>	<i>Réf.</i>	<i>Lot</i>
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	57	CRISP HLA B27	PHOENIX	CRHL-100	CAE0201H1TP7A
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44	IMMUNO -TROL LOW CELLS	BECKMAN	6607098	7609093
	Niveau 1	Niveau 2			Niveau 1	Niveau 2	
Valeur cible				Valeur cible	1,0	30,0	
Critères biolog.(CV%)	10,00	10,00		Critères biolog.(CV%)	15,00	15,00	
Période d'étude :	20/04/2015 et 07/05/15			Période d'étude :	mai-15		
Passages	Niveau 1	Niveau 2		Passages	Niveau 1	Niveau 2	
1	0,296	7,99		1	1,08	29,60	
2	0,321	9,02		2	1,03	26,00	
3	0,309	8,90		3	1,09	30,20	
4	0,331	8,60		4	1,07	25,80	
5	0,305	8,99		5	1,21	31,60	
6	0,310	7,59		6	1,04	29,10	
7	0,318	8,95		7	1,04	30,40	
8	0,309	8,89		8	1,16	29,30	
9	0,313	8,38		9	1,18	28,90	
10	0,234	8,85		10	1,09	22,90	
11	0,317	8,75		11	1,19	31,30	
12	0,315	8,75		12	1,17	26,90	
13	0,313	8,84		13	1,22	29,30	
14	0,307	7,98		14	1,05	26,40	
15	0,301	8,78		15	1,28	31,80	
16	0,304	8,67		16	1,16	29,30	
17	0,232	8,34		17	1,10	26,20	
18	0,301	8,47		18	1,20	32,90	
19	0,302	8,40		19	1,07	23,80	
20	0,299	9,06		20	1,24	31,10	
21	0,290	8,88		21	1,14	28,20	
22	0,302	8,69		22	1,27	33,80	
23	0,295	8,99		23	1,18	29,50	
24	0,273	8,25		24	1,18	28,60	
25	0,289	8,41		25	1,16	27,00	
26	0,294	8,29		26	1,37	31,30	
27	0,283	8,58		27	1,27	26,60	
28	0,281	8,61		28	1,43	35,60	
29	0,274	8,22		29	1,17	28,50	
30	0,282	6,65		30	1,36	30,90	
Valeur mini	0,23	6,65		Valeur mini	1,03	22,90	
Valeur maxi	0,33	9,06		Valeur maxi	1,43	35,60	
Moyenne	0,30	8,53		Moyenne	1,17	29,09	
Ecart type	0,02	0,50		Ecart type	0,10	2,83	
CV %	7,48%	5,87%		CV %	8,68%	9,73%	
Opérateur	SG	SG		Biais_{repro}	0,173	-0,030	
				Biais_{repro} %	17,33%	-3,02%	
VALIDATION REPETABILITE				VALIDATION REPRODUCTIBILITE			
	OK	OK			OK	OK	

Conclusion :

Les coefficients de variations obtenus pour chaque étude sont dans les limites d'acceptabilité fixées.

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Automate / n°interne	NAVIOS 05473
-----------------------------	---------------------

REPETABILITE

Réactifs	Fourn.	Réf.	Lot
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

	Niveau 1	Niveau 2	
Valeur cible			
Critères biolog.(CV%)	10,00	10,00	

Période d'étude :	20/04/2015 et 01/06/15
--------------------------	------------------------

Passages	Niveau 1	Niveau 2	
1	0,270	7,32	
2	0,230	7,47	
3	0,282	7,13	
4	0,279	5,81	
5	0,286	7,24	
6	0,279	7,40	
7	0,254	7,01	
8	0,356	7,11	
9	0,262	7,01	
10	IT	7,01	
11	0,295	6,96	
12	0,252	6,95	
13	0,292	6,68	
14	0,269	6,80	
15	0,306	6,84	
16	0,314	6,16	
17	0,284	6,76	
18	0,275	6,08	
19	0,294	6,77	
20	0,283	6,73	
21	0,285	IT	
22	0,275	6,61	
23	0,278	6,47	
24	0,289	6,44	
25	0,230	6,76	
26	0,274	6,58	
27	0,263	6,43	
28	0,261	6,40	
29	0,297	6,28	
30	0,272	6,36	

Valeur mini	0,23	5,81	
Valeur maxi	0,36	7,47	
Moyenne	0,28	6,74	
Ecart type	0,02	0,40	
CV %	8,68%	6,00%	
Opérateur	SG	SG	

VALIDATION REPETABILITE

OK	OK	
----	----	--

REPRODUCTIBILITE

Réactifs	Fourn.	Réf.	Lot
CRISP HLA B27	PHOENIX	CRHL-100	CAE0201H1TP7A
IMMUNO -TROL LOW CELLS	BECKMAN	6607098	7609093

	Niveau 1	Niveau 2	
Valeur cible	1,0	30,0	
Critères biolog.(CV%)	15,00	15,00	

Période d'étude :	mai-15
--------------------------	--------

Passages	Niveau 1	Niveau 2	
1	0,70	30,20	
2	0,67	22,40	
3	0,66	28,50	
4	0,71	23,10	
5	0,66	24,50	
6	0,64	31,20	
7	0,70	23,40	
8	0,63	30,90	
9	0,56	23,90	
10	0,62	28,10	
11	0,59	22,90	
12	0,80	29,00	
13	0,64	30,70	
14	0,75	27,60	
15	0,64	26,20	
16	0,72	26,60	
17	0,68	23,20	
18	0,77	29,30	
19	0,64	23,10	
20	0,72	30,90	
21	0,69	25,20	
22	0,70	33,50	
23	0,67	31,30	
24	0,76	26,80	
25	0,79	30,00	
26	0,79	26,60	
27	0,69	28,20	
28	0,63	25,30	
29	0,65	27,60	
30	0,72	22,60	

Valeur mini	0,56	22,40	
Valeur maxi	0,80	33,50	
Moyenne	0,69	27,09	
Ecart type	0,06	3,19	
CV %	8,70%	11,76%	
Biais repro	-0,314	-0,097	
Biais repro %	-31,37%	-9,69%	

VALIDATION REPRODUCTIBILITE

OK	OK	
----	----	--

Conclusion :

Les coefficients de variations obtenus pour chaque étude sont dans les limites d'acceptabilité fixées (2 mesures en dehors des critères de validation ont été supprimées et notées IT).

**FICHE DE COMPARAISON
 DE 2 METHODES DIFFERENTES
 ANNEXE 3**

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
1	1467639701	Positif	6,10	Positif
2	1467226001	Positif	6,34	Positif
3	1467120001	Positif	6,47	Positif
4	1467645101	Positif	6,55	Positif
5	1469066501	Positif	6,70	Positif
6	1468572802	Positif	6,93	Positif
7	1468930501	Positif	7,10	Positif
8	1469312103	Positif	7,11	Positif
9	1467236702	Positif	7,20	Positif
10	1467155401	Positif	7,20	Positif
11	1467014702	Positif	7,31	Positif
12	1469059701	Positif	7,31	Positif
13	1467913201	Positif	7,44	Positif
14	1467778701	Positif	7,48	Positif
15	1467180902	Positif	7,51	Positif
16	1467637801	Positif	7,66	Positif
17	1467778701	Positif	7,96	Positif
18	1467079602	Positif	8,00	Positif
19	1467187502	Positif	8,11	Positif
20	1469142801	Positif	1,78	Négatif
Moyenne			7,18	
Ecart type			0,57	
Moyenne+/- 2Ecart type			6.04<7.18<8.32	

**FICHE DE COMPARAISON
 DE 2 METHODES DIFFERENTES
 ANNEXE 3**

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
1	1468165401	Positif	3,98	Ininterprétable
2	1468808302	Positif	3,98	Ininterprétable
3	1467180602	Négatif	4,09	Ininterprétable
4	1647303201	Positif	4,36	Ininterprétable
5	1467097101	Positif	4,52	Ininterprétable
6	1468097001	Positif	4,98	Ininterprétable
7	1468773501	Positif	5,27	Ininterprétable
8	1467186801	Positif	5,83	Ininterprétable
Moyenne			4,63	
Ecart type			0,68	
Moyenne+/- 2Ecart type			3.27<4.63<5.99	

**FICHE DE COMPARAISON
 DE 2 METHODES DIFFERENTES
 ANNEXE 3**

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
1	1467892801	Négatif	0,15	Négatif
2	1468006701	Négatif	0,15	Négatif
3	1467026101	Négatif	0,16	Négatif
4	1467235401	Négatif	0,17	Négatif
5	1468024301	Négatif	0,18	Négatif
6	1466959401	Négatif	0,18	Négatif
7	1467154201	Négatif	0,19	Négatif
8	1466905902	Négatif	0,19	Négatif
9	1467139901	Négatif	0,19	Négatif
10	1469065601	Négatif	0,20	Négatif
11	1468766202	Négatif	0,20	Négatif
12	1469349201	Négatif	0,20	Négatif
13	1468821601	Négatif	0,21	Négatif
14	1467223402	Négatif	0,21	Négatif
15	1468004511	Négatif	0,21	Négatif
16	1467169001	Négatif	0,21	Négatif
17	1466970201	Négatif	0,21	Négatif
18	1467643201	Négatif	0,22	Négatif
19	1468813701	Négatif	0,22	Négatif
20	1466940002	Négatif	0,22	Négatif
21	1468766902	Négatif	0,22	Négatif
22	1467776101	Négatif	0,22	Négatif
23	1467877001	Négatif	0,22	Négatif
24	1467469302	Négatif	0,22	Négatif
25	1468047502	Négatif	0,23	Négatif
26	1469063801	Négatif	0,23	Négatif
27	1467753201	Négatif	0,23	Négatif
28	1467854601	Négatif	0,23	Négatif
29	1466961302	Négatif	0,24	Négatif
30	1467177302	Négatif	0,24	Négatif
31	1466954002	Négatif	0,24	Négatif
32	1469130501	Négatif	0,24	Négatif
33	1468835802	Négatif	0,24	Négatif
34	1467584302	Négatif	0,25	Négatif
35	1467674603	Négatif	0,25	Négatif
36	1467227402	Négatif	0,25	Négatif

**FICHE DE COMPARAISON
 DE 2 METHODES DIFFERENTES
 ANNEXE 3**

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
37	1468071203	Négatif	0,26	Négatif
38	1467772001	Négatif	0,26	Négatif
39	1466899702	Négatif	0,26	Négatif
40	1467636001	Négatif	0,26	Négatif
41	1468772304	Négatif	0,27	Négatif
42	1469346702	Négatif	0,27	Négatif
43	1469064601	Négatif	0,27	Négatif
44	1468105203	Négatif	0,28	Négatif
45	1467772001	Négatif	0,28	Négatif
46	1467616201	Négatif	0,28	Négatif
47	1469041202	Négatif	0,28	Négatif
48	1467616201	Négatif	0,28	Négatif
49	1467183701	Négatif	0,30	Négatif
50	1469111901	Négatif	0,30	Négatif
51	1469052502	Négatif	0,30	Négatif
52	1467076301	Négatif	0,30	Négatif
53	1468781201	Négatif	0,30	Négatif
54	1468842303	Négatif	0,30	Négatif
55	1468773002	Négatif	0,30	Négatif
56	1467461702	Négatif	0,30	Négatif
57	1467769101	Négatif	0,31	Négatif
58	1468018101	Négatif	0,31	Négatif
59	1467752502	Négatif	0,31	Négatif
60	1468018101	Négatif	0,31	Négatif
61	1467216302	Négatif	0,31	Négatif
62	1467580701	Négatif	0,32	Négatif
63	1468813001	Négatif	0,32	Négatif
64	1467183602	Négatif	0,32	Négatif
65	1466704601	Négatif	0,33	Négatif
66	1467769101	Négatif	0,33	Négatif
67	1469101501	Négatif	0,34	Négatif
68	1468780303	Négatif	0,34	Négatif
69	1468768301	Négatif	0,35	Négatif
70	1467114502	Négatif	0,36	Négatif
71	1467500401	Négatif	0,36	Négatif
72	1468977401	Négatif	0,36	Négatif

**FICHE DE COMPARAISON
 DE 2 METHODES DIFFERENTES
 ANNEXE 3**

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
73	1469159002	Négatif	0,36	Négatif
74	1468780002	Négatif	0,36	Négatif
75	1467115901	Négatif	0,37	Négatif
76	1468173603	Négatif	0,37	Négatif
77	1469084401	Négatif	0,38	Négatif
78	1468644703	Négatif	0,38	Négatif
79	1469058301	Négatif	0,38	Négatif
80	1467212301	Négatif	0,38	Négatif
81	1468604001	Négatif	0,39	Négatif
82	1469103401	Négatif	0,39	Négatif
83	1467143301	Négatif	0,39	Négatif
84	1469107301	Négatif	0,39	Négatif
85	1468932102	Négatif	0,40	Négatif
86	1469039401	Négatif	0,40	Négatif
87	1469335702	Négatif	0,40	Négatif
88	1467115102	Négatif	0,41	Négatif
89	1469047101	Négatif	0,41	Négatif
90	1468791501	Négatif	0,41	Négatif
91	1469360404	Négatif	0,42	Négatif
92	1467181402	Négatif	0,42	Négatif
93	1467178008	Négatif	0,42	Négatif
94	1467602701	Négatif	0,42	Négatif
95	1467164502	Négatif	0,42	Négatif
96	1469164301	Négatif	0,43	Négatif
97	1469086901	Négatif	0,43	Négatif
98	1469080601	Négatif	0,45	Négatif
99	1468978801	Négatif	0,45	Négatif
100	1466832602	Négatif	0,46	Négatif
101	1468030703	Négatif	0,46	Négatif
102	1468195202	Négatif	0,48	Négatif
103	1468107801	Négatif	0,48	Négatif
104	1468812101	Négatif	0,49	Négatif
105	1469137401	Négatif	0,49	Négatif
106	1467335101	Négatif	0,50	Négatif
107	1468031601	Négatif	0,53	Négatif
108	1467740801	Négatif	0,53	Négatif

**FICHE DE COMPARAISON
 DE 2 METHODES DIFFERENTES
 ANNEXE 3**

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
109	1469090501	Négatif	0,53	Négatif
110	1467647801	Négatif	0,57	Négatif
111	1468695501	Négatif	0,57	Négatif
112	1469065301	Négatif	0,58	Négatif
113	1467744501	Négatif	0,59	Négatif
114	1468214603	Négatif	0,60	Négatif
115	1469100302	Négatif	0,60	Négatif
116	1467647801	Négatif	0,63	Négatif
117	1469330306	Négatif	0,63	Négatif
118	1468821401	Négatif	0,64	Négatif
119	1468775201	Négatif	0,66	Négatif
120	1469078701	Négatif	0,66	Négatif
121	1467780001	Négatif	0,66	Négatif
122	1469047401	Négatif	0,67	Négatif
123	1469000301	Négatif	0,71	Négatif
124	1467350002	Négatif	0,75	Négatif
125	1468945901	Négatif	0,78	Négatif
126	1466790603	Négatif	0,79	Négatif
127	1467839802	Négatif	0,79	Négatif
128	1468758002	Négatif	0,86	Négatif
129	1467185402	Négatif	0,91	Négatif
130	1468969401	Négatif	0,92	Négatif
131	1467559501	Négatif	0,94	Négatif
132	1467178801	Négatif	0,94	Négatif
133	1467180001	Négatif	0,95	Négatif
134	1468787701	Négatif	0,99	Négatif
135	1467198501	Négatif	1,01	Négatif
136	1467227802	Négatif	1,02	Négatif
137	1469339705	Négatif	1,03	Négatif
138	1466965602	Négatif	1,06	Négatif
139	1468109102	Négatif	1,08	Négatif
140	1467620301	Négatif	1,11	Négatif
141	1467823001	Négatif	1,15	Négatif
142	1469134701	Négatif	1,15	Négatif
143	1469109201	Négatif	1,15	Négatif
144	1468117202	Négatif	1,19	Négatif

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
FLOW CHECK	BECKMAN	A63493	9311032
FLOW SET	BECKMAN	A63492	9001005
IOTest HLAB27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	mars-15
--------------------------	---------

Index	N° patients	PCR	Intensité fluorescence Cytométrie	Résultat quantitatif Cytométrie
144	1468117202	Négatif	1,19	Négatif
145	1469046301	Négatif	1,22	Négatif
146	1467453701	Négatif	1,24	Négatif
147	1467827001	Négatif	1,27	Négatif
148	1468976102	Négatif	1,27	Négatif
149	1467346603	Négatif	1,28	Négatif
150	1468774201	Négatif	1,29	Négatif
151	1469129301	Négatif	1,30	Négatif
152	1468747401	Négatif	1,34	Négatif
153	1468876901	Négatif	1,35	Négatif
154	1469117801	Négatif	1,35	Négatif
155	1468816101	Négatif	1,39	Négatif
156	1467106802	Négatif	1,40	Négatif
157	1468795601	Négatif	1,55	Négatif
158	1467599001	Négatif	1,59	Négatif
159	1467599001	Négatif	1,64	Négatif
160	1469082901	Négatif	1,74	Négatif
161	1469309605	Négatif	1,82	Négatif
162	1468772102	Négatif	1,84	Négatif
163	1467032001	Négatif	2,10	Négatif
164	1468819708	Négatif	2,50	Négatif
165	1469159803	Négatif	2,50	Négatif
166	1468988103	Négatif	3,04	Négatif
Moyenne			0,60	
Ecart type			0,50	
Moyenne+/- 2Ecart type			0<0.60<1.6	

Paramètre étudié :	HLAB27
---------------------------	---------------

<i>Réactifs</i>	<i>Fourn.</i>	<i>Réf.</i>	<i>Lot</i>
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	01/04/2015
--------------------------	------------

Unité	
--------------	--

Automate 1 N°interne	5470
---------------------------------	-------------

Automate 2 N°interne	5473
---------------------------------	-------------

Index	N° patients	Automate 1	Automate 2
1	34808645	11,60	10,90
2	34808652	6,26	5,81
3	34807820	14,90	13,10
4	34814087	6,58	6,09
5	34814219	8,18	7,67
6	34807789	8,02	7,83
7	34833062	6,24	5,74
8	34833599	9,81	8,06
9	34833752	8,42	8,21
10	34828262	8,14	7,22
11	34835734	11,50	10,20
12	34837859	13,10	11,60
13	34837252	8,19	7,37
14	34809069	0,20	0,20
15	34813750	1,16	1,11
16	34813726	1,14	1,14
17	34814730	0,20	0,20
18	34809465	1,16	1,07
19	34814760	0,47	0,51
20	34816327	0,20	0,20
21	34813723	0,43	0,40
22	34813750	0,25	0,24
23	34813931	0,30	0,28
24	34813116	0,28	0,27
25	34808450	0,91	0,84
26	34807397	0,56	0,51
27	34831230	6,23	6,13
28	34827173	4,63	4,48
29	34816258	4,55	4,25
30	34814158	6,10	5,71
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			

Paramètre étudié : HLAB27

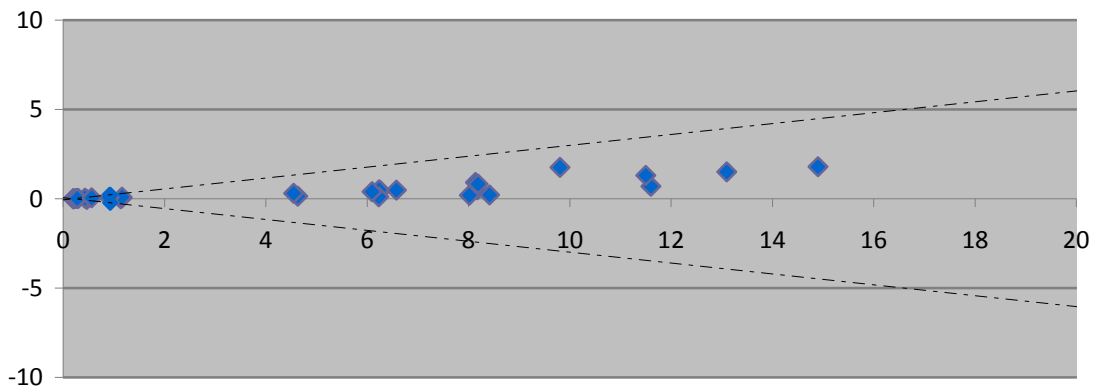
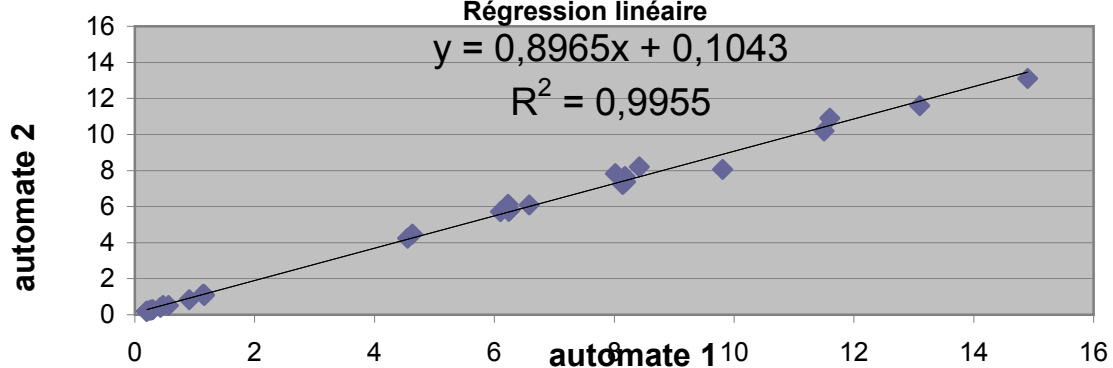
Période d'étude : 01/04/2015

CQI Niveau 1

Automates	Cible CQI	Cible CQI moyen	CV _{CQI} (%)	σ_{CQI}	σ_{CQI} moyen	2 $\sqrt{2}$ σ_{CQI} moyen
1	1,173	0,93	8,68	0,10	0,08	0,23
2	0,686		8,7	0,06		

CQI Niveau 2

Automates	Cible CQI	Cible CQI moyen	CV _{CQI} (%)	σ_{CQI}	σ_{CQI} moyen	2 $\sqrt{2}$ σ_{CQI} moyen
1	29,093	28,09	9,73	2,83	3,01	8,51
2	27,093		11,76	3,19		

**Comparaison de deux automates identiques
 Diagramme des différences**

**Corrélation de deux automates identiques
 Régression linéaire**

Conclusion :

Pas de discordances observées entre les deux automates.

Paramètre étudié :	HLA B27
---------------------------	----------------

Test de contamination inter-échantillons

Réactifs	Fourn.	Réf.	Lot
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	lot 58 exp 20/11/15
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	lot 45 exp 01/10/15

Période d'étude :	20/04/2015
--------------------------	------------

Passages	Echantillon à valeur élevée			Echantillon à valeur basse		
	H1	H2	H3	B1	B2	B3
1	8,04	8,11	8,12	0,35	0,34	0,33
2	7,93	7,84	7,83	0,34	0,33	0,33
3	7,85	7,70	7,40	0,34	0,35	0,33
4	7,40	7,37	7,34	0,35	0,30	0,31
5	7,67	7,07	7,36	0,33	0,33	0,31

Moyenne mH	7,67
-------------------	------

Moyenne mB1	0,34
--------------------	------

Moyenne mB3	0,32
--------------------	------

Contamination en % (mB1-mB3) / (mH-mB3) x 100	0,245
--	-------

Conclusion :
Pas de contamination observée.

Paramètre étudié :	HLA-B27
---------------------------	----------------

Réactifs	Fournisseur	Référence	Lot
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	57
LYSING SOLUTION	BECKMAN	A07799	44

Période d'étude :	01/06/2015
--------------------------	------------

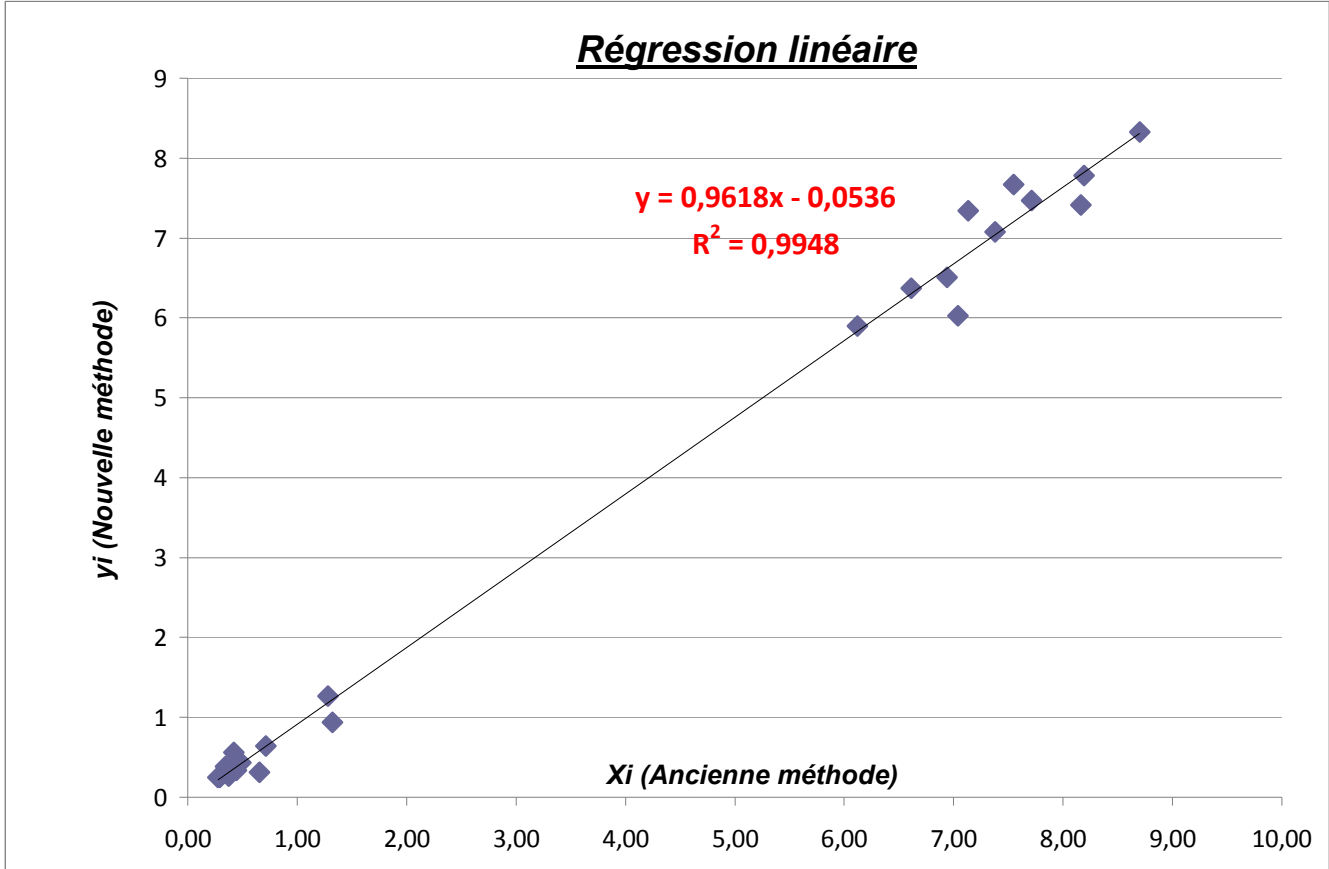
Index	N° patients	Ancienne méthode, xi	Nouvelle méthode, yi
1	35588585	7,71	7,47
2	35588255	0,28	0,25
3	35576124	7,04	6,03
4	35580619	6,94	6,51
5	35584891	7,13	7,34
6	35584054	6,12	5,90
7	35577101	8,70	8,33
8	35579955	8,16	7,41
9	35560463	7,55	7,67
10	35566438	8,19	7,78
11	35561952	6,61	6,37
12	35569404	7,38	7,08
13	35584634	0,29	0,25
14	35580536	0,72	0,64
15	35582668	1,32	0,94
16	35583562	1,28	1,27
17	35583797	0,49	0,43
18	35580594	0,37	0,34
19	35578973	0,41	0,38
20	35579199	0,38	0,26
21	35581996	0,35	0,39
22	35576611	0,66	0,31
23	35577106	0,42	0,56
24	35578988	0,45	0,34
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			

Ancienne méthode	Methode manuelle
-------------------------	-------------------------

Nouvelle méthode	Methode automatisée
-------------------------	----------------------------

Paramètre étudié :	HLA-B27
---------------------------	----------------

Période d'étude :	01/06/2015
--------------------------	------------



Ancienne méthode	Methode manuelle
-------------------------	-------------------------

Nouvelle méthode	Methode automatisée
-------------------------	----------------------------

Equation de la droite de régression	$y = 0,9618x - 0,0536$ $R^2 = 0,9948$
--	--

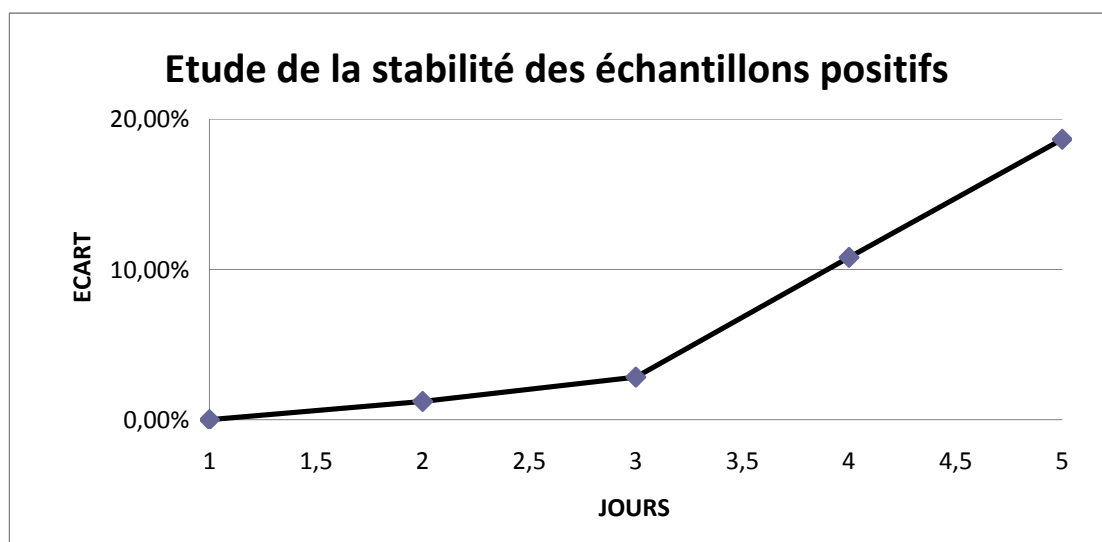
**EVALUATION DE LA DUREE
DE STABILITE DES ECHANTILLONS POSITIFS**

ANNEXE 7

Paramètre étudié :	HLA-B27
Période d'étude	Février-Avril 2015
Automates	NAVIOS 1et 2 (n°interne 05470 et 05473)

Réactif Utilisés	Fourn.	Réf.		Date de péremption
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	n°57	01/02/2016
Lysing Solution	BECKMAN	A07799	n°44	18/06/2015

Echantillons POSITIFS					
N° dossier	Jour 1 Intensité de fluorescence	Jour 2 Intensité de fluorescence	Jour 3 Intensité de fluorescence	Jour 4 Intensité de fluorescence	Jour 5 Intensité de fluorescence
34032332	8,91	9,01	8,2	7,42	7,14
34027591	7,24	7,63	7,29	7,19	4,96
34032010	7,57	5,33	7,25	5,84	4,93
34807789	6,67	7,51	6,81	7,43	6,51
34814219	8,28	7,54	7,29	6,08	6,38
34814087	6,09	5,8	6,15	5,93	5,39
34982620	7,54	7,12	6,52	6,26	5,76
34983606	6,34	7,67	7,41	7,38	5,61
34990964	6,82	6,77	6,55	6	5,5
34990968	7,43	7,45	7,09	7,05	6,33
34993786	7,02	7,11	7,08	7,11	6,49
Moyenne	7,26	7,18	7,06	6,48	5,91
Ecart	0,00%	1,21%	2,84%	10,80%	18,66%



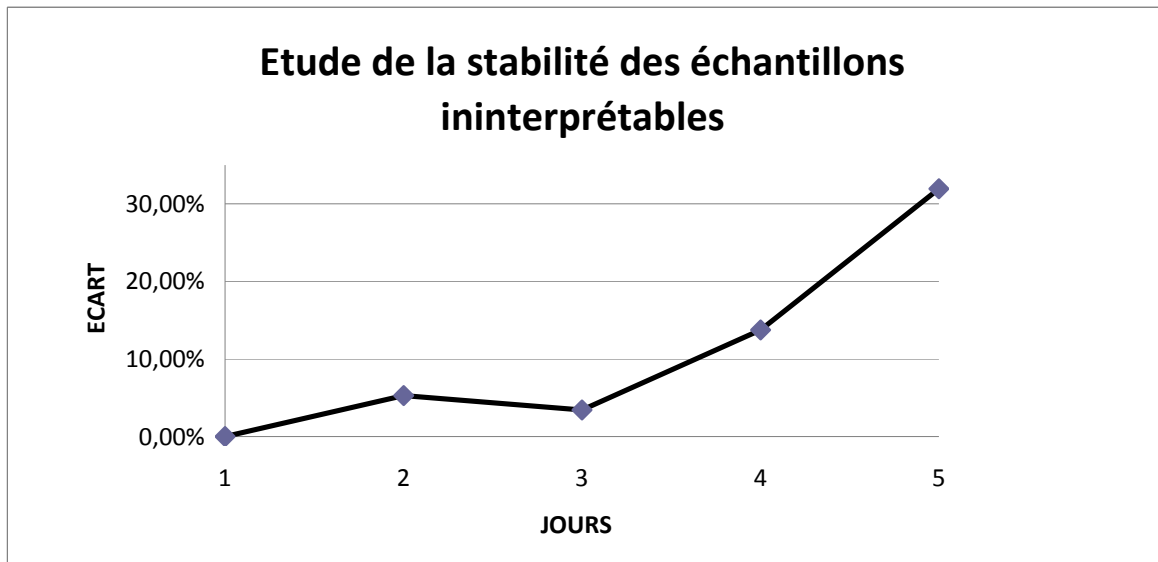
Les échantillons sont stables sur la période de 3 jours après le prélèvement

**EVALUATION DE LA DUREE
DE STABILITE DES ECHANTILLONS ININTERPRETABLES
ANNEXE 8**

Paramètre étudié :	HLA-B27
Période d'étude	Février-Avril 2015
Automates	NAVIOS 1et 2 (n°interne 05470 et 05473)

Réactif Utilisés	Fourn.	Réf.		Date de péremption
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	n°57	01/02/2016
Lysing Solution	BECKMAN	A07799	n°44	18/06/2015

Echantillons ininterprétables					
N° dossier	Jour 1 Intensité de fluorescence	Jour 2 Intensité de fluorescence	Jour 3 Intensité de fluorescence	Jour 4 Intensité de fluorescence	Jour 5 Intensité de fluorescence
34017642	5,84	5,65	5,49	5,26	3,28
34020384	5,43	5,52	5,53	4,98	3,43
34021012	5,63	6,12	5,92	4,46	4
34021549	5,71	4,39	5,17	4,76	3,34
34021324	5,21	4,81	5,01	4,72	3,15
34013617	4,92	5,19	4,93	4,31	3,57
34012375	5,79	5,63	5,73	5,31	3,67
34012105	4,96	5,29	5,08	4,59	3,57
35086951	5,56	4,76	5,02	4,59	4,64
35089191	5,09	3,93	4,4	3,72	4,19
Moyenne	5,41	5,13	5,23	4,67	3,68
Ecart	0,00%	5,26%	3,44%	13,74%	31,95%



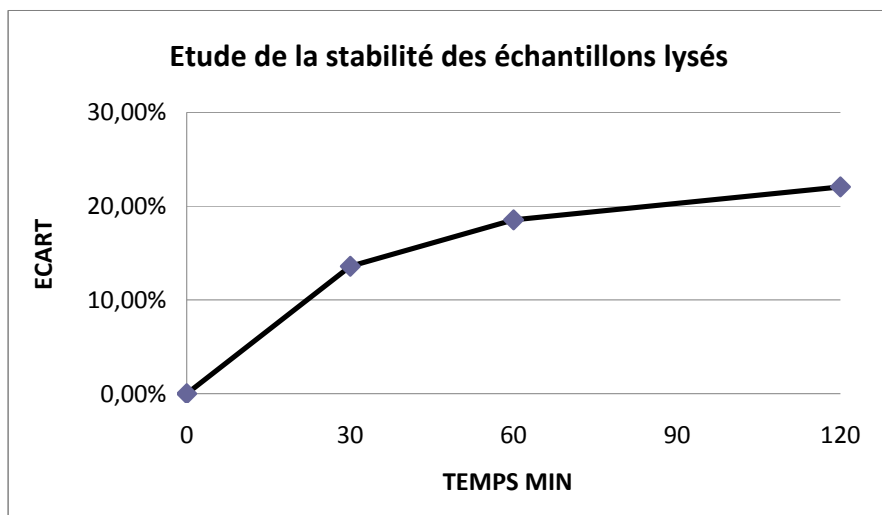
Les échantillons sont stables sur la période de 3 jours après le prélèvement

**EVALUATION DE LA DUREE
DE STABILITE DES ECHANTILLONS LYES**
ANNEXE 9

Paramètre étudié :	HLA-B27
Période d'étude	27/04/2015
Automates	NAVIOS AU 1511

Réactif Utilisés	Fourn.	Réf.		Date de péremption
IOTEST HLA B27/B7	BECKMAN	A07739	n°57	01/02/2016
Lysing Solution	BECKMAN	A07799	n°44	18/06/2015

Echantillons lysés				
Temps min	0	30	60	120
CQI+	29	24,4	22,9	22,1
CQI-	0,671	0,632	0,655	0,637
35141398	7,72	6,99	6,92	6,62
35158629	4,62	4,09	3,88	3,73
35163297	4,42	3,78	3,38	3,05
35162773	0,76	0,61	0,47	0,36
35159774	0,3	0,27	0,25	0,24
35165387	5,79	5,27	4,96	4,79
Moyenne	6,66	5,76	5,43	5,19
Ecart	0,00%	13,59%	18,52%	22,06%



Les échantillons sont à analyser dans un délai de 1h après la lyse.

Annexe 10 : Vérification des connexions informatiques

Paramètre : HLA B27

► Dossier 20355 98375 du 01/06/2015

1 – Création de la demande sur OpenLab

```
20355 98375-01.06.15 -14:36 (P=01.06) Consultation 2035598375 1/06/15
CONNEXION INFORMATIQUE 10.10.1970 . 15:01:48
CORR. INCONNU ARCHIVE ( *** ) Comp LI
R E S U L T A T S Page R.1 ==> Lg Début...
Lig. S Analyse Résultat Unité Normes

Hématologie
Immuno-Hématologie
Y0201_01 0 B27CF 19 HLA B27 (cytométrie en flux)
Y0201_02 0 Résultat HLA B27 (cytométrie en flux)
          00000000
Y0201_03 3 Conclusion ininterprétable
Y0201_04 3 Tableau HLA B27 CF SL0139
          Le phénotypage HLA B27 a été réalisé par
          technique de cytométrie en flux.
          La technique de cytométrie en flux doit être
          réalisée sur un prélèvement de moins de 72 heures
          Il est à noter qu'il peut exister des réactions
          croisées avec certains antigènes HLA, du groupe B7
          par exemple. De ce fait, la méthode de référence
          présentant un niveau de spécificité proche de 100%
F2=Val Bio F3=Exit F4=Invite F5=Réaffich. F6=Imparfait à suivre...
F9=Valor. détail. F10=Visua. Ecritures F11=Libellé Long F24=Autres touches
```

```
20355 98375-01.06.15 -14:36 (P=01.06) Consultation 2035598375 1/06/15
CONNEXION INFORMATIQUE 10.10.1970 . 15:02:22
CORR. INCONNU ARCHIVE ( *** ) Comp LI
R E S U L T A T S Page R.2 ==> Lg ...suite
Lig. S Analyse Résultat Unité Normes

.....
est aujourd'hui le génotypage de la spécificité
HLA-B27 par biologie moléculaire.
Y0201_05 0 Graphe 1
767 4 B27 *N Attestation/consentem non non
          ...Fin
F2=Val Bio F3=Exit F4=Invite F5=Réaffich. F6=Imparfait
F9=Valor. détail. F10=Visua. Ecritures F11=Libellé Long F24=Autres touches
```

Conformément aux dispositions réglementaires, toute demande d'HLA B27 doit être accompagnée de l'attestation de consultation et du consentement éclairé du patient et de la prescription médicale.

En l'absence d'attestation de consultation et/ou du consentement éclairé du patient, la technique de cytométrie en flux sera réalisée.

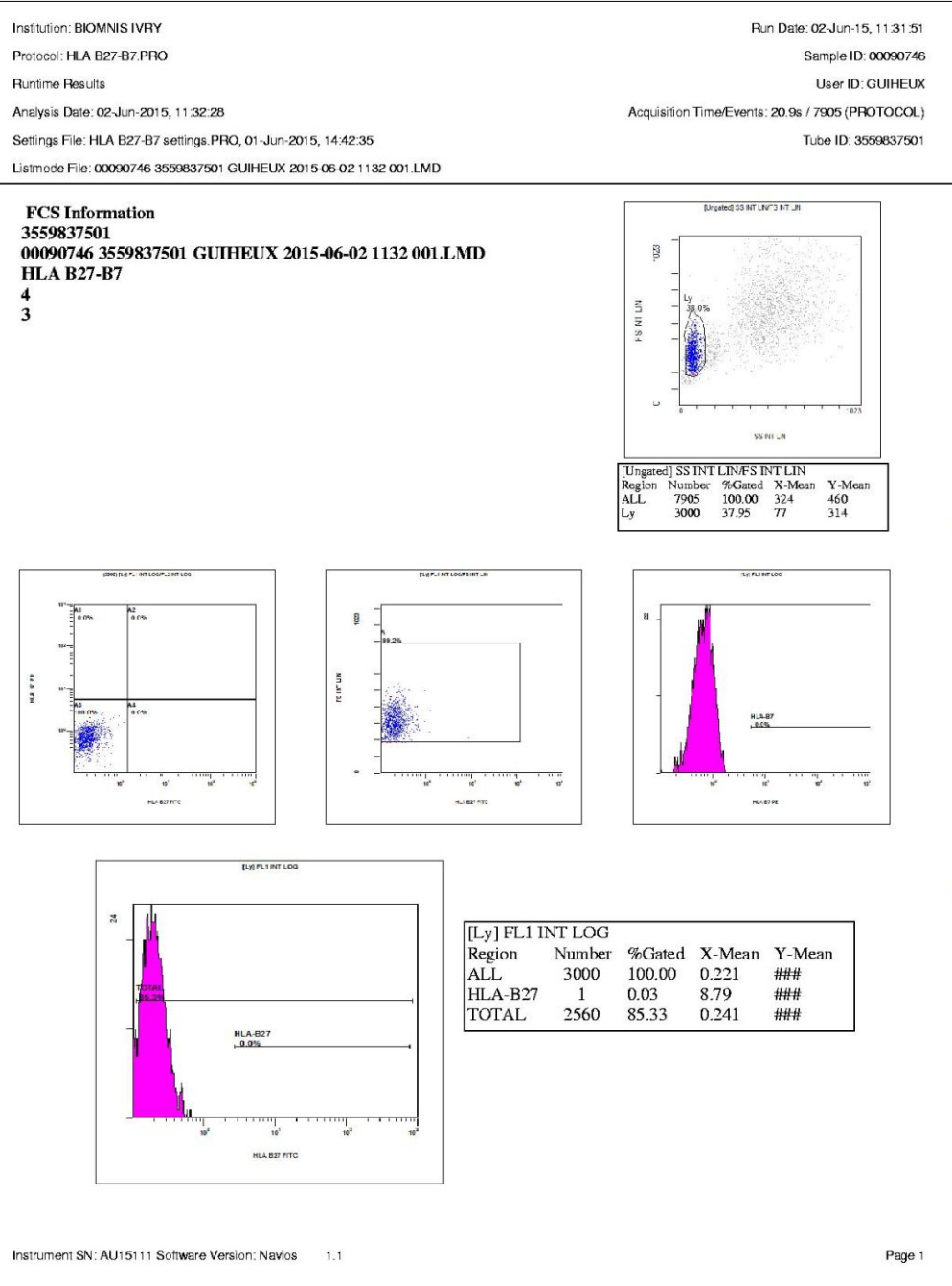
2 a- Transfert de la demande sur PGP

LPM - Laboratory Production Manager - [Parcourir les demandes - Generic Requests by Requisition Date]							FR Français (France) ? Aide						
Tâches Ressources Voir Liste Patient Demande Echantillon Test Fenêtre Aide													
(Tous) - CONNEXION, INFORMATI -													
Demandes :							Demande : 3559837501 01/06/2015 00:00 CONNEXION, INFORMATIQU 10/10/1970						
Id	Nom	Vérfié	Info Tube	Portoir	Avancement	Prélèvement	Test	Valeur	Commentaires	Antériorité	Le	Avancement	Nécessité
▶ 3559837501	CONNEXION, INFORMATIQUE			52	Démarré	01/06/2015 00:00	B27OL					Démarré	Demandé

2b – Transfert de la demande sur la liste de travail des Navios

LPM - Laboratory Production Manager - [Modifier une liste de travail - NAVIOS1-05470 0601]											FR Français (France) ? Aide	
Tâches Ressources Voir Liste Patient Demande Echantillon Passage Analyse Résultat Test Fenêtre Aide												
(Tous) - A répondre - (Liste) -												
Demande	Localisation	Etat	Priorité	Nom	Date Demande	Date Prélèvement	Vérif Réception	B27OL	OKT	RC LNH	KLEICF	
3558585401		néces.			30/05/2015 11:00	28/05/2015 08:00	30/05/2015 12:03	Dem.				
3558333901		néces.			01/06/2015 07:28	01/06/2015 00:00	01/06/2015 10:09		Dem.			
3558337401		néces.			01/06/2015 07:32	01/06/2015 00:00	01/06/2015 10:09		Dem.			
3559402701		néces.	Urgent		01/06/2015 10:23	30/05/2015 10:21	01/06/2015 11:54		Dem.			
3559404501		néces.			01/06/2015 10:25	29/05/2015 07:01	01/06/2015 11:53		Dem.			
3559406301		néces.			01/06/2015 10:26	30/05/2015 08:01	01/06/2015 11:54	Dem.				
3559407402		néces.			01/06/2015 10:26	30/05/2015 09:32	01/06/2015 11:53	Dem.				
3559411101		néces.			01/06/2015 10:28	30/05/2015 08:03	01/06/2015 11:53		Dem.			
3559415001		néces.			01/06/2015 10:30	30/05/2015 09:33	01/06/2015 11:53		Dem.			
3559418202		néces.			01/06/2015 10:31	30/05/2015 10:06	01/06/2015 11:54	Dem.				
3559423001		néces.			01/06/2015 10:33	29/05/2015 17:41	01/06/2015 11:53		Dem.			
3559432702		néces.			01/06/2015 10:36	30/05/2015 08:49	01/06/2015 11:53	Dem.				
3559438501		néces.			01/06/2015 10:39	30/05/2015 09:26	01/06/2015 11:53		Dem.			
3559459201		néces.			01/06/2015 10:47	29/05/2015 10:24	01/06/2015 11:53		Dem.			
3558585502		néces.			01/06/2015 10:50	29/05/2015 10:17	01/06/2015 11:53		Dem.			
3558579302		néces.	Urgent		01/06/2015 10:59	29/05/2015 11:15	01/06/2015 11:53		Dem.			
3559667501		néces.			01/06/2015 12:19	29/05/2015 06:39	01/06/2015 12:52		Dem.			
3559675501		néces.			01/06/2015 12:23	29/05/2015 10:47	01/06/2015 12:51		Dem.			
3559678501		néces.			01/06/2015 12:25	29/05/2015 08:03	01/06/2015 12:51		Dem.			
3559680701		néces.			01/06/2015 12:26	30/05/2015 08:31	01/06/2015 12:52		Dem.			
3559738201		néces.			01/06/2015 13:11	29/05/2015 10:27						Dem.
3559748702		néces.			01/06/2015 14:35	01/06/2015 08:13			Dem.			
3559837501		néces.		CONNEXION, INFORMATIQUE	01/06/2015 14:37	01/06/2015 00:00		Dem.				

3 – Réalisation de l'analyse sur Navios – Données brutes



4 – Transfert des résultats de l'automate vers PGP – validation technique

Demandes :							Demande : 3559837501 01/06/2015 00:00 CONNEXION, INFORMATIQ 10/10/1970						
Id	Nom	Vérfié	Info Tube	Portoir	Avancement	Prélèvement	Test	Valeur	Commentaires	Antériorité	Le	Avancement	Nécessité
3559837501	CONNEXION, INFORMATIQUE			52	Terminé	01/06/2015 00:00	B27	0.03				Terminé	
							TotMB27	0.24				Terminé	
							B27OL	Négatif				Terminé	Demandé

5 – Transfert du résultat et commentaire de PGP à OpenLab et validation du dossier

```

20355 98375-01.06.15 -14:36 (P=01.06) Consultation 2035598375 24/06/15
CONNEXION INFORMATIQUE 10.10.1970 . 17:17:41
CORR. INCONNU ARCHIVE ( *** ) Comp LI
R E S U L T A T S Page R.1 ==> _ Lg Début...
Lig. S Analyse Résultat Unité Normes

Hématologie
Immuno-Hématologie
Y0201_01 6 B27CF 19 HLA B27 (cytométrie en flux)
Y0201_02 6 Résultat HLA B27 (cytométrie en flux)
SL0001 Négatif
Y0201_03 6 Conclusion ininterprétable
Y0201_04 6 Tableau HLA B27 CF SL0139
Le phénotypage HLA B27 a été réalisé par
technique de cytométrie en flux.
La technique de cytométrie en flux doit être
réalisée sur un prélèvement de moins de 72 heures
Il est à noter qu'il peut exister des réactions
croisées avec certains antigènes HLA, du groupe B7
par exemple. De ce fait, la méthode de référence
présentant un niveau de spécificité proche de 100%
F2=Val Bio F3=Exit F4=Invite F5=Réaffich. F6=Imparfait à suivre...
F9=Valor. détail. F10=Visua. Ecritures F11=Libellé Long F24=Autres touches
  
```

```

20355 98375-01.06.15 -14:36 (P=01.06) Consultation 2035598375 24/06/15
CONNEXION INFORMATIQUE 10.10.1970 . 17:18:12
CORR. INCONNU ARCHIVE ( *** ) Comp LI
R E S U L T A T S Page R.2 ==> _ Lg ...suite
Lig. S Analyse Résultat Unité Normes

est aujourd'hui le génotypage de la spécificité
HLA-B27 par biologie moléculaire.
Y0201_05 6 Graphe 1
767 6 B27 *N Attestation/consentem non non
...Fin
F2=Val Bio F3=Exit F4=Invite F5=Réaffich. F6=Imparfait
F9=Valor. détail. F10=Visua. Ecritures F11=Libellé Long F24=Autres touches
  
```

6 – Compte-rendu patient

Biologiste responsable : Anne EBEL
Biologistes médicaux :
A. ARDALAN M. DAUTIGNY L. GUILLOUX G. PANTEIX B. SCHUBERT
JC. AZOULAY H. DESSUANT L. GUISS L. PELLEGRINA J. STAGNARA
S. BOURRIQUET L. DRIART C. HAMBERGER G. PERAZZA L. STROMPF
C. BOUZ A. EBEL V. JACOMO I. PETIT S. TAPIA
D. BRUNENGO G. EGSA L. LEFLEM B. GUILICHINI J.M. VANDERNOTTE
M. CHEVALLIER M. FELCE T. LY E. RABUT E. CART-TANNEUR
G. CHYEROTIS A. FORCE A. MARC LY L. RAYMOND
C. COIGNARD P. FOURNIER F. MIGNERET L. RIDAN
N. COUPRIE F. GERARD M. NEYRA L. RIGOLLET
R. DACHEZ P. GERHIER M. NOUCHY C. SAULT

AGREMENTS : Radio-immunologie, Cytogénétique prénatale et postnatale, Génétique moléculaire prénatale et postnatale, Marqueurs sériques de la syphilis 21, Biochimie foetale, Biologie foetale infectieuse, Plomb, Assistance médicale à la procréation.

Dossier : 20355 **98375-01.06.15**
Enregistré le 01 Juin 2015, à 14h36
Edité le 24 Juin 2015, à 17h26
Transmis par : CORR. INCONNU ARCHIVE

INCAI – C – 2035598375 M
CORR. INCONNU ARCHIVE
***** Compte Rendu à jeter ****
*****DOSSIER ARCHIVE APRES 3 MOIS*
94208 IVRY/SEINE

Exemplaire destiné au correspondant *Duplicata*

Résultat d'analyse : . **CONNEXION, INFORMATIQUE**
Né le 10 Octobre 1970, âgé de 44 ans
Prélèvement du 01 Juin 2015

HEMATOLOGIE Immuno-Hématologie

■ HLA B27 (cytométrie en flux)

Négatif

Le phénotypage HLA B27 a été réalisé par technique de cytométrie en flux.
La technique de cytométrie en flux doit être réalisée sur un prélèvement de moins de 72 heures
Il est à noter qu'il peut exister des réactions croisées avec certains antigènes HLA, du groupe B7
par exemple. De ce fait, la méthode de référence présentant un niveau de spécificité proche de 100%
est aujourd'hui le génotypage de la spécificité HLA-B27 par biologie moléculaire.

Interlocuteur : Catherine Coignard : 01 49 59 16 16

Dossier complet



Catherine COIGNARD

IOTest
HLA-B27-FITC/
HLA-B7-PE

REF A07739

50 tests ; 1 mL
20 µL / test



IOTest
Anticorps Conjugué



FRANÇAIS	Spécifications du constituant 1	Spécifications du constituant 2
Spécificité	HLA-B27	HLA-B7
Clone	HLA-ABC-m3	BB7.1
Hybridome	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Immunogène	Antigène HLA-B27 partiellement purifié, extrait de la lignée Bordin (HLA-B27 ⁺)	Antigène HLA-A2, B7 partiellement purifié, obtenue par clivage à la papaïne
Immunoglobuline	IgG2a	IgG1
Espèce	Souris	Souris
Source	Ascite ou surnageant de culture in vitro de cellules hybridomes	Ascite ou surnageant de culture in vitro de cellules hybridomes
Purification	Chromatographie d'affinité	Chromatographie d'affinité
Fluorochrome	Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	R Phycocérythrine (PE)
λ d'excitation	488 nm	488 nm
Pic d'émission	525 nm	575 nm
Tampon	PBS pH 7,2 additionné de 2 mg / mL BSA et de 0,1% NaN ₃	

UTILISATION

Ce mélange d'anticorps conjugués à des fluorochromes permet l'identification et la numération des populations cellulaires exprimant l'antigène HLA-B27 présentes dans des échantillons biologiques humains par cytométrie en flux.

Le rôle de l'anticorps monoclonal de spécificité HLA-B7 est de mettre en évidence la présence de cet antigène, principale cause de réaction croisée du clone reconnaissant l'antigène HLA-B27 (1, 2).

Ne pas utiliser pour la détermination du groupe tissulaire HLA-B.

PRINCIPE

Ce test repose sur la capacité d'anticorps monoclonaux spécifiques de se fixer sur des cellules leucocytaires par les déterminants antigéniques qu'elles expriment sur la surface.

Le marquage spécifique des leucocytes est réalisé en incubant l'échantillon avec le réactif IOTest. Les érythrocytes sont ensuite éliminés par lyse et les leucocytes, non affectés par cette étape, sont analysés par cytométrie en flux.

Le cytomètre en flux mesure la diffusion de la lumière ainsi que la fluorescence des cellules. Il permet de circonscrire la population d'intérêt à l'intérieur d'une fenêtre électronique, définie sur un histogramme qui corrèle la diffusion de la lumière aux grands angles ("Side Scatter" ou SS) et la diffusion de la lumière aux petits angles ("Forward Scatter" ou FS). D'autres histogrammes combinant deux des différents paramètres disponibles sur le cytomètre sont utilisables comme supports à l'étape de fenêtrage électronique en fonction de l'application choisie par l'utilisateur.

La fluorescence des cellules ainsi fenêtrées est analysée pour distinguer les événements positivement marqués des événements non marqués. Dans ce test, contrairement à la grande majorité des autres tests de cytométrie, le phénotypage HLA-B27 s'affirme en comparant les intensités de fluorescence de l'échantillon testé par rapport aux intensités de fluorescence d'échantillons certifiés HLA-B27⁺ et HLA-B27⁻.

ELEMENTS D'APPLICATIONS

CLINIQUES

Les antigènes HLA-B27 et HLA-B7 appartiennent au groupe de réactions croisées B7 (CREG HLA-B7). Parmi les autres antigènes HLA-B appartenant au CREG HLA-B7, on peut citer B42, B22 (subdivisé en B54, B55 et B56), B40 (subdivisé en B60 et B61), ainsi que B41, B47 et B13 (3). L'anticorps monoclonal HLA-ABC-m3 reconnaît l'antigène HLA-B27. Il croise avec l'antigène HLA-B7 (4) et peut également

se fixer, mais de manière moins affine, sur les autres antigènes du CREG HLA-B7. L'anticorps monoclonal BB7.1 reconnaît l'antigène HLA-B7 (5, 6). Bien que très spécifique, il croise avec l'antigène HLA-B42 (2). Les antigènes HLA-B27, dont 15 allèles (B*2701-15) ont été trouvés (7), et HLA-B7, dont 11 allèles (B*0702-12) ont été trouvés (7), sont exprimés sur respectivement 7% et 22% des individus de la population caucasienne (8, 9).

Ce mélange permet la caractérisation de la spécificité HLA-B27 dans l'allotype HLA de classe I chez les patients atteints d'affections inflammatoires des articulations sacroiliaques et intervertébrales. Cette mise en évidence apporte une aide au diagnostic de la spondylarthrite ankylosante, dont 90% des sujets atteints expriment l'antigène HLA-B27, contre 7% de la population normale (10 – 13).

CONSERVATION, STABILITE

Les formes conjuguées liquides se conservent entre 2 et 8°C et à l'abri de la lumière, avant et après ouverture du flacon.

Stabilité flacon fermé : voir la date de péremption du réactif indiquée sur le flacon.

Stabilité flacon ouvert : le réactif reste stable pendant 90 jours.

CONTENU DES REACTIFS

Contactez le Service clients Beckman Coulter pour connaître la concentration en anticorps du réactif IOTest.

INDICATIONS DE DETERIORATION

En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter notre service Support Technique :

Tel : 04 91 17 27 27 Fax : 04 91 17 27 25
e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRECAUTIONS

1. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
2. Ne pas congeler.
3. Laisser revenir à température ambiante (18 – 25°C) avant utilisation.
4. Minimiser les temps d'exposition à la lumière.
5. Eviter la contamination microbienne des réactifs ou des résultats erronés peuvent apparaître.
6. Les solutions d'anticorps contenant de l'azote de sodium (NaN₃) sont à manipuler avec précaution. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux.

Par ailleurs, en milieu acide, l'azote de sodium est susceptible de former un acide hydrazoïque potentiellement dangereux. S'il est nécessaire d'éliminer le réactif, il est recommandé de le diluer dans un grand

volume d'eau avant de le verser dans les canalisations, afin d'éviter l'accumulation d'azote de sodium dans les conduites métalliques et de prévenir les risques d'explosion.

7. Tout échantillon sanguin doit être considéré comme potentiellement infectieux et doit être manipulé avec les précautions d'usage (en particulier : port de gants, de blouse et de lunettes de protection).
8. Ne jamais pipeter à la bouche et éviter tout contact des échantillons avec la peau, les muqueuses et les yeux.
9. Les tubes de sang et le matériel à usage unique ayant servi à la manipulation doivent être éliminés dans des conteneurs ad hoc destinés à l'incinération.

SPECIMENS

Les prélèvements de sang veineux ou de moelle osseuse doivent s'effectuer sur tubes stériles contenant un sel d'EDTA comme anticoagulant. L'utilisation d'un autre anticoagulant n'est pas recommandée.

Les échantillons se conservent à température ambiante (18 – 25°C) et sans agitation. Avant d'effectuer la prise d'essai, il est recommandé d'homogénéiser le prélèvement par agitation douce.

Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

METHODOLOGIE

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Tubes à prélèvement et matériel nécessaire aux prélèvements.
- Pipettes automatiques et embouts jetables pour prélever des quantités de 20, 100 et 500 µL.
- Tubes à hémolyse en plastique.
- Billes de calibration : Fluosphères Flow-Set (Réf. 6607007).
- Réactif de lyse des érythrocytes avec étape de lavage après lyse. A titre d'exemple : Solution de Lyse IOTest 3 (Réf. A07799).
- Réactif de fixation : Solution de Fixation IOTest 3 (Réf. A07800).
- Contrôle isotypique : Un mélange d'IgG2a-FITC et d'IgG1-PE, tous deux de souris.
- Réactif de réglage des compensations : Un mélange d'anticorps monoclonaux CD8-FITC et CD4-PE.
- Sang de contrôle : IMMUNO-TROL Control Cells (Réf. 6607077).
- Tampon (PBS : 0,01 M phosphate de sodium; 0,145 M chlorure de sodium; pH 7,2).
- Centrifugeuse.
- Agitateur automatique (type Vortex).
- Cytomètre en flux.

PROCEDURE

Les réponses cliniques données par ce test reposent sur les intensités de fluorescence ; celles-ci étant fortement dépendantes des réglages de compensation, il est indispensable de prévoir avec chaque série d'analyse un tube pour la vérification de ces réglages. Pour cette vérification, reportez-vous au paragraphe : **REGLAGES DU CYTOMETRE**.

Pour chaque échantillon analysé, prévoir en plus du tube test, un tube contrôle dans lequel les cellules seront mises en présence du contrôle isotypique.

1. Dans chaque tube test, introduire 20 µL de la solution d'anticorps conjugués IOTest spécifique et dans chaque tube contrôle la quantité nécessaire de contrôle isotypique.
2. Ajouter 100 µL de l'échantillon à tester dans les 2 tubes. Vortexer doucement.
3. Incuber 15 à 20 minutes à température ambiante (18 – 25°C) et à l'abri de la lumière.
4. Procéder, si nécessaire, à la lyse des globules rouges en suivant les recommandations du réactif de lyse utilisé.

A titre d'exemple, si l'on souhaite utiliser la Solution de Lyse IOTest 3 (Réf. A07799), ajouter 2 mL de ce réactif à sa concentration de travail (1X). Vortexer immédiatement et incuber 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- Si l'échantillon ne contient pas de globules rouges, remplacer la lyse par 2 mL de PBS.
5. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
 6. Eliminer le surnageant par aspiration.
 7. Resuspendre le culot cellulaire dans 3 mL de PBS.
 8. Répéter l'étape 5.
 9. Eliminer le surnageant par aspiration et resuspendre le culot cellulaire dans :

- 0,5 mL ou 1 mL de Solution de Fixation IOTest 3 (Réf. A07800) à sa concentration de travail (1X), si les préparations sont destinées à être conservées plus de 2 heures, et moins de 24 heures,
- 0,5 mL ou 1 mL de PBS sans formaldéhyde, si les préparations sont destinées à être analysées dans les 2 heures.

NOTA BENE : Dans tous les cas, conserver les préparations entre 2 et 8°C et à l'abri de la lumière.

REGLAGES DU CYTOMETRE

Cette procédure de réglage du cytomètre est à faire dans sa totalité uniquement lors de la première utilisation du réactif. Par contre, le réglage des compensations qui y est décrit est à refaire avant chaque série d'analyses.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

Pour une première utilisation de ce réactif, le réglage du cytomètre ne peut se faire que sur des sangs dont le phénotype HLA est parfaitement connu. Se procurer les échantillons de sang suivants :

- Un sang total de phénotype HLA-B27⁺ B7⁻.
- Un sang total de phénotype HLA-B27⁺ B7⁺.
- Un sang total de phénotype HLA-B27⁻ B7⁺.
- Un sang total de phénotype HLA-B27⁻ B7⁻.

PREPARATION DES ECHANTILLONS NECESSAIRES AUX REGLAGES

Tubes pour les sangs de typage HLA connu

Préparer pour chacun de ces 4 échantillons un tube test et un tube contrôle en suivant la procédure de marquage du paragraphe : METHODOLOGIE/PROCEDURE.

Tube pour le réglage des compensations

Préparer un tube pour le réglage des compensations en marquant le sang d'un

donneur sain ou le sang de contrôle Immuno-Trol (Réf. 6607077) avec le mélange CD8-FITC/CD4-PE en suivant la procédure du paragraphe : METHODOLOGIE/PROCEDURE, dans laquelle, premièrement, le tube pour le contrôle isotypique est omis et, deuxièmement, le volume d'anticorps utilisé est celui préconisé par le fabricant du mélange pour 100 µL de sang.

REGLAGE DES PHOTOMULTIPLICATEURS

Analyser le tube contrôle du sang HLA-B27⁻ B7⁻ et régler les signaux FITC et PE (amplifiés logarithmiquement) pour que les intensités de fluorescence dans un histogramme biparamétrique FITC versus PE, conditionné sur les lymphocytes, soient dans la première décade comme illustré dans l'histogramme de la figure 1.

Analyser le tube test du sang HLA-B27⁻ B7⁻ et vérifier que l'histogramme obtenu est comparable à celui de la figure 2. Ajuster les quadrants pour que les 98% de la population lymphocytaire soient dans le quadrant 3.

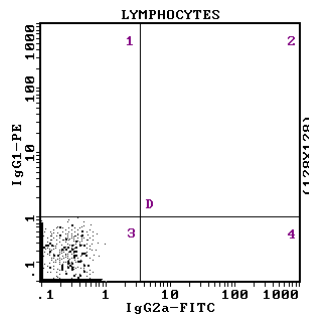


Figure 1 : Tube contrôle du sang HLA-B27⁻ B7⁻

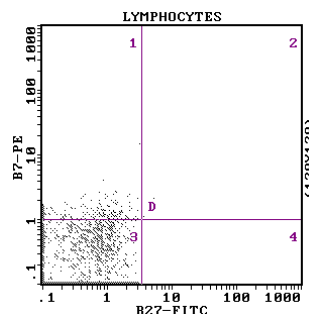


Figure 2 : Tube test du sang HLA-B27⁻ B7⁻

REGLAGE DES COMPENSATIONS

Analyser le tube marqué avec le mélange CD8-FITC/CD4-PE et régler les compensations de fluorescence de telle façon que, dans l'histogramme FITC versus PE, les moyennes des intensités de fluorescence soient identiques suivant l'axe des Y dans les quadrants 3 et 4 et identiques suivant l'axe des X dans les quadrants 1 et 3.

CONTROLE DES SEUILS DE FLUORESCENCE

Ce contrôle s'effectue avec les sangs de typage HLA connu.

Cas de l'échantillon HLA-B27⁺ B7⁻

Analyser le tube contrôle du sang HLA-B27⁺ B7⁻. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 1.

Analyser le tube test du sang HLA-B27⁺ B7⁻. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 3 où tous les lymphocytes se retrouvent dans le quadrant 4.

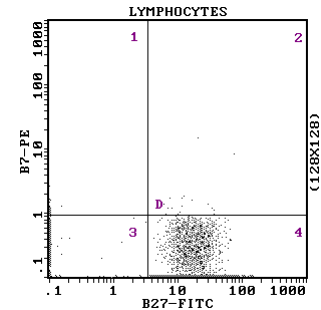


Figure 3 : Tube test du sang HLA-B27⁺ B7⁻

Cas de l'échantillon HLA-B27⁻ B7⁺

Analyser le tube contrôle du sang HLA-B27⁻ B7⁺. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 1.

Analyser le tube test du sang HLA-B27⁻ B7⁺. L'histogramme obtenu peut ressembler à celui de la figure 4.

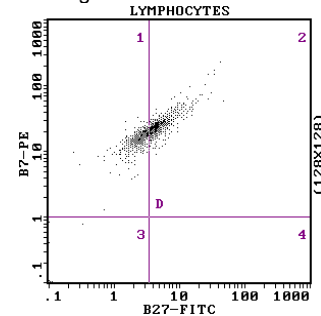


Figure 4 : Tube test du sang HLA-B27⁻ B7⁺

La population lymphocytaire est à cheval entre les quadrants 1 et 2. Cette situation est tout à fait normale, et il ne faut pas chercher à compenser. Elle traduit le fait que l'anticorps monoclonal HLA-ABC-m3 croise avec le phénotype HLA-B7. Une fraction des épitopes HLA-B7 est occupée par l'anticorps HLA-ABC-m3. Une population lymphocytaire totalement contenue dans le quadrant 1 est également possible. Elle correspond au cas où l'anticorps monoclonal HLA-ABC-m3 ne croise pas avec les épitopes HLA-B7.

Cas de l'échantillon HLA-B27⁺ B7⁺

Analyser le tube contrôle du sang HLA-B27⁺ B7⁺. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 1.

Analyser le tube test du sang HLA-B27⁺ B7⁺. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 5.

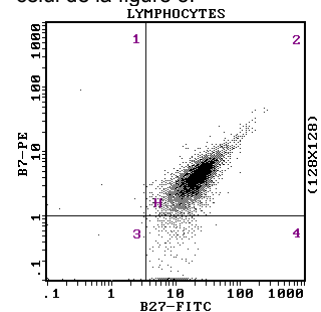


Figure 5 : Tube test du sang HLA-B27⁺ B7⁺

Cas de l'échantillon HLA-B27⁻ B7⁻

Analyser le tube contrôle du sang HLA-B27⁻ B7⁻. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 1.

Analyser le tube test du sang HLA-B27⁻ B7⁻. L'histogramme obtenu doit être comparable à celui de la figure 2.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Toute population lymphocytaire contenue totalement dans le quadrant 3 peut être considérée comme HLA-B27⁻ (et HLA-B7⁻).

Toute population lymphocytaire contenue totalement dans le quadrant 1 peut être considérée comme HLA-B27⁻ (et HLA-B7⁺).

Toute population lymphocytaire contenue totalement dans le quadrant 4 – à condition que les quadrants aient été positionnés non sur un contrôle isotypique mais sur un échantillon HLA-B27⁻ B7⁻ – peut être considérée comme HLA-B27⁺.

Toute population lymphocytaire à cheval entre les quadrants 3 et 4 a une forte probabilité d'être HLA-B27⁺ (et HLA-B7⁻).

Cependant un test de confirmation par microlymphocytotoxicité ou par PCR est indispensable.

Toute population lymphocytaire à cheval entre les quadrants 1 et 2 a une forte probabilité d'être HLA-B27⁻ (et HLA-B7⁺).

Cependant, un test de confirmation par microlymphocytotoxicité ou par PCR est indispensable.

Toute population lymphocytaire contenue dans le quadrant 2 a une forte probabilité d'être HLA-B27⁺ (et HLA-B7⁺).

Cependant, un test de confirmation par microlymphocytotoxicité ou par PCR est indispensable.

PERFORMANCES

Les données de performance sont obtenues suivant la procédure décrite précédemment sur des échantillons de sang âgé de 24 heures collecté auparavant dans des tubes stériles avec du sel d'EDTA comme anticoagulant. L'analyse est réalisée dans les 2 heures qui suivent l'immunomarquage.

SPECIFICITE

La spécificité de l'anticorps monoclonal (AcM) HLA-ABC-m3 vis-à-vis de l'antigène HLA-B27 a été étudiée par Trapani, J.A. et al. (4) et celle de l'AcM BB7.1 par Brodsky, F.M. et al. (5).

LINEARITE

Un test de linéarité de marquage n'a pas de signification biologique car chez un individu soit 100% des cellules sont HLA-B27⁺ soit 100% sont HLA-B27⁻. Par contre, un tel réactif doit démontrer chez les donneurs HLA-B27⁻B7⁻ une moyenne des intensités de fluorescence (MIF) des lymphocytes, tant vis-à-vis de la spécificité HLA-B27 que de la spécificité HLA-B7, très inférieure à celle obtenue chez les donneurs HLA-B27⁺ B7⁺.

Ce que traduisent les rapports MIF+/ MIF-, calculés à partir des moyennes de 12 déterminations de MIF d'un donneur HLA-B27⁺ B7⁺ (MIF+) et d'un donneur HLA-B27⁻ B7⁻ (MIF-), du tableau suivant :

Lymphocytes	Nombre	Moy. (MIF)	CV (%)	Rapport MIF ⁺ / MIF ⁻
HLA-B27 ⁺	12	29,6	2,2	114
HLA-B27 ⁻	12	0,26	2,4	
HLA-B7 ⁺	12	33,9	1,7	168
HLA-B7 ⁻	12	0,20	1,7	

RESULTATS ATTENDUS

Non applicable

REPRODUCTIBILITE INTRA-LABORATOIRE

L'appartenance d'un sujet au groupe de spécificité HLA B27 se fondant sur des mesures d'intensités de fluorescence de chaque lymphocyte analysé et non de pourcentage de lymphocytes marqués, l'étude de reproductibilité intra-laboratoire porte sur la MIF de cette population.

Le même jour et sur le même cytomètre, 12 déterminations de la MIF des lymphocytes d'un donneur HLA-B27⁺ B7⁺ on été effectuées. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Lymphocytes	Nombre	Moy. (MIF)	Ecart-type	CV (%)
HLA-B27	12	29,6	0,65	2,2
HLA-B7	12	33,9	0,56	1,7

LIMITATIONS DE LA TECHNIQUE

1. Les résultats de cytométrie en flux peuvent être erronés si le cytomètre n'est pas parfaitement aligné, les fuites de fluorescence correctement compensées et les régions de conditionnement soigneusement placées.
2. Ce réactif ne doit être ni dilué, ni aliquoté, ni congelé. Ne pas l'utiliser au-delà de la date de péremption indiquée sur le flacon.
3. La phycoérythrine (PE) est sensible à la lumière, toutes les incubations doivent se faire à l'abri de la lumière.
4. Utiliser de préférence une technique de lyse des globules rouges avec lavage car ce réactif n'a pas été optimisé pour les techniques de lyse dites "sans lavage".
5. On obtiendra des résultats précis et reproductibles dans la mesure où les procédures utilisées sont conformes aux instructions des fiches techniques et compatibles avec les bonnes pratiques de laboratoire.
6. Les anticorps conjugués de ce réactif sont calibrés afin d'offrir le meilleur rapport signal spécifique/signal non spécifique. C'est pourquoi il est important de respecter le rapport volume du réactif/volume de l'échantillon pour chaque test.
7. En cas d'hyperleucocytose, diluer le sang dans du PBS de façon à obtenir une valeur située autour de 5×10^9 leucocytes / L.

8. Au cours de certaines pathologies, comme les insuffisances rénales graves ou les hémoglobinopathies, la lyse des globules rouges peut être ralentie, voire incomplète ou impossible. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléées par gradient de densité (par exemple: Ficoll) avant marquage.

9. La mise en évidence d'un phénotype HLA-B27 chez un patient ne signifie pas pour autant que ce dernier soit atteint de spondylarthrite ankylosante. Inversement, seulement 90% des patients atteints sont HLA-B27⁺.

INTERFERENCES EVENTUELLES (REACTIONS CROISEES)

1. L'anticorps monoclonal HLA-ABC-m3 qui reconnaît l'antigène HLA-B27, croise avec l'antigène HLA-B7 (4) et, de manière moins affine, avec les antigènes du CREG HLA-B7.
2. En revanche, l'anticorps monoclonal BB7.1, qui reconnaît l'antigène HLA-B7 croise avec l'antigène HLA-B42 (2, 5).
3. La mise en évidence, par le présent réactif, d'une double positivité apparente HLA-B27⁺ et HLA-B7⁺ peut être le résultat de différentes expressions :
 - l'expression hétérozygote du génotype HLA-B27 / HLA-B7,
 - l'expression hétérozygote du génotype HLA-B7 / HLA-B7 ou,
 - l'expression homozygote du génotype HLA-B7 / HLA-B7.

Un test de confirmation par microlymphocytotoxicité ou PCR doit donc être pratiqué

DIVERS

Voir l'annexe (APPENDIX) pour la bibliographie (REFERENCES).

MARQUES COMMERCIALES

Le logo Beckman Coulter, Flow-Set, IMMUNOTROL, IOTest sont des marques commerciales de Beckman Coulter; le logo Beckman Coulter, IOTest sont enregistrés auprès du USPTO et du SIPO.

FABRIQUE PAR :

IMMUNOTECH SAS

a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Service Client : (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Made in France.

© 2012 Beckman Coulter, Inc.
Tous droits réservés.



APPENDIX TO REF A07739

REFERENCES

1. Ulrich, G., "Utilisation de la cytométrie en flux pour le phénotypage HLAB27 : étude d'une technique de double marquage HLA B7 / HLA B27", 1997, *Allergie et Immunologie*, 1, 29, 11-14.
2. Colombani, J., "HLA : Fonctions immunitaires et applications médicales", 1992, Clé pour M/S. John Libbey Eurotext., Chap 2, 31-37.
3. Lee, T.D., Zhao, T.M., Strothman, R., "First Red Cross histocompatibility workshop", 1990, *The HLA system. A new approach.*, Chap 5, Lee Editor, 107-139.
4. Trapani, J.A., Vaughan, H.A., Sparrow, R.L., Tait, B.D., McKenzie, I.F.C., "Description of a mouse monoclonal anti-HLA-B27 antibody HLA-ABC-m3", 1983, *Hum. Immunol.*, 7, 205-216.
5. Brodsky, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J., Bodmer, W.F., "Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system", 1979, *Immunological Rev.*, 47, 1-61.
6. Trapani, J.A., Vaughan, H.A., Tait, B.D., Mc Kenzie, I.F.C., "Immunoradiometric assay for the rapid detection of HLA-B27", 1988, *Immunol. Cell. Biol.*, 66, 215-219.
7. Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A., Hansen, J.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Petersdorf, E.W., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Stominger, J.L., Svejgaard, A., Terasaki, P.I., "Nomenclature for factors of the HLA System, 1998", 1999, *Human Immunology*, 60, 361-395.
8. Colombani, J., "HLA : Fonctions immunitaires et applications médicales", 1992, Clé pour M/S. John Libbey Eurotext., Chap 3, 39-47.
9. Lee, T.D., "Distribution of HLA antigens : distribution of HLA antigens in north american caucasians, north american blacks and orientals", 1990, *The HLA system, a new approach.*, Chap 6, John Lee Editor, 141-236.
10. Fizet, D., "Identification de l'antigène HLA B27 par cytométrie de flux", 1989, *Ann. Bilo. clin.*, 47, 408-411.
11. Feltkamp, T.E.W., Khan, M.A., Lopez de Castro, J.A., "The pathogenetic role of HLA-B27", 1996, *Immunol. Today*, 1, 17, 5-7.
12. Bodmer, J., "World distribution of HLA alleles and implications for disease", 1996, *Ciba Foundation Symposium*, 197, 233-258.
13. Lopez-Larrea, C., Gonzalez-Roces, S., Alvarez, V., "HLA-B27 structure, function and disease association", 1996, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 8, 296-308.

RESUME

L'antigène HLA B27 est une protéine que l'on retrouve normalement à la surface des globules blancs de certaines personnes. Il existe un lien statistique entre la présence de cet antigène et la spondylarthrite. La spondylarthrite ankylosante (SPA) est un rhumatisme inflammatoire touchant la colonne vertébrale et parfois les articulations périphériques (arthrites) ainsi que l'insertion des tendons. Le diagnostic biologique permet de renforcer le diagnostic clinique et radiologique en faveur d'une SPA.

Actuellement la méthode de référence pour la détection de l'antigène HLA B27 est la biologie moléculaire (PCR en temps réel), examen nécessitant une attestation de consultation.

Nous avons validé une méthode alternative, plus adaptée au fonctionnement du laboratoire d'immunologie de routine. Il s'agit d'une méthode qualitative de portée B utilisant la cytométrie en flux (CMF) avec des réactifs et automates Beckman Coulter. Pour parvenir à notre but, nous nous sommes appuyés sur des documents officiels mais aussi sur des documents mis en place par la cellule qualité du LBM. L'utilisation du guide technique SH GTA 04 publié par le Cofrac nous a aidés à définir les critères de performances à valider et le formulaire SH FORM 43 nous a permis de présenter les données de validation de la méthode. La méthode en CMF alternative a été validée par rapport à la méthode de PCR de référence. Pour cela nous avons comparé les résultats de 194 patients. La technique de CMF s'est avérée sensible, spécifique, juste et fidèle par rapport à la technique de référence de PCR. Les automates de cytométrie en flux Navios utilisés avec les marqueurs Beckman Coulter ont donc été déclarés aptes à l'utilisation en routine au laboratoire pour la détection des l'antigène HLA B27. La méthode de référence reste néanmoins prioritaire si une attestation de consultation est disponible et indispensable pour les prélèvements trouvés ininterprétables (< 5 %) en CMF.