

Université Pierre et Marie Curie -
Sorbonne Universités

MEMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MEDICALE »

**MISE EN PLACE DU PROCESSUS DE VALIDATION DE METHODE
EN IMMUNOHISTOCHIMIE**

**MARQUAGE DU TTF-1
SUR L'AUTOMATE BOND LEICA BIOSYSTEMS**

Département de pathologie des HUPNVS unité Bichat

Tabbech Karim
2015 – 2016

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.

Tabbech Karim

Technicien de laboratoire

Département de Pathologie site Bichat

Du groupe des Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine - APHP

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements

Aux Pr. Anne Couvelard et Pr. Pierre Bedossa, pour m'avoir permis de réaliser ce diplôme au sein de leur équipe, pour la confiance et le temps qu'ils m'ont accordé,

A Guillaume Laurant, cadre du département de Biologie et Pathologie Médicales de l'Institut Gustave Roussy, pour ses précieux conseils,

A Corinne Roelants et Véronique Colmant, pour leur disponibilité et leur écoute,

A toute l'équipe technique et médicale, pour leur disponibilité.

SOMMAIRE

Glossaire.....	6
Introduction	7
1 Présentation du groupe HUPNVS	8
1-1 Le groupe des HUPNVS	8
1-2 Présentation du Département de Pathologie	8
1-3 Démarche qualité en ACP	9
2 Objectifs.....	10
2-1 Les limites de l'étude.....	11
2-2 Impact sur le secteur IHC du site Bichat.....	11
3 Mise en place d'un processus de validation de méthode sur le secteur IHC.....	12
3-1 Roue de Deming étape 1 : Planifier.....	13
3-1-1 L'immunohistochimie.....	13
3-1-2 La méthode de marquage	14
3-1-3 Définir la portée de la validation de méthode.....	14
3-1-4 Périmètre d'étude.....	15
3-1-5 Planning effectif de mise en œuvre de la phase de tests.....	15
3-2 Roue de Deming étape 2 : Faire.....	18
3-2-1 Thyroid Transcription Factor-1 : TTF-1	18
3-2-2 Plan expérimental pour une méthode qualitative en IHC	19
3-2-3 Mise en application du plan expérimental.....	22
3-2-4 Interprétation des résultats.....	23
3-3 Roue de Deming étape 3 : Vérifier.	24
3-3-1 Retour des techniciens et pathologistes	24
3-3-2 Difficultés rencontrées.....	25
3-4 Roue de Deming étape 4 : Agir.	25
3-4-1 Auto critique pour ajustements	25
3-4-2 Déploiement de l'approche de validation de méthode	26
Conclusion	27
Bibliographie	28
Liste des Annexes	30

GLOSSAIRE

COFRAC : COmité Français d'ACcréditation

ACP : Anatomie et Cytologie Pathologiques

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

RBPACP : Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques

HUPNVS : Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine

GH : Groupe Hospitalier

IHC : ImmunoHistoChimie

RAQ : Responsable en Assurance Qualité

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

Ag-Ac : Antigène-Anticorps

CQ : Contrôle Qualité

CQI : Contrôle de Qualité Interne

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

TTF-1 : Thyroid Transcription Factor-1

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

INTRODUCTION

Pour un laboratoire, il est important d'avoir confiance dans la validité des résultats analytiques qui sont rendus aux clients et inversement. La reconnaissance de la compétence des laboratoires est notamment attestée par leurs accréditations effectuées par le Comité français d'accréditation (COFRAC) selon la norme NF EN ISO 15189 **(1)**.

En Anatomie et Cytologie Pathologiques (ACP), la démarche qualité est une composante essentielle au bon fonctionnement du laboratoire. Pour ce faire, l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques (AFAQAP) permet aux pathologistes d'évaluer régulièrement et d'améliorer la qualité de leurs pratiques dans les domaines du diagnostic, des techniques et de l'organisation des laboratoires. Elle assure également la production de référentiels de pratique et de documentations professionnelles. Les Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques (RBPACP) nous permettent d'être dans une démarche qualité **(2)**.

Les méthodes d'analyse réalisées par les pathologistes font appel à différentes techniques complémentaires. D'une part, un examen macroscopique, c'est-à-dire un examen à l'œil nu des prélèvements et pièces opératoires, tous confiés au laboratoire de pathologie. D'autre part, un examen histologique réalisé au microscope, coloration standard, spéciales et l'immunohistochimie (IHC). L'IHC est une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. L'interprétation de l'IHC n'est pas seulement qualitative mais peut être aussi semi-quantitative. La technique a pour objectifs de répondre aux critères de fiabilité, efficacité et reproductibilité. Ainsi, la phase analytique doit être évaluée, validée et en constante amélioration si nous voulons qu'elle contribue à une meilleure prise en charge du patient.

Le Département de Pathologie des Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine (HUPNVS) souhaite réaliser des validations de méthode en IHC. Par conséquent, ce mémoire analysera les besoins du laboratoire afin de mettre en place un processus de validation de méthode sur le secteur technique où nous réalisons les marquages IHC.

1 PRESENTATION DU GROUPE HUPNVS

1-1 Le groupe des HUPNVS

Ce groupe fait partie des 13 groupes de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris. Le groupe HUPNVS, constitué le 1er janvier 2011, regroupe cinq hôpitaux avec une orientation médicale, chirurgicale et obstétricale pour trois d'entre eux (Beaujon, Bichat – Claude-Bernard et Louis-Mourier) et gériatrique pour les deux autres (Adelaïde-Hautval et Bretonneau). Ces hôpitaux couvrent la majeure partie des spécialités médicales et chirurgicales et des modes de prise en charge sur un vaste territoire de santé au nord de Paris. Ils soignent les patients à tous les âges de la vie et offrent des soins complémentaires de proximité, d'expertise et de recours.

Les HUPNVS sont structurés en 11 pôles dont 2 pôles médicotechniques, le pôle biologie, pharmacie, recherche clinique et le pôle Imagerie, Pathologie, Physiologie. Ces deux pôles médicotechniques ont une démarche qualité unique.

1-2 Présentation du Département de Pathologie

L'Anatomie et Cytologie Pathologiques (ACP) est une spécialité médicale transversale qui étudie les modifications morphologiques des organes au cours des processus pathologiques. Le laboratoire d'ACP a pour objectif d'analyser des cellules et des tissus par diverses méthodes, principalement basées sur la morphologie, dans un but diagnostique. Cela permet en outre de fournir des éléments d'appréciation du pronostic des maladies, d'évaluer les résultats des traitements et de mieux comprendre les causes et les mécanismes des maladies. Les résultats des examens anatomo-cyto-pathologiques sont à la base du diagnostic des maladies organiques et conditionnent les orientations thérapeutiques. Les informations fournies sont consignées dans un compte rendu qui déterminera le traitement du patient. C'est un élément important dans le dossier médical. Il est à la base de nombreuses décisions chirurgicales et thérapeutiques. La conservation systématique des archives blocs, lames et des comptes rendus représente une base de données médicale et épidémiologique unique.

L'ACP des HUPNVS est composée de 3 unités fonctionnelles respectivement sur les hôpitaux de Beaujon, Bichat et Louis Mourier. Les unités des hôpitaux de Beaujon et de Bichat étant regroupées en département. Chacune de ces unités est dirigée par un

responsable d'Unité Fonctionnelle. Le département est sous la responsabilité d'un chef de département qui assure la coordination entre les 3 sites. L'encadrement paramédical est coordonné par un cadre supérieur. (**Annexe I : Organigramme du Département de Pathologie unité Bichat**).

Les 3 sites ont uniformisé les procédures techniques comme celles concernant la traçabilité des examens, la congélation des tissus frais, la codification des examens afin de permettre l'amélioration du dossier patient d'Anatomie Pathologique. Ainsi, nous possédons un système de gestion du laboratoire commun aux 3 sites ce qui permet l'interopérabilité des interrogations, la récupération des antériorités et la création d'un dossier patient unique inter-sites.

Les spécialités médicales exercées font l'objet d'une prise en charge unifiée et complémentaire sans rompre l'équilibre entre activités et moyens en tenant compte des expertises médicales présentes sur chaque site. La prise en charge de la fœtopathologie est assurée sur le Groupe Hospitalier (GH). Les techniques moléculaires (FISH, hybridation in situ) : activités quantitativement limitées mais relativement coûteuses sont regroupées sur le site de Bichat. La télépathologie via le développement des lames virtuelles permet l'accès dans un site aux images histologiques saisies dans l'autre site. Elle permet une prise en charge à distance sans transfert de prélèvement ni retard occasionné par le transport. La recherche : il existe des collaborations multiples entre les services d'anatomie pathologique de Beaujon et de Bichat et les équipes de recherche des 2 sites. Ceci est facilité en particulier par l'existence de structures de recherche multisites telles que le CRB3 (Centre de Recherche Biomédical Bichat Beaujon), l'Institut fédératif de recherche Claude Bernard et les réseaux thématiques qui se sont créés (réseau protéomique, par exemple). Les tissuthèques : activité certifiée sur le site de Beaujon selon la norme NF S96900.

1-3 Démarche qualité en ACP

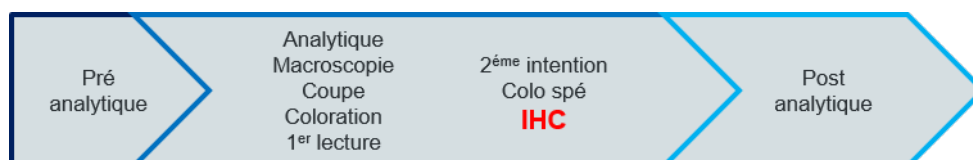
Le Secteur Biologie est inscrit dans une démarche qualité selon le référentiel international NF EN ISO 15189 suivant les exigences réglementaires. L'Anatomie pathologie a fait le choix de suivre cette démarche au côté de la biologie. La norme NF EN ISO 15189 s'applique à l'Anatomie et cytologie pathologiques dans sa partie technique et managériale. L'objectif de cette démarche est de garantir la fiabilité technique des examens ACP dont dépend le diagnostic. Le RBPACP et le Guide technique d'accréditation en anatomie et cytologie pathologiques SH GTA 03 proposent des recommandations résultant de l'application de cette norme NF EN ISO 15189 aux structures ACP **(1 - 5)**.

Un ingénieur Qualité multi-sites est à l'interface des deux pôles médico-techniques. Un logiciel institutionnel appelé «Kalilab» est accessible à l'ensemble du personnel par l'intranet. C'est un outil de communication et de gestion qui regroupe l'ensemble des modules nécessaires à la mise en œuvre du système de management de la qualité, notamment : la gestion documentaire commune aux deux pôles, le suivi du maintien des compétences, le suivi des équipements. D'autres modules sont accessibles et sont progressivement intégrés dans la démarche. Au sein de chaque UF, sont nommés des responsables assurance qualité (RAQ) qui ont pour mission de faire appliquer la politique qualité du pôle en s'appuyant sur la cellule qualité de l'UF. (**Annexe II : Organisation qualité des laboratoires des HUNVS**)

2 OBJECTIFS

La démarche qualité du département de pathologie a permis la mise en place d'un suivi mené régulièrement sur les performances techniques des systèmes et permettant d'offrir des résultats optimaux. (**Annexe III : Approche processus du Département de Pathologie**). Afin d'améliorer notre démarche qualité, nous souhaitons démontrer l'existence, la constance et l'amélioration de notre savoir-faire au sein de notre département. L'élaboration de dossiers de validation de méthode va nous permettre de prouver que les techniques fournissent des résultats performants et ainsi valider l'ensemble des spécifications de la méthode. Nous avons choisi comme domaine d'application, le secteur technique le plus exigeant du laboratoire, le secteur d'IHC. C'est une technique qui intervient en fin de processus analytique. La technique IHC peut être utilisée dans un but diagnostic, pronostic ou prédictif de réponse thérapeutique.

Position du secteur IHC dans le processus réalisation :



Le secteur IHC est une composante du processus analytique situé dans la catégorie des secondes intentions puisqu'une lecture de la lame colorée par la coloration standard est nécessaire avant toutes analyses plus approfondies. Cependant, la position du secteur IHC diffère lorsqu'on parle validation de méthode. En effet, les étapes en amont sont considérées comme du pré analytique.

Position du secteur IHC dans le processus réalisation dans le contexte de la validation de méthode :



2-1 Les limites de l'étude

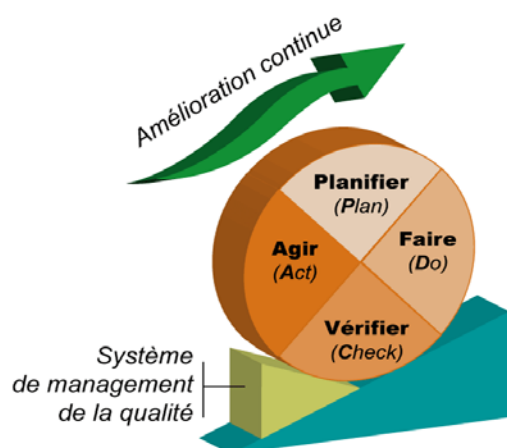
La principale limite de cette étude est le temps. La gestion du temps comme ressource précieuse est indispensable. De ce fait, je me suis concentré uniquement sur le secteur IHC. La préparation, réalisation, vérification et les ajustements seront des étapes essentielles et fortement chronophages. D'où l'intérêt de bien anticiper les besoins afin de garantir une mise en œuvre efficace de la démarche qualité. La structure multi sites est aussi un aspect limitant puisqu'il faut harmoniser la démarche sur les deux sites. De plus, il faut tenir compte de l'utilisation d'automates différents sur les deux sites. Nous disposons d'un panel d'Ac conséquent avec des changements de fournisseurs fréquents liés aux différents marchés établi avec l'AP-HP. Le coût à la lame d'une technique en IHC est une limite supplémentaire dans cette étude. Ainsi que l'importance majeure de la phase préanalytique pouvant impacté la méthode d'IHC.

2-2 Impact sur le secteur IHC du site Bichat

Nous avons mené une approche transversale afin d'adapter, clarifier et harmoniser la procédure de validation de méthode pour l'IHC. De ce fait, il a fallu mettre en conformité le processus analytique du secteur IHC. En s'appuyant sur le RBACP, ainsi que les recommandations du COFRAC notamment avec le SH GTA 03 §5.5 et §5.6. Les choix et modifications prises sur le secteur doivent être applicables et réalisables aussi sur l'autre site. **(2, 5)**

3 MISE EN PLACE D'UN PROCESSUS DE VALIDATION DE METHODE SUR LE SECTEUR IHC

En accord avec mon tuteur et les possibilités du service, nous avons défini un échéancier pour la réalisation de mon sujet, en se basant sur la méthode de gestion de la qualité dite PDCA (Plan-Do-Check-Act), illustré par la Roue de Deming :



Février – Mars : Roue de Deming étape 1 : Planifier

Groupe de travail : référents du secteur, cadres et tuteur

Planifier nos actions prioritaires

Rédiger les documents manquants pour la validation de méthode

Sélectionner le test et mettre au point un plan expérimental

Avril – Juin : Roue de Deming étape 2 : Faire

Informers les pathologistes et les techniciens du secteur

Mettre en œuvre la phase de test

Recueillir les avis des pathologistes et des techniciens

Juillet – Aout : Roue de Deming étape 3 : Vérifier

Evaluer et interpréter les résultats, si correspondent bien à nos attentes

Septembre : Roue de Deming étape 4 : Agir

Corriger la méthode si besoin

Réajuster le plan expérimental

3-1 Roue de Deming étape 1 : Planifier.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une auto évaluation des ressources nécessaires pour la validation de méthode sur le secteur IHC, afin de connaître la viabilité de notre sujet. Sur le secteur IHC, nous disposons d'une base documentaire, une procédure commune aux deux sites, un mode opératoire et des enregistrements liés aux secteurs IHC. Une procédure et un mode opératoire sur la validation de méthode existe au niveau du GH. De plus, nous avons un groupe qualité sur l'IHC composé d'un pathologiste référent, le Dr. M. Hourseau et de deux référents techniques A. El Hilali et moi-même. Le Dr. M. Hourseau et moi-même avons réalisé une recherche documentaire sur l'IHC et nous avons participé à une formation sur la validation de méthode sur l'IHC, formation proposée par l'AFAQAP.

En revanche, nous ne disposons pas de document sur le Contrôle Qualité (CQ) sur le secteur IHC. Le mode opératoire était trop général, il manquait des précisions quant aux conditions de réalisation des mises au point d'Ac. Afin de nous orienter au mieux dans nos choix à venir, nous avons souhaité avoir recours à un référent extérieur, Mr G. Laurant, cadre de département de Biologie et Pathologie Médicales de l'Institut Gustave Roussy. De plus, Mr G. Laurant étant un auditeur COFRAC, il a été en mesure de répondre à mes nombreuses questions quant à la mise en place d'une démarche qualité viable sur la validation de méthode sur le secteur IHC.

3-1-1 L'immunohistochimie.

La technique d'IHC, débute par l'obtention d'une lame dite blanche, comportant une coupe du prélèvement d'intérêt enrobé de paraffine, d'une épaisseur de 3 µm et réalisée au microtome. Les lames blanches sont identifiées par des étiquettes à code barre, puis séchées et disposées dans un automate d'une capacité de 30 lames, puisqu'il contient 3 racks de 10 lames. Nous disposons de 3 automates de ce type, 1 Bond-III et 2 Bond-Max de Leica Biosystems.

Concernant, l'IHC sur Bichat et selon notre panel d'Ac actuel nous disposons d'un protocole standard d'une durée de 3h30 et d'un protocole spécifique de 4h pour 4/110 des Ac du panel disponible sur le site. Le cycle de traitement débute par une phase de déparaffinage commune à tous les protocoles de marquage. Ensuite, la phase de restauration de site antigénique est une étape facultative qui dépend de l'Ac utilisé. Elle est permise par l'utilisation d'un tampon de restauration antigénique à pH6 ou pH9 et à forte

température 100°C. Elle est suivie d'un blocage des peroxydases endogènes, de la dépose de l'Ac, d'un système d'amplification basé sur la méthode sandwich. Enfin, la peroxydase étant reliée au polymère, le système de révélation est basé sur la dégradation de la 3,3'-diaminobenzidine en un élément chromogène marron. Une contre coloration par l'hématoxyline permet d'avoir un visuel sur l'architecture tissulaire. Les lames sont récupérées en fin de cycle pour les déshydrater et les monter avec un film protecteur afin de pouvoir la conserver. Ces lames marquées sont rendues aux pathologistes en vue de leur interprétation via une observation au microscope.

3-1-2 La méthode de marquage

Pour le secteur IHC, le processus analytique commence à partir de la lame blanche séchée. La mise au point de l'Ac assure la vérification de la réaction (gamme de dilutions de l'Ac et gamme de pH pour la restauration des sites antigéniques). L'interprétation du résultat est réalisée par le pathologiste (positif / négatif ou score). Il est à même d'évaluer plusieurs critères afin de pouvoir interpréter le marquage (épaisseur de la coupe, qualité de la coupe, conservation des éléments morphologiques, qualité du marquage...).

Pour les techniques IHC avec témoins internes, une évaluation de la qualité du marquage est effectuée au cas par cas sur chaque lame par le pathologiste. (Ex : les marqueurs de différenciations tel le CD117). Pour les techniques IHC n'ayant pas de témoin interne, une coupe d'un bloc témoin peut être rajoutée sur la lame afin de valider la technique de marquage. Dans le cas de méthodes IHC dont les résultats sont exprimés sous forme de score, au moins un élément de contrôle est à choisir dans la zone de seuil de décision clinique (ex : HER2).

3-1-3 Définir la portée de la validation de méthode

L'automate a un système fermé, dans le sens où nous avons l'obligation d'utiliser les réactifs du fournisseur. Ce dernier nous laisse le choix du marqueur, ainsi que certains paramètres de la technique qui peuvent être modifiés pour se conformer aux exigences de la fiche technique de l'Ac. Tous les réactifs de l'automate sont marqués CE.

Selon les fiches techniques de nos Ac, dans notre panel actuel, certains ne sont pas marqués CE. Nous sommes dans l'obligation de les utiliser, notamment pour ne pas entrainer de perte de chance pour le patient dans l'établissement du diagnostic ou pour le

théranostique. Les fiches techniques des Ac définissent les conditions de démasquage, la durée d'incubation, la dilution de l'Ac et parfois le système de révélation à utiliser pour conserver le marquage CE. Un travail est en cours par les fournisseurs pour réécrire les fiches afin de les assouplir un peu plus. En sachant, que les conditions de marquage définies dans ces fiches sont pour la majorité réalisées par des techniques manuelles.

La validation de méthode en ACP n'est pas exactement applicable selon les mêmes règles que pour la Biologie. En effet, le SH GTA 03 §5.5.1.4 insiste bien sur la maîtrise de l'incertitude de mesure et les structures d'ACP harmonisent au mieux leurs pratiques grâce au RBPACP(5). Cependant concernant l'IHC, la technique est tellement sensible aux influences du pré analytique (10 – 16), que cela rend complexe la mise en application de la norme. Pour ce faire, nous avons adopté une approche transversale afin de répondre au mieux aux exigences de la norme. Donc, nous traiterons l'ensemble des marquages qualitatifs présents dans notre panel d'Ac de la même façon.

3-1-4 Périmètre d'étude

En raison du court délai pour la réalisation de cette approche, je me suis limité uniquement à ce qui concerne le secteur IHC. Les secteurs en amont ne devant pas être affectés pour le moment, nous avons pris comme marqueur test un Ac fortement utilisé dans le service et ne nécessitant pas de témoin externe.

3-1-5 Planning effectif de mise en œuvre de la phase de tests

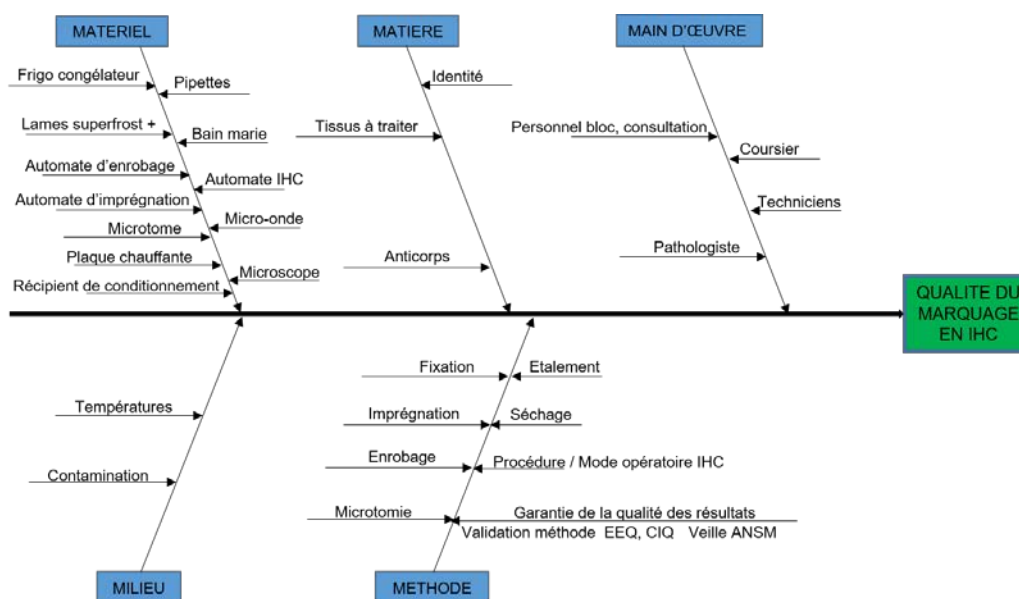
Faisant suite à ma prise de contact avec mon tuteur, nous avons défini une date pour organiser une revue documentaire du secteur IHC, en février. Au cours de cette revue, il m'a confirmé que nos documents étaient trop généraux et avec un manque de précision sur la méthodologie du contrôle qualité.

Donc, il m'a fallu créer un document CQ sur le secteur IHC afin de définir exactement notre stratégie de maîtrise des risques liés à cette activité à l'aide des documents présents sur le GH, le SH GTA 03 §5.6 et le SH GTA 06 (5, 8). J'ai également dû apporter des ajouts sur le mode opératoire du secteur IHC afin d'y développer la partie mise au point d'un Ac, validation de méthode et CQ (Annexes IV, V et VI). Les dossiers de qualification du personnel ont dû être revus afin d'intégrer les données concernant la validation de méthode. L'annexe 2 et 7.1 du RBPACP et le SH GTA 03 (§5.5 et §5.6) sont des documents

supports quant à l'amélioration de la qualité sur notre secteur. Ainsi, nos documents reprennent ces éléments afin d'en assurer la mise en application dans les meilleures conditions et selon les exigences du laboratoire. **(2, 5)**.

En mars – avril 2016, avec le groupe qualité et l'aide de mon tuteur nous avons formalisé la mise en place de ces modifications, afin de permettre la réalisation d'une formation des personnels médicaux et techniques et d'une période de tests pour la gestion du CQ.

En parallèle de cette phase de tests, nous avons identifié les grandeurs d'influence pour le secteur IHC via un diagramme des 5M. Le diagramme des 5M peut être utilisé pour identifier les principaux facteurs d'incertitude susceptibles d'influencer significativement le résultat, y compris ceux dont la quantification se révèle difficile, voire impossible. Il s'agit d'un outil d'aide à l'analyse du processus de mesure qui permet d'examiner le processus à l'aide de 5 éléments (Moyens, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matière) : **Identification intellectuelle des grandeurs d'influence.**



Celui-ci nous a servi de support pour l'élaboration d'un **tableau de maîtrise des risques**. Cette approche n'exclut pas la réalisation d'une étude de la bibliographie sur les exigences retenues. Elle est réalisée par le pathologiste et au cours des formations dans le domaine. Une fois ce travail accompli, j'ai pu élaborer une ébauche de plan expérimental pour la validation de méthode.

Tableau de maîtrise des risques

	Type de risque	Maîtrise du risque
Matière	Identité	Identification univoque des prélèvements
	Prélèvement de l'échantillon	Orientation des pièces opératoires, échantillonnage macroscopique adéquat, contrôle visuel de la fixation... Procédure secteur macroscopie Mode opératoire secteur macroscopie
	Anticorps (choix des clones, dilution, enregistrement des n° de lots,...) température de solution de démasquage des Ag et pH du tampon (IHC), volume de dilution des Ac (IHC)	Suivi de changement de lot, péremption, ... Procédure secteur IHC Mode opératoire secteur IHC
Main d'œuvre	Personnel blocs, consultation, coursiers	Formation, diffusion des instructions de prélèvement, délais de l'acheminement
	Techniciens de laboratoires et Médecins Pathologistes	Formation, qualification et maintien des compétences
Matériel	Récipient de conditionnement (pots, flacons, fixateur)	Contrôle visuel du volume de formol tamponné à 4%. Dimensionnement suffisant
	Automates d'imprégnation Automates d'enrobage Automates IHC	L'activité est sécurisée si panne ou maintenance Qualification selon les préconisations du constructeur et les exigences de la structure ACP Contrat de maintenance Maintenances internes Cahier de vie (KALILAB)
	Frigo-congélateur, Bain marie, Plaque chauffante, Micro-onde, Microscope	Maintenance
	Lames superfrost +	Bonne adhérence de la coupe sur la lame
	Microtome Pipettes	Maintenance, calibration régulière, contrôle
	Informatique / SGL	Suivi et vérification de l'actualisation des versions. Sauvegardes réalisées Qualification du SG

	Type de risque	Maîtrise du risque
Méthode	Méthode de fixation, d'imprégnation et d'enrobage	Contrôle du délai minimum de 24h de fixation par le formol tamponné à 4% Procédure secteur macroscopie et routine
	Microtomie, Etalement, Séchage	Procédure secteur routine (coupe d'épaisseur de 3µm, en bain marie d'eau distillée)
	Procédure IHC Mode opératoire IHC Gestion des contrôles qualité en IHC	Mode opératoire connu et appliqué Fiche décrivant les impératifs à respecter (base documentaire) Respect des préconisations analytiques du fournisseur (veille ANSM)
Milieu	Température de la paraffine, du bain marie, de la plaque chauffante	La température est définie pour chacun d'eux
	Conditions de conservation (échantillons et réactifs)	Suivi température des enceintes réfrigérées / cartographie
	Absence de contamination lors des manipulations	Salles dédiées, nettoyage de la zone de travail

En mai, le groupe qualité du secteur IHC, la responsable d'unité Pr. A. Couvelard et l'encadrement Mme C. Roelants et Mme V. Colmant ont validé le choix du marqueur test et le plan expérimental pour la validation de méthode élaborée avec l'accord de mon tuteur.

En juin, les conditions étant réunies, la phase de tests sur la validation de méthode du marqueur test a pu être initiée.

En juillet, un bilan sur la démarche qualité en IHC et la validation de méthode a été réalisé afin de clôturer le sujet de mon étude.

3-2 Roue de Deming étape 2 : Faire.

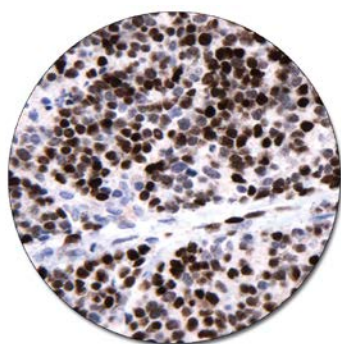
3-2-1 Thyroid Transcription Factor-1 : TTF-1

Afin de procéder au choix du marqueur, nous avons défini les critères suivant. Il nous faut prendre un marqueur déjà en utilisation, avec un nombre de lames mensuel élevé et présentant un marquage qualitatif avec un témoin interne. Notre choix s'est donc porté sur l'Ac monoclonal de souris Anti-TTF-1, Clone 8G7G3/1, code M3575.

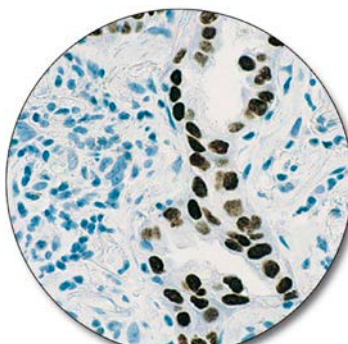
L'Ac anti-TTF-1 est conçu à l'intention des laboratoires qualifiés afin de détecter de manière qualitative, par microscopie optique, la présence d'antigènes associés dans des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine en utilisant des techniques d'analyses IHC. Le marquage est nucléaire.

L'Ac anti-TTF-1 est essentiellement utilisé

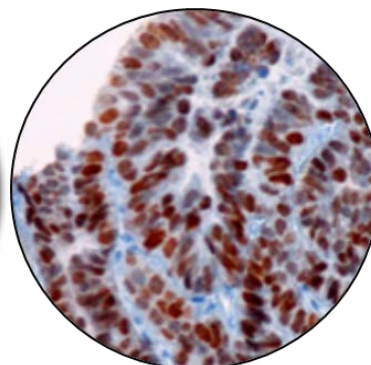
- i) dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules pour différencier les adénocarcinomes (TTF-1+ dans environ 75% des cas) des carcinomes épidermoïdes (TTF-1-)
- ii) pour orienter vers l'origine primitive pulmonaire (TTF-1+ / thyroglobuline -) ou thyroïdienne (TTF-1+ / thyroglobuline +) d'une métastase d'adénocarcinome
- iii) pour visualiser l'architecture alvéolaire sous-jacente d'un poumon pathologique.
- iv) Les carcinomes neuroendocrines à petites cellules sont le plus souvent TTF-1+, y compris en localisation extra-pulmonaire.



Carcinome à petite cellule



Thyroïde



Adénocarcinome pulmonaire

3-2-2 Plan expérimental pour une méthode qualitative en IHC

La réaction Ag-Ac se traduisant par un marquage coloré observé au microscope optique, la méthode de marquage est automatisée et qualitative. Nous n'avons aucune restriction quant à la dilution et au protocole de marquage conformément aux indications fournies par la fiche technique de l'Ac **(11)**.

« Ces informations ne sont délivrées qu'à titre indicatif, les dilutions optimales doivent être déterminées par chaque laboratoire. »

« Procédure d'immunomarquage

Suivre la procédure pour le système de détection choisi. »

Nous utilisons le kit de révélation fourni par Leica Biosystems, le kit Bond™ Polymer Refine Detection. Marqué CE. La dilution optimale de l'Ac a été définie au 1/400. La restauration des sites antigéniques est faite en présence du tampon pH9 (ER2 Leica Biosystems) durant 30 min et le protocole de marquage est le « Standard ». En conclusion, nous sommes dans une vérification de méthode qualitative de portée de type A.

Les paramètres à tester lors de la 1^{ère} étape de la validation d'une méthode qualitative sont déterminés par le COFRAC (cf. tableau ci-dessous). Leurs valeurs doivent être déterminées par la bibliographie et vérifiées ou non sur site selon la portée de la méthode et le paramètre (6, 7, 9).

Tableau des paramètres à vérifier selon la portée d'après le SH GTA 04 (6) :

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir ⁹ , EBMD) et analyse des discordances ¹⁰	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)	Bibliographie	/	Essai	/
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	/	Bibliographie	/	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	/	Bibliographie	/	Essai
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹¹ de la méthode ou du système analytique.				

Tableau effectif des paramètres à vérifier :

Critères à évaluer	Vérification de la méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai
Justesse/Exactitude (approche)	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Maîtrise des risques
Comparaison	Essai
Interférences	Fiche technique de l'Ac TTF-1 (11) Manuelle d'utilisation des automates (10) Maîtrise des risques Bibliographie
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	
Robustesse	
Stabilité réactifs	
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	
Limite de détection	
Spécificité/Sensibilité analytique	

Fidélité :

1- répétabilité

Type de tissu : Poumon Sain : bloc témoin TTF-1+.

Dans une même série, 10 lames identiques sont traitées en même temps et dans les mêmes conditions. Elles doivent présenter toutes le même marquage, de même intensité sans différences.

2- fidélité intermédiaire :

Type de tissus : Poumon, Thyroïde, Ganglion : bloc patient.

Le changement de technicien au poste et le changement de lot de kit de détection est plus probable que celui de l'Ac, car la consommation mensuelle est de 25µL d'Ac pur. Nous avons évalué la variabilité inter opérateur sur une période d'1 mois, ce qui représente en moyenne 30 lames, en fonction de la consommation.

Justesse/Exactitude

Les critères sont définis par la fiche technique et les données de mise au point de l'Ac **(11)**. A l'aide d'une gamme de dilutions de l'Ac et des conditions de prétraitement différentes (changement pH et durée), nous avons pu déterminer les conditions optimales d'utilisation. Ces tests ont été effectués sur un bloc témoin positif sélectionné par le pathologiste. Il s'agit dans notre cas de données antérieures qui ont été déterminées lors de la mise en route de l'Ac et confirmées lors de la mise en service de l'automate Bond-III (Leica Biosystems), le 17/08/2015.

Comparaison

Type de tissu : Poumon Sain : bloc témoin TTF-1+.

La comparaison entre automates est un essai que nous avons dû limiter afin de ne pas avoir un impact trop important sur l'activité journalière. De ce fait, nous disposons une lame par rack par automate, soit 9 lames au total qui doivent présenter un marquage homogène entre elles.

Interférences, Contaminations, Robustesse, Stabilité des réactifs

L'automate Bond-Max et Bond-III préviennent le risque de contamination entre échantillons. Un suivi des dates de péremption est réalisé. Nous utilisons des réactifs suivant les recommandations des fournisseurs. Notre maîtrise des risques répond à ces critères et est basée sur les documents bibliographiques suivants **(1, 2, 10 – 16)**.

Intervalle de référence, Limite de détection, Spécificité/Sensibilité analytique

Nous utilisons un Ac monoclonal spécifique au marqueur TTF-1 dans des conditions respectant les notices des fournisseurs. L'évaluation de la spécificité et de la sensibilité est à réaliser par l'étude des CQI sur une année. Dans notre cas, le marquage TTF-1 s'appuie aussi sur les contrôles internes et parfois externes garantissant un suivi technique continu. La non-déclaration de dysfonctionnement quant au marquage TTF-1, nous permet de conclure quant à la conformité du paramètre étudié. Sans omettre de réaliser un suivi des informations de réactovigilance. **(17 - 21)**

3-2-3 Mise en application du plan expérimental

Concernant la **justesse et l'exactitude**, nous avons repris les résultats obtenus lors de la mise au point de l'Ac et de sa vérification effectuée lors de l'arrivée du nouvel automate le Bond-III, le 17/08/2015.

Prétraitement : tampon pH9 (ER2 Leica) durant 30 min
--

Dilution de l'Ac : 1/400

Les essais de **répétabilité** et de **comparaison** entre automates ont été réalisés le 10/06/2016 selon les modalités définies précédemment et en accord avec les critères de qualification autorisant à effectuer ces tests.

Les 10 lames présentes sur le même rack ont un marquage net et homogène entre elles. Comme sur la photo ci-dessous

Les 9 lames ne présentent aucune variation de marquage entre les 3 racks du même automate et entre automates. Elles sont identiques aux lames du test précédent.



La **fidélité intermédiaire** a été étudiée sur la période du 06/06/2016 au 01/07/2016. Au cours de cette période, 5 techniciens se sont succédés sur le secteur et aucune déclaration de dysfonctionnement n'a été enregistrée.

3-2-4 Interprétation des résultats

Le 13/06/2016, les référents du secteur IHC et le pathologiste référent de l'Ac ont pu lire les lames et les interpréter de la façon suivante.

D'une part, nous avons repris les données de mise au point de l'Ac. Le marquage réalisé depuis lors n'a pas présenté de problème et reste donc à ce jour toujours valide sous ces conditions. Un prétraitement : tampon pH9 (ER2 Leica) durant 30 min et une dilution de l'Ac au 1/400 nous garantissent une justesse et une exactitude conformes aux exigences du laboratoire.

Ensuite, l'essai de **répétabilité** et la **comparaison** entre automates ont montré les mêmes marquages sur l'ensemble des lames traitées. Ce qui nous permet d'affirmer que les marquages réalisés sur l'ensemble des automates sont homogènes et conformes aux exigences du laboratoire.

Enfin, l'étude de la fidélité intermédiaire a présenté les résultats escomptés. En effet, aucune déclaration de dysfonctionnement n'a été réalisée à l'encontre du marquage TTF-1 sur la période étudiée. Ainsi, les 65 lames traitées sur cette période, par 5 techniciens différents, ont un marquage conforme aux exigences définies par le service.

En conclusion l'ensemble des critères étudiés par des essais et par l'étude bibliographique, nous permet de rédiger le rapport sur la validation de méthode du marquage TTF-1 et de valider la technique de marquage TTF-1 réalisée sur le site Bichat.

3-3 Roue de Deming étape 3 : Vérifier.

3-3-1 Retour des techniciens et pathologistes

Tout d'abord le choix du marqueur impacte non seulement le secteur IHC mais aussi le secteur de coupe. En effet, si le marqueur nécessite un témoin externe ou bien si le contexte tissulaire l'impose, le secteur de coupe devra mettre un témoin sur la lame test. Une liste des marqueurs nécessitant un témoin externe a donc été mise en place et est affichée dans le secteur de coupe. En plus, les pathologistes ont la possibilité de demander l'ajout d'un témoin sur leur lame test et elle s'affiche sur les listes de travail, afin que le secteur de coupe puisse traiter la demande selon les conditions définies par le pathologiste. Cette double approche nous permet de limiter le nombre de marqueur nécessitant un témoin externe et de laisser à l'appréciation du pathologiste l'assurance d'avoir un témoin suivant le contexte tissulaire, sans surcharger le secteur de coupe. Dans le cas de TTF-1, si le marquage doit être réalisé sur un ganglion, qui est supposé métastatique, l'ajout d'un témoin externe permettra au médecin de ne pas rendre un faux négatif.

En outre, les dossiers de qualification ont été modifiés afin d'intégrer, dans les critères, la validation de méthode.

Enfin, le besoin d'améliorer l'archivage des lames de mise au point, de changement de lot, de comparaison d'automates et de validation de méthode s'est fait ressentir par les techniciens et pathologistes. Dans le but d'être ordonné et de pouvoir ressortir les lames rapidement, un rangement par ordre alphabétique en fonction du nom de l'Ac a été privilégié.

3-3-2 Difficultés rencontrées

Les changements de pratiques technique et médicale, dont notamment le fait de prendre la responsabilité de valider la conformité d'un marquage IHC par le pathologiste référent furent difficile à mettre en place. Ce point de blocage fut levé par la répartition du panel d'Ac par différents pathologistes. Ainsi, ceux qui étaient amenés à utiliser le plus souvent un Ac se trouvent en charge du dossier de validation de méthode et de son suivi. Le dysfonctionnement d'un automate avant le lancement du plan expérimental nous a permis de justifier plus facilement l'intérêt d'avoir un meilleur contrôle de notre pratique.

La principale difficulté rencontrée au cours de la réalisation de ce sujet est la gestion du temps consacré par les acteurs impliqués dans la démarche qualité au laboratoire. Afin de surmonter cette principale difficulté, et dans le but de déterminer un plan expérimental qui correspond aux attentes du laboratoire mais aussi aux exigences de la norme, il m'a fallu beaucoup communiquer avec le groupe qualité du secteur IHC. Notre communication aux pathologistes et aussi à l'équipe technique a été faite pour fixer l'objectif d'amélioration de la qualité sur un secteur fortement sensible. Une fois l'information diffusée, les réticences se sont estompées et l'objectif principal a pu être atteint. Le temps qui est accordé par les pathologistes reste toutefois limité, mais ils sont quand même désireux de faire avancer le projet de validation de méthode sur le secteur IHC. L'intégration du langage normatif par le personnel dans son activité quotidienne n'est pas totalement acquise au sein du Département de Pathologie.

3-4 Roue de Deming étape 4 : Agir.

3-4-1 Auto critique pour ajustements

La rédaction du document sur le CQ, nous a permis d'aborder le problème des EEQ réalisé par l'AFAQAP. D'une part, la liste des EEQ possibles en IHC par l'AFAQAP n'est pas assez exhaustive. D'autre part, le délai de retour de résultat n'est pas fixe et souvent supérieur à 1 an. De ce fait, la mise en place d'AAQ par NordiCQ ou UK NEQAS est évaluée au sein du Département de Pathologie.

Afin de poursuivre plus facilement notre démarche, nous avons donc mis en place, comme indiqué ci-dessus, une répartition des Ac par pathologiste (**Annexe VII : Liste des témoins**). Cette approche nous permet d'établir avec chaque pathologiste un échéancier pour la validation de méthode, ainsi qu'une amélioration de notre gestion des témoins. Une

préparation des dossiers en amont comportant les caractéristiques techniques pourrait être réalisée. Cette répartition de la charge de travail et de responsabilité associée à une meilleure communication et traçabilité des dysfonctionnements assure l'efficacité du système de contrôle qualité et de validation de méthode mis en place au sein du laboratoire.

De plus, une fiche technique pour la validation de méthode qualitative en IHC comportant le détail sur l'identification des lames et comment les répartir sur les automates a aussi été mise en place afin de s'assurer du respect des bases établies (**Annexe VIII : Fiche technique : Validation de méthode qualitative en IHC**). Et, un enregistrement comportant les dates et acteurs concernés lors de la réalisation de la validation de méthode a été élaboré, afin de s'assurer d'une bonne traçabilité des événements. (**Annexe IX : Plan d'expérience Validation de méthode qualitative en IHC portée A**). Un rapport de suivi de maîtrise par l'analyse des CQI, des déclarations de dysfonctionnements et d'EEQ annuel est à réaliser au sein du Département pour chaque marquage d'Ac validé.

3-4-2 Déploiement de l'approche de validation de méthode

L'adoption de ces nouvelles pratiques par les pathologistes et les techniciens leur a permis d'améliorer leurs interactions et d'être impliqués dans la démarche qualité du laboratoire. De ce fait, nous allons poursuivre cette approche pour les Ac actuellement utilisés pour remettre à niveau la technique en fonction des exigences du laboratoire. Par conséquent, un élargissement de la liste de coupe des témoins externes est à prévoir et doit s'étaler dans le temps. Il en sera de même pour les futurs Ac qui seront mis au point.

Cependant, une réunion préalable du groupe qualité du secteur IHC du Département est nécessaire afin d'harmoniser nos pratiques et d'étendre l'approche à l'ensemble du Département sur les 2 sites Beaujon et Bichat. Notamment, lors de la mise en place d'une modification de la liste des témoins externes à mettre en route sur l'ensemble du Département de Pathologie.

CONCLUSION

Au cours de cette année, nous avons pu définir et mettre en œuvre les modalités de maîtrise des risques liés à nos pratiques techniques sur le secteur IHC. Cela étant permis grâce à la révision de notre documentation existante et à la création de documents liés au CQ et à la validation de méthode. Nous avons su identifier les paramètres de performances à retenir pour les méthodes de marquage qualitatif. Et, nous avons géré l'incertitude sur les résultats fournis par le secteur IHC. Bien que ce travail ne soit qu'une étape dans la démarche qualité globale du Département de Pathologie, ce travail a permis d'approfondir notre réflexion sur nos pratiques et nous a conforté dans notre volonté de poursuivre notre démarche qualité.

La mise en place du processus support de validation de méthode en IHC au sein du Département de Pathologie, nous a permis d'optimiser notre démarche globale d'amélioration continue de la qualité. Nous nous devons de continuer et de poursuivre en ce sens afin d'en démontrer la pleine maîtrise. Au préalable, nous allons établir une liste des axes d'amélioration à travailler sur les autres secteurs en amont de la technique d'IHC, afin de maîtriser le mieux possible toutes les phases assimilées à du préanalytique du point de vue de l'IHC. Un autre facteur limitant dans cette étude devra faire l'objet d'un travail par le groupe qualité, il s'agit d'améliorer notre gestion du stock afin de diminuer le coût à la lame d'une technique IHC. La création des dossiers de validation de méthode dans « Kalilab », ainsi que l'évaluation du système mis en place par la cellule qualité nous permettra de renforcer davantage les récents acquis sur le secteur IHC. Étendre la méthode d'approche pour les autres secteurs de portée d'accréditation sera un jalon supplémentaire pour renforcer notre maîtrise du processus analytique. Et la mise en place d'audit interne et d'auto évaluation plus régulière nous assurera de maintenir nos acquis et de nous perfectionner. Ce qui nous conduira à terme vers le dépôt du dossier d'accréditation de notre laboratoire.

La formation pour l'obtention du Diplôme Universitaire « ASSURANCE-QUALITE AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE » m'a apporté un renforcement de la base théorique sur la norme NF EN ISO 15189. Elle m'a aussi fourni les outils pratiques et nécessaires dans l'amélioration de la démarche qualité au sein de notre Département. Cela m'a permis de m'améliorer sur de nombreux aspects notamment sur la communication et les méthodologies applicables à la démarche d'assurance-qualité. Ce mémoire est une preuve de notre réponse aux exigences de la norme et que nous cherchons à nous en rapprocher.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Norme NF ISO 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale – exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR.
- 2 RBPACP V2 – 2009 Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques AFAQAP
- 3 SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. COFRAC
- 4 SH GTA 01. Guide technique d'accréditation en biologie médicale. COFRAC
- 5 SH GTA 03. Guide technique d'accréditation en ACP COFRAC
- 6 SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale COFRAC
- 7 Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. A. Vassault et coll.
- 8 SH GTA 06. Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. COFRAC
- 9 SH FORM 43. Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale COFRAC
- 10 Manuel d'utilisation Bond Leica version 5.1 Leica
- 11 Monoclonal Mouse Anti-Thyroid Transcription Factor (TTF-1) Clone 8G7G3/1 Code M3575 Dako
- 12 Hadi et al. Diagnostic Immunohistochemistry : What can Go Wrong ? Adv Anat Pathol Volume 13, Number 5, Septembre 2006.
- 13 Bussolati et al. Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry J Clin Pathol 2008 61 : 1184-1192 originally published online March 6, 2008.
- 14 Olapade-Olaopa EO, et al. Further Characterization of Storage Related alteration in immunoreactivity of archival tissue section. Applied immunochemistry & Molecular morphology 9 (3) : 261-266, 2001.
- 15 Shi et al. Standardization of Immunohistochemistry for Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen-retrieval Technique : From Experiments to hypothesis. Journal of Histochemistry & Cytochemistry Volume 55(2): 105-109.
- 16 Ramos-Vara Technical Aspects of Immunohistochemistry Vet Pathol 2005 42:405.
- 17 Holzinger A, Dingle S, Bejarano PA, Miller M-A, Weaver TE, Di Lauro R, Whitsett JA. Monoclonal antibody to thyroid transcription factor-1: Production, characterization and usefulness in tumor diagnosis. Hybridoma 1996;15:49-53

- 18** Agoff SN, Lamps LW, Philip AT, et al. Thyroid transcription factor-1 is expressed in extrapulmonary small cell carcinomas but not in other extrapulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 2000;13:238-242.
- 19** Bingle CD. Thyroid transcription factor-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:1471-1473.
- 20** Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ et al. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* 1989;8:2537-2542.
- 21** Comperat E, Zhang F, Perrotin C, Molina T, Magdeleinat P, Marmey B, Regnard JF, Audouin J, Camilleri-Broet S. Variable sensitivity and specificity of TTF1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. *Mod Pathol*. 2005 Oct;18(10):1371-6.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Organigramme du Département de Pathologie unité Bichat

Annexe II : Organisation qualité des laboratoires des HUPNVS

Annexe III : Approche processus du Département de Pathologie

Annexe IV : Procédure de réalisation technique des demandes d'ImmunoHistoChimie

Annexe V : Mode opératoire de réalisation technique des demandes d'ImmunoHistoChimie

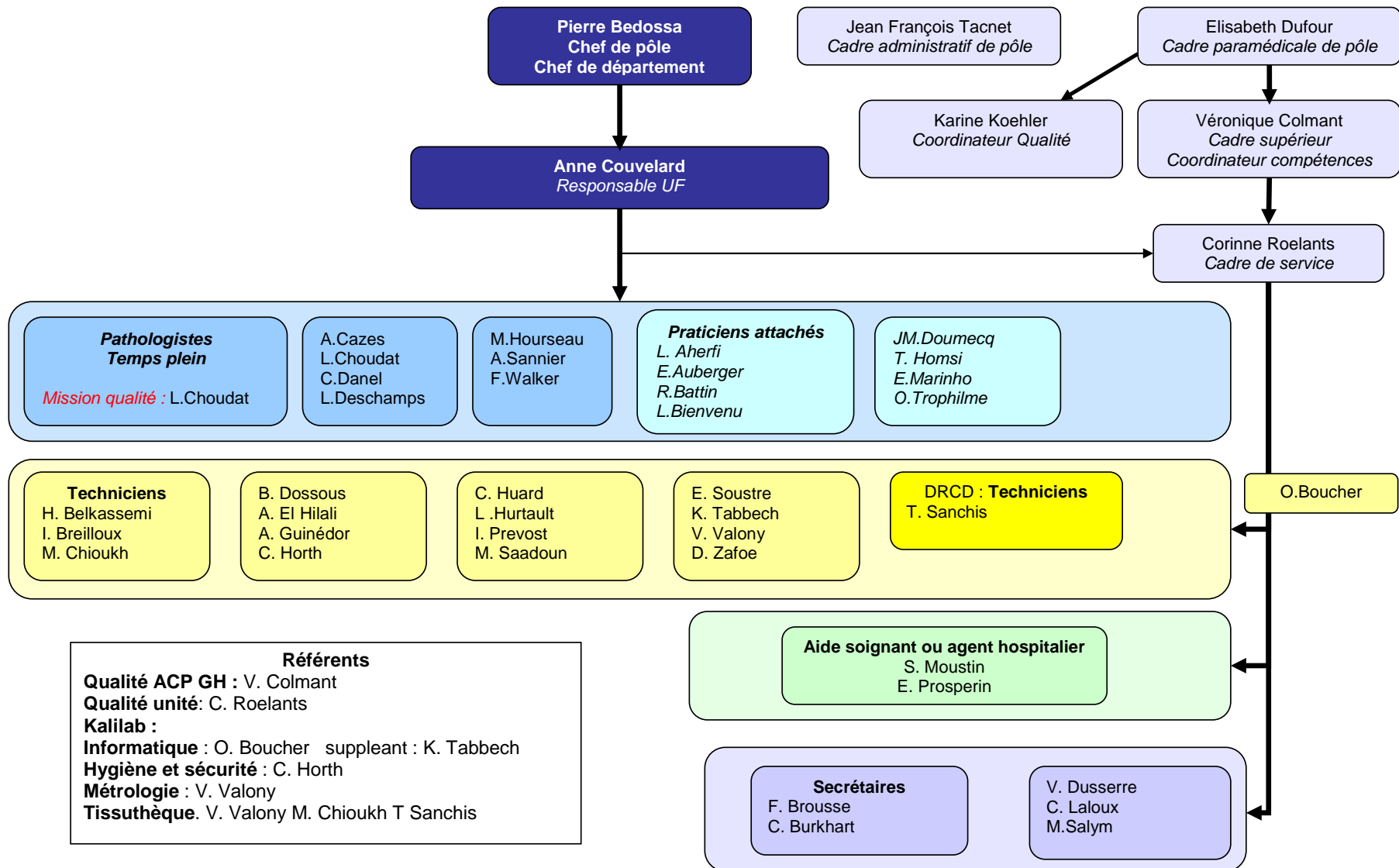
Annexe VI : Gestion des Contrôles Qualité dans le Département de Pathologie site Bichat
secteur IHC

Annexe VII : Panel Ac, témoins et référents

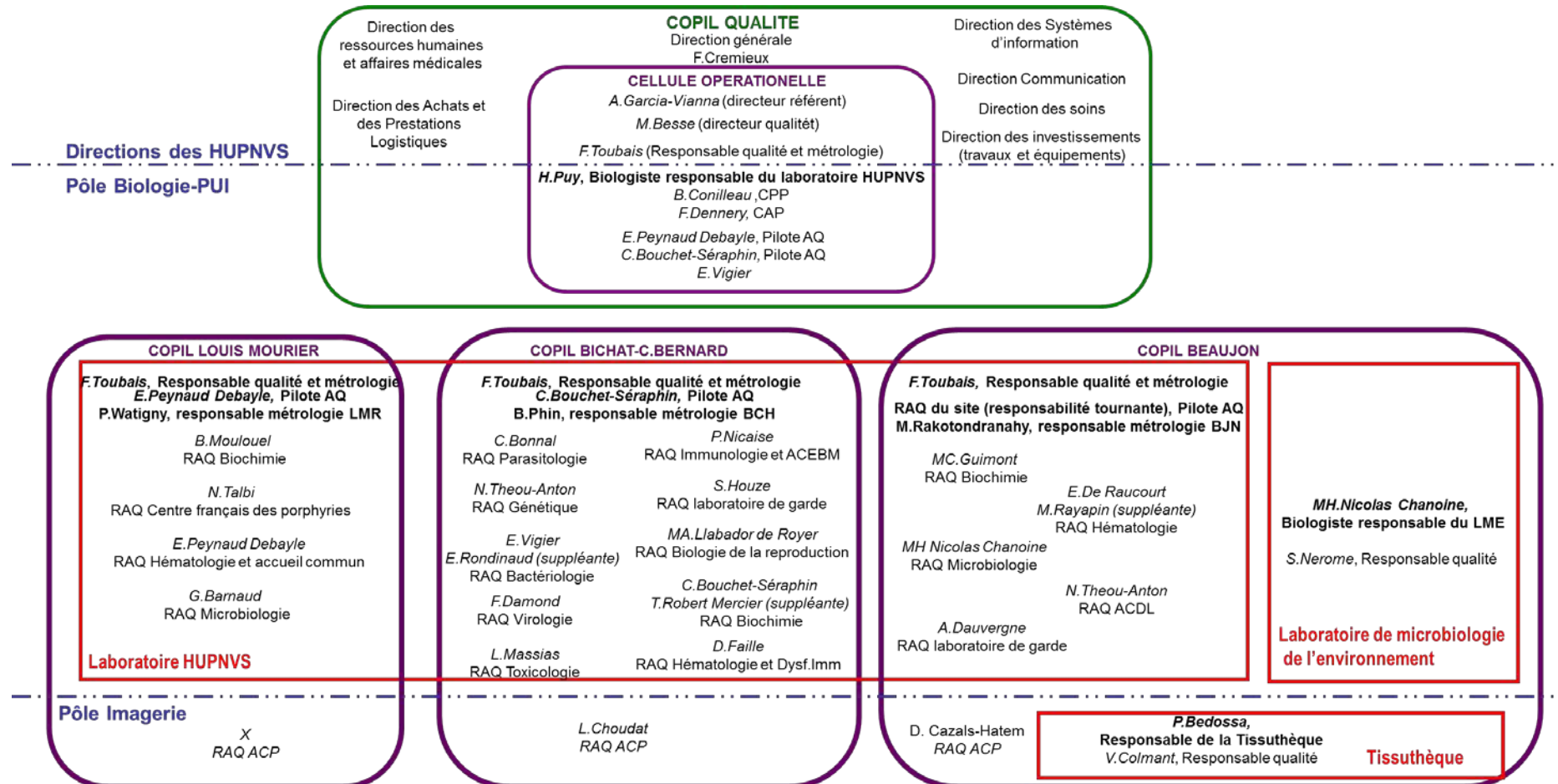
Annexe VIII : Fiche technique : Validation de méthode qualitative en IHC

Annexe IX : Plan d'expérience Validation de méthode qualitative en IHC portée A

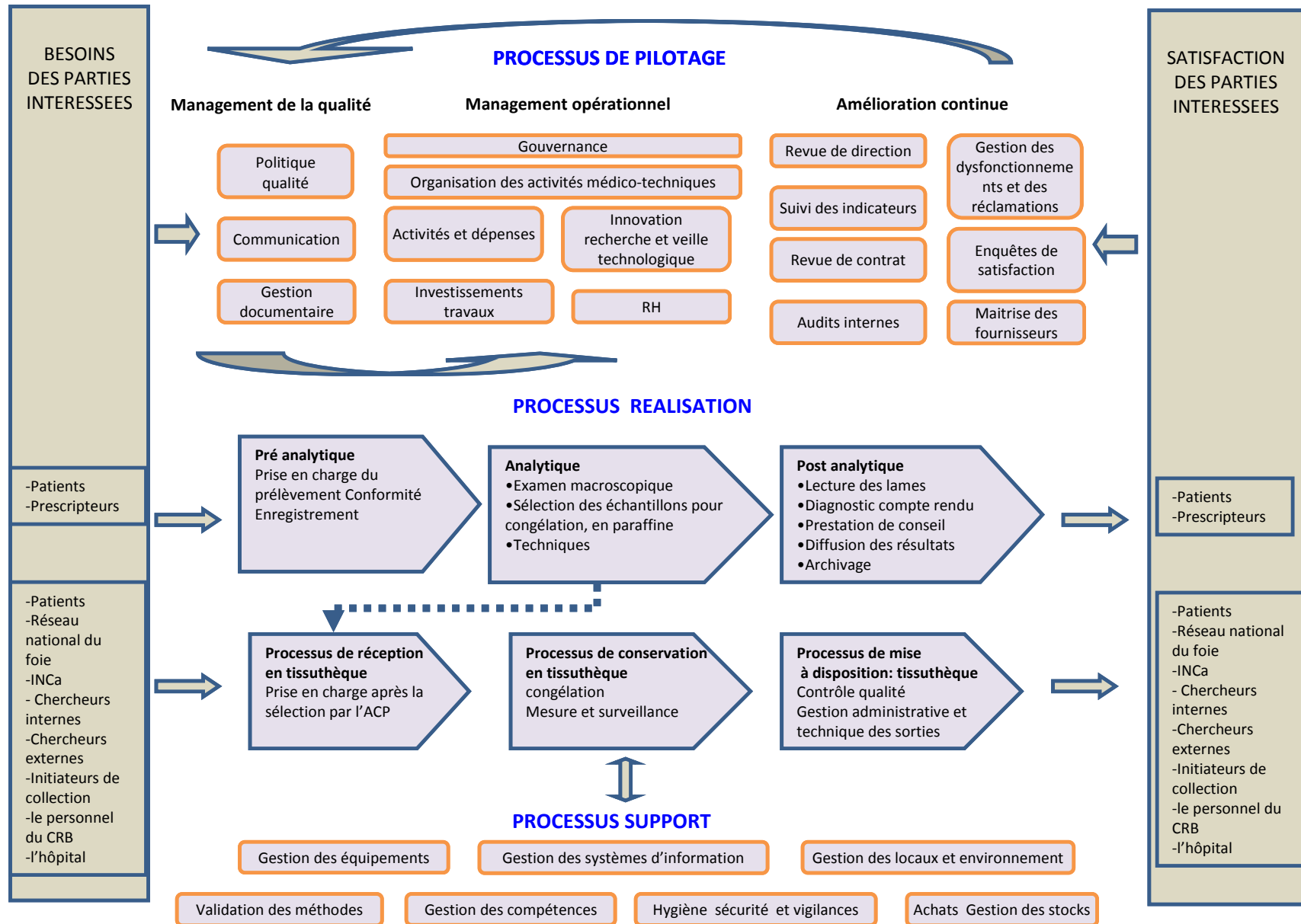
Annexe I : Organigramme du Département de Pathologie unité Bichat



Annexe II : Organisation qualité des laboratoires des HUNVS



Annexe III : Approche processus du Département de Pathologie

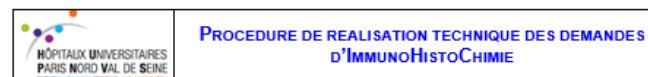


Annexe IV : Procédure de réalisation technique des demandes d'ImmunoHistoChimie



SOMMAIRE

1. Objet	2
2. Domaine d'application et personnes concernées	2
3. Documents de référence	2
4. Définitions et abréviations	2
5. Description de la démarche	2



1. OBJET

Cette procédure est relative à la réalisation technique du marquage des lames par immunohistochimie. Elle explique les différentes étapes pour traiter les demandes techniques de marquage à leur rendu au médecin demandeur, et définit les responsabilités en la matière.

2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES

Les secteurs réception, macroscopie, routine et immunohistochimie

Cadres
Techniciens
Médecins et internes

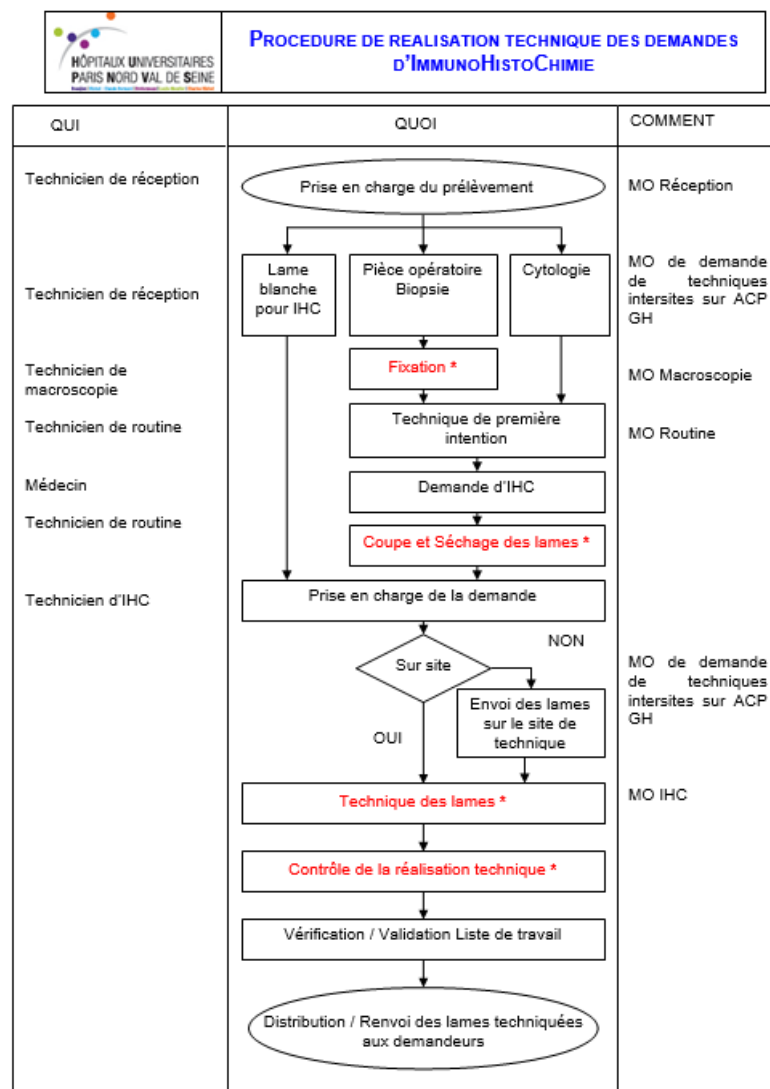
3. DOCUMENTS DE REFERENCE

GBEA Guide de bonnes exécutions des analyses en biologie médicale V2002
SH-GTA-03 Guide technique d'accréditation en anatomie et cytologie pathologique Nov 2014
RBFACP Recommandations de Bonnes Pratiques en ACP V2 2009
Norme ISO 15189, d'août 2007
Manuel Bond3 et Bond Max, Leica
Manuel Benchmark, Roche
Documentations fournis lors de la formation AFAQAP Technique en immunohistochimie – Validation des méthodes Janv 2015

4. DEFINITIONS ET ABBREVIATIONS

ACP Anatomie et cytologie pathologiques
GH HUPNVS Groupe Hospitalier-Hopitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine
TLM Technicien de Laboratoire Médical
IHC ImmunoHistoChimie
MO Mode Opérateur

5. DESCRIPTION DE LA DEMARCHE



* étape critique

Annexe V : Mode opératoire de réalisation technique des demandes d'ImmunoHistoChimie



1. OBJET

Le mode opératoire décrit la démarche à suivre pour la réalisation technique du marquage des lames par immunohistochimie au département de Pathologie sur le site Bichat.

2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNEES

Domaine d'application : les secteurs routine et Immunohistochimie.
Personnes concernées : Techniciens de laboratoire médical.

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques RBPACP V2 – 2009
GBEA Guide de Bonne Exécution des Analyses, version 2 (arrêté du 26 novembre 1999)
Norme NF ISO 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale – exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR.
SH REF 02. Recueil COFRAC des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.
SH GTA 03 Guide technique d'Accréditation en ACP
Manuel d'utilisation Bond Leica version 5.1

4. DEFINITIONS ET ABBREVIATIONS

RBPACP Recommandations Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques
GBEA Guide de Bonne Exécution des Analyses
ACP Anatomie Cytologie Pathologiques
GH Groupe Hospitalier
IHC ImmunoHistoChimie
HIS Hybridation *In Situ*
Kalilab Logiciel qualité du laboratoire
Diamic système de gestion du laboratoire
Ac Anticorps

5. MATERIEL

Automates Bond Max et Bond 3
Chambre froide
Réfrigérateur
Four à micro-onde
Sorbonne
Postes informatiques
Imprimante à étiquettes
Monteuse de film

6. DESCRIPTION DE LA DEMARCHE

L'immunohistochimie a pour but de révéler *in situ*, sur préparations tissulaires ou cellulaires, des antigènes par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques dirigés contre ceux-ci et conjugués à une substance (ex : enzyme).

Les techniques d'immunohistochimie permettent notamment de caractériser l'origine et la différenciation de la population cellulaire tumorale ou non, un agent pathogène, etc... Elles sont devenues un complément utile, voire indispensable, à la précision du diagnostic histopathologique et peuvent contribuer à l'établissement du pronostic.

La démarche globale d'une journée type est détaillée sur la fiche technique **Organisation d'une journée type**.



6.1. Enregistrement des demandes de lames à techniquer

Le personnel de la réception enregistre les cas communiqués pour technique d'IHC ou bien les médecins d'ACP du GH font les demandes techniques d'IHC pour le site Bichat. Ces demandes sont enregistrées en seconde intention.

6.2. Identification des lames

Suite à l'édition des listes de travail d'IHC, les techniques demandées sont automatiquement transmises au poste de travail informatique d'IHC. Cependant, il arrive que l'on doive enregistrer un cas manuellement (notamment les cas de recherche, les lames externes Beaujon, Louis Mourier et mise au point d'anticorps). (Cf. Fiche technique : **Enregistrement d'un cas**).

Lorsque toutes les lames, incluant tous les contrôles, ont été paramétrées, allez sur le logiciel des automates et cliquez sur Imprimer étiquettes dans l'écran Paramétrage lame. Sélectionnez comment imprimer les étiquettes de lame. Attention, la réimpression d'une étiquette annule la précédente.

6.3. Séchage des lames

Une fois l'identification des lames effectuée, elles sont placées au four à micro-onde 10 min à pleine puissance avec un bac d'eau. Par la suite, elles sont réparties sur les porte-lames des automates.

Il faut faire attention de ne pas mettre deux protocoles différents sur le même porte lames. Vendredi soir, après séchage des lames, les stockées au réfrigérateur jusqu'au lundi matin.

6.4. Liste des protocoles

En IHC :

IHC STANDARD : protocole de marquage par défaut
C4d : protocole spécifique pour une incubation d'une heure de l'anticorps.
Sans post primary : protocole pouvant être utilisé à des fins de recherche sur tissus de souris par exemple
*IHC Protocol J : protocole de marquage par défaut pour le kit « RED »

En ISH :

*ISH hybridation : protocole d'origine pour l'HIS (EBER sans dénaturation et HPV avec dénaturation)

Recherche :

* Les protocoles spécifiques sont créés à la demande (cf. manuel d'utilisation Bond Leica version 5.1) (p.149)

6.5. Utilisation des automates de marquage

Après avoir chargé l'automate du kit de détection, des godets d'anticorps et des lames à techniquer, démarrer la technique dite de JOUR ou de NUIT. (Cf. Fiche technique : **Démarrage de la technique**)

6.6. Déshydratation et montage des lames

Sortir les lames de l'automate

Retirer les « coovertiles » et les mettre dans l'eau

Rincer les lames à l'eau courante

Les déshydrater par des bains successifs d'alcool (4 * 3 min) et de xylène (4 * 3 min), sous la Sorbonne. Monter les lames à l'aide de la monteuse de film.



6.7. Distribution des lames techniques

Après évaporation de l'excédent de xylène, dans la monteuse de film, regrouper les lames par médecin demandeur.

Contrôler les lames par rapport à la liste de travail.

Rendre les lames aux médecins demandeurs.

Valider les listes de travail.

6.8. Entretien des automates

Entretien quotidien ou à la demande des automates : contrôle des niveaux de réactifs, nettoyage des sondes et des platines chauffantes.

Valider dans Kalilab les maintenances, une fois qu'elles ont été réalisées

Nettoyer les « couvertiles » (cf. annexe, en fichier joint)

Redémarrer le poste informatique le vendredi après-midi (identifiant : user ; mot de passe : 12345)

6.9. Mode dégradé en cas de panne

Dans le cas d'une panne sur un automate, les lames non marquées peuvent être stockées dans le réfrigérateur routine en attendant le prochain cycle, où elles seront prises en charge en priorité.

Dans le cas d'une panne totalement bloquante pour un délai supérieur, à celui du stockage maximal d'une lame au réfrigérateur, soit 10 jours, les pathologistes doivent en être informés. Puis, ils décideront si le cas doit être externalisé sur Beaujon ou un autre hôpital de l'AP-HP.

7. MISE AU POINT D'UN AC

Les classeurs des anticorps contiennent les différentes informations et manipulations entreprises, destinées à déterminer la condition optimale d'utilisation :

- Référence des anticorps
- Nom du fournisseur
- Condition de stockage (température)
- Dilution de travail
- Protocole de marquage
- Nom du médecin référent

Il faut réaliser une gamme de dilution à tester au pH 6, STD et 9 en fonction de la fiche technique communiquée de l'anticorps (cf. fiche technique **Mise au point d'anticorps**).

Une fois les paramètres définis, il faut tester le marquage sur les 3 automates.

Après mise au point et validation par le médecin pour son intégration dans la liste d'anticorps de routine, il faut créer l'Ac dans le logiciel. (cf. manuel d'utilisation Bond Leica version 5.1) (p.165). Et demander sa création dans DIAMIC au référent informatique.

Informez les référents pour ajouter le nouvel Ac à la liste des Ac de routine ou recherche et sur la liste de passage témoins d'Ac de routine. Ces trois listes sont réactualisées tous les ans (août / septembre) avec le médecin référent du secteur IHC.



8. GESTION DES REACTIFS

8.1. Gestion du stock d'Ac

Pour les Ac à forte consommation.

Utiliser des godets de 7mL. Le remplissage des godets s'effectue lorsque le volume de celui-ci est en dessous de 3 mL.

Pour les Ac à faible consommation.

Utiliser les godets de 6 mL. Préparer 3 mL de réactifs tous les 3 mois. Changer le tube lorsque le volume de celui-ci est en dessous de 1 mL.

Pour chaque nouveau lot d'anticorps ou bien en fin de vie du godet, il faut en créer un nouveau. (Cf. fiche technique **Création de godet**). Il faut tester le lot.

La gestion des anticorps de routine nécessite une traçabilité de l'archivage du remplissage des godets sur un cahier nommé comme tel. Tous les Ac de routine périmés voient leurs dates de péremptions prolongées de 3 mois à chaque fois et doivent être contrôlés et validés par un témoin à ces dates avec un médecin.

Les réactifs sont tracés dans un classeur de traçabilité des réactifs.

Mentionnant :

- Le nom du produit
- Le nom du fournisseur
- La référence du produit
- La température de conservation
- Les précautions particulières
- Le numéro de lot
- La date de réception
- La date à laquelle le flacon est entamé
- La date à laquelle le flacon est fini
- La fiche technique de l'anticorps

La demande d'approvisionnement des réactifs est assurée par l'intermédiaire d'un cahier de commande rempli mensuellement et transmis à l'encadrement, mentionnant :

- Le nom des réactifs ou du matériel commandés
- Leur référence
- Leur fournisseur
- Leur quantité

Les commandes doivent être réalisées à 2 personnes. Avant de demander l'approvisionnement, penser à consulter la consommation annuelle d'Ac pur sur la liste d'anticorps de routine. La commande est contrôlée à chaque arrivée en vérifiant le cahier. Il est mentionné la date de réception de ceux-ci.



8.2. Gestion des autres réactifs

Les réactifs sont tracés dans le classeur consommable automatés.

Mentionnant :

- Le nom du produit
- Le nom du fournisseur
- La référence du produit
- La température de conservation
- Les précautions particulières
- Le numéro de lot
- La date de réception
- La date à laquelle le lot est entamé
- La date à laquelle le lot est fini

La demande d'approvisionnement des réactifs est assurée par l'intermédiaire d'un cahier de commande rempli mensuellement et transmis à l'encadrement, mentionnant :

- Le nom des réactifs ou du matériel commandés
- Leur référence
- Leur fournisseur
- Leur quantité

Les commandes doivent être réalisées à 2 personnes. La commande est contrôlée à chaque arrivée en vérifiant le cahier. Il est mentionné la date de réception de ceux-ci.

9. HYGIENE ET SECURITE

Risques chimiques : DAB, xylène, anticorps et alcool

Moyens de protection individuelle et collective : Blouse, gants et Sorbonne.

Suivre la filière de tri des déchets mis en place au sein du GH.

10. CONTROLE QUALITE

Le document **Gestion des contrôles qualité dans le département de pathologie site Bichat secteur IHC** définit l'usage en la matière sur le secteur IHC du site Bichat.

11. LISTES DES DOCUMENTS A SOCIÉS

Fiches techniques

- Organisation d'une journée type
- Enregistrement d'un cas
- Démarrage de la technique
- Entretien automate
- Création de godet
- Gestion des notifications d'événement de lame



Enregistrement

Mise au point d'anticorps

Liste des anticorps de routine (à contrôler tous les ans)

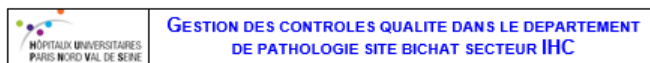
Liste des anticorps de recherche (à contrôler tous les ans)

Liste de passage des témoins (trame vierge)

Tracabilité réactifs IHC (trame vierge)

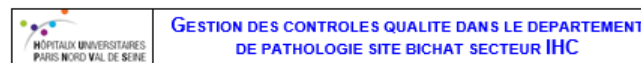
Consommables Automates (classeur ayant la trame pour les commandes des consommables des automatés et fiche de tracabilité)

Annexe VI : Gestion des Contrôles Qualité dans le Département de Pathologie site Bichat secteur IHC



SOMMAIRE

1. Objet	2
2. Domaine d'application et personnes concernées	2
3. Documents de référence	2
4. Définitions et abréviations	2
5. Description de la démarche	2
5.1. Organisation générale	2
5.2. Maîtrise du processus analytique	3
5.3. Utilisation de CIQ	3
5.3.1. CIQ lecture de lame	3
5.3.2. CIQ automates et réactifs	4
5.3.3. Traçabilité	4
5.4. CIL Beaujon - Bichat	4
5.5. EEQ	4
5.6. Enregistrement et archivage des résultats des CQ	4
6. Liste des annexes	4



1. OBJET

Ce mode opératoire concerne la gestion des contrôles de qualité (CQ) lors de la réalisation technique d'ImmunoHistoChimie (IHC), nécessaire pour démontrer la maîtrise du processus analytique. La conformité des résultats des CQ apporte la preuve de la maîtrise du suivi du processus analytique et de la vérification des performances de la méthode.

2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES

Domaine d'application : le Département de Pathologie site Bichat, secteur IHC
Personnes concernées : Pathologistes et techniciens habilités du secteur IHC

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Norme NF ISO 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale – exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR.
- SH REF 02. Recueil COFRAC des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.
- SH GTA 01. Guide technique COFRAC d'accréditation en biologie médicale.
- SH GTA 03 Guide technique COFRAC d'Accréditation en ACP.
- Recommandations des Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques RBPACP V2 – 2009 AFAQAP
- 17302_PN_GCQ_P_002 Procédure de gestion des contrôles qualité. HUPNVS.

4. DEFINITIONS ET ABREVIATIONS

ACP : Anatomie Cytologie Pathologiques
IHC : ImmunoHistoChimie
CQ : Contrôle Qualité
CIQ : Contrôle Interne de Qualité
CIL : Comparaisons InterLaboratoires
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
Ac : Anticorps
Kalilab : Logiciel qualité du laboratoire
DPC : Développement Professionnel Continu

5. DESCRIPTION DE LA DEMARCHE

5.1. Organisation générale

La maîtrise des résultats en IHC repose sur la maîtrise des processus pré et analytique, sur les CIQ et les EEQ.

Le **pathologiste référent du secteur IHC** et les **référents techniques du secteur IHC** définissent la stratégie de passage des CIQ, ses exigences de performance en termes de fidélité et les règles de validation.

L'organisation de la gestion des CQ (CQI, CIL) est placée sous la responsabilité du **pathologiste référent du secteur IHC**. Une liste des **témoins d'Ac de routine** pour chaque analyse existe et est mise à jour si changement. De plus, la participation aux programmes EEQ est notée et archivée par le cadre supérieur de santé du département de pathologie.

En cas de CIQ non conforme, le laboratoire s'attache à évaluer l'impact sur les résultats rendus précédemment. Le laboratoire dispose de plusieurs automates pour un même examen, les CIQ permettent de prouver que les résultats fournis par ces différents automates sont comparables.



GESTION DES CONTROLES QUALITE DANS LE DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE SITE BICHAT SECTEUR IHC

5.2. Maîtrise du processus analytique

Mise en place d'un parcours de compétence : Qualification, évaluation du maintien des compétences et formation continu du personnel.

Conditions environnementales

Présence d'un climatiseur dans la pièce afin de maintenir une température en adéquation avec les préconisations des fournisseurs.

Equipements

3 automates Leica : 1 Bond 3 et 2 Bond Max. (sous contrat de maintenance)
Les maintenances sont définies dans le mode opératoire et tracer dans Kalilab

Chambre froide (stockage d'une partie du consommable des automates)

Réfrigérateurs (routine et recherche)

Four à micro-onde : 10 min, pleine puissance avec eau

Sorbonne (galerie de déshydratation)

Postes informatiques

Imprimante à étiquettes

Monteuse de film

Echantillon primaire

Le mode opératoire du secteur « routine » définit l'épaisseur de coupe et la qualité de l'étalement de la coupe sur la lame.

Le mode opératoire du secteur IHC définit le séchage des lames et la stabilité maximale de l'échantillon

Méthode et réactifs

Pour le secteur IHC, le processus analytique commence à partir de la lame blanche séchée.

La mise au point de l'Ac assure la vérification de la réaction.

Pour les techniques IHC avec témoins internes, une évaluation de la qualité du marquage est effectuée au cas par cas sur chaque lame. (Ex : les marqueurs de différenciations tel que le CD117)

Pour les techniques IHC n'ayant pas témoins internes, un bloc témoin est utilisé que nous rajoutons à la lame afin de valider la technique de marquage. (cf. 5.3.1 CIQ lecture de lame)

Dans le cas de méthodes IHC dont les résultats sont exprimés sous forme de score au moins un matériau de contrôle est à choisir dans la zone de seuil de décision clinique (ex : HER2). (cf. 5.3.1 CIQ lecture de lame)

Réactifs

Pour les Ac, les réactifs sont testés à chaque nouveau lot, afin de vérifier qu'ils sont conformes. (cf. 5.3.2 CIQ automates et réactifs)

5.3. Utilisation de CIQ

5.3.1. CIQ lecture de lame

Les blocs témoin et les blocs multi-tissulaires sont sélectionnés pour une utilisation comme matériaux de contrôle qualité. Les matériaux sont issus de prélèvements de patients connus et positifs pour le marqueur d'intérêt.

Les blocs témoin et multi-tissulaires sont réalisés par les pathologistes et techniciens d'IHC, en retournant sur la réserve de la pièce en macroscopie ou bien en réalisant un punch de 4/8 mm sur le bloc d'intérêt.

Une liste de passage des témoins précise les marqueurs nécessitant un témoin externe. Cependant, en fonction du contexte tissulaire, les pathologistes peuvent spécifier sur leurs demandes l'ajout du CIQ sur la coupe.



GESTION DES CONTROLES QUALITE DANS LE DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE SITE BICHAT SECTEUR IHC

Ces blocs témoins sont :

- définis et sélectionnés par les pathologistes
- vérifiés avant leurs utilisations
- mis à disposition en routine (pièce de coupe) pour la coupe
- Le témoin externe est placé en haut sur la lame test (uniquement pour les coupes effectués sur site)
- Lames coupées à l'avance (stockage en chambre froide limité à 1 mois)

5.3.2. CIQ automates et réactifs

Vérification de la maîtrise du processus pour les cas suivant :

- Comparaison automates
1 lame témoin par rack par automate lors de la mise au point d'un Ac.
- Test nouveau lot d'Ac
1 lame témoin avec la routine à faire valider par le pathologiste. (Noter sur la fiche de traçabilité de l'Ac)

Vérification des dérives de marquage.

Ainsi, au changement de sonde annuel, une calibration de cette dernière est réalisée par le technicien de Leica. De ce fait, nous réalisons tous les 6 mois une vérification à valider dans Kalilab. Marqueur et bloc définis par le pathologiste.

5.3.3. Traçabilité

Les techniques IHC avec CIQ ou avec témoins internes, sont lus par les pathologistes et ces derniers effectuent une évaluation de la qualité du marquage en continu sur chaque lame.

Le signalement d'une non-conformité du marquage par le pathologiste ou le technicien donne lieu à l'ouverture d'une FAQ et à l'évaluation de l'impact sur les résultats rendus précédemment.

5.4. CIL Beaujon - Bichat

Cette organisation repose sur les pathologistes référents du secteur IHC et des référents techniques des deux sites. Elle permet de vérifier la conformité de nos exigences, d'harmoniser nos pratiques et d'assurer une amélioration continue de nos pratiques. Ponctuellement, cela permet d'effectuer un contrôle qualité par comparaison en cas de doute sur une technique. Planification annuelle effectuée en fonction des EEQ réalisée sur l'année antérieure.

5.5. EEQ

Programme de CQ réalisé annuellement auprès de l'AFAQAP. Certains marqueurs sont éligible DPC. Le choix des tests s'effectue en fonction des spécialités de notre établissement. Le panel proposé par l'AFAQAP est toutefois restreint. Il sera complété à partir de 2018 par des contrôles NordicQC (Nordic immunogistochemical Quality Control) ou UK NEQAS Histopathology. La priorité sera donnée aux Ac dont l'interprétation a un impact sur la stratégie thérapeutique du patient. Il est possible d'effectuer plusieurs séries par an. Avec un délai de rendu de résultat plus court que l'AFAQAP.

5.6. Enregistrement et archivage des résultats des CQ

Les déclarations de dysfonctionnement des CQ, les actions correctrices effectuées et les décisions prises doivent être tracées et archivées. Ce sont des indicateurs qualité et ils reflètent la qualité du processus dans le temps.

Les durées d'archivage sont de 3 ans pour les CIQ et de 5 ans pour les CIL.

6. LISTE DES ANNEXES

Annexe VII : Panel Ac, témoin et référent

 HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE	LISTE DES TEMOINS
---	--------------------------

Vérfiée en 07/2018

En gras les Ac nécessitant l'utilisation d'un témoin externe

AC9	11301111-412	ACD	CD99	13B018894		MELAN-A	6 4 3 4 4 8	LDE
ACE	APPENDICE	MHO	CD117	APPENDICE	ACD	MGMT	APPENDICE	ACD
ACTINE	APPENDICE	MHO	CD138	APPENDICE	MHO	MLH1	APPENDICE	ACD
AE1/AE3	15B07051-01	MHO	CD163	APPENDICE	LDE	MSH2	APPENDICE	ACD
ALK	13B011821-11	ACA	CDX2	APPENDICE	ACD	MSH6	APPENDICE	ACD
ALPHAFOETO	687686-D1	LCH	CerB2	M O Z A R T	FWA	MYOGLOBINE	APPENDICE	FWA
BAP-1	16B004219	CDC	CHROMO	APPENDICE	ACO	MYOGENIN	6 4 2 3 7 4	MHO
BCL2	APPENDICE	MHO	CK5/6	6 1 8 6 6 3	ACA	NAP8IN A	985241-19	ACA
BCL6	APPENDICE	MHO	CK7	14B003899-02	ACA	NF		MHO
BrEP4	APPENDICE	ACA	CK19	6 2 4 8 2 6 - 8	MHO	NSE	8 0 9 6 7 0 - 8	FWA
BETAHCG	F O 1 5 6 1	FWA	CK20	APPENDICE	MHO	OE8TRO	14B011888-3	FWA
BRAF	13B00882-3	LDE	CMV	3 3 4 3 6 2	ACA	PAX-5		MHO
C4D C-P		LDE	CXCL13	15B001182-01	LDE	PAX-8	15B008243-01	LCH
C4D REIN		ASAN	Cyclin D1	APPENDICE	MHO	P16	13B017366-2	MHO
CA125	8 1 3 7 5 0 - 1 0	MHO	CK Pan Plus	APPENDICE	MHO	P40	14B011023-22	ACA
CALCITONINE	281276-2B	MHO	D2-40	5 9 6 2 4 8	ACA	P53	4 8 6 3 3 7 - 2	ACD
CALDESMONE	APPENDICE	LCH	DESMINE	APPENDICE	LCH	P57	14B011979-3	ACA
CALRETININE	15B017778-4	ACA	DOG1	14B004866-9	ACO	PD-L1	P D - L 1	ACA
CD1a	APPENDICE	MHO	EBV		MHO	PD1	APPENDICE	ACA
CD3	APPENDICE	MHO	E-CAD	APPENDICE	FWA	PIN COCKT	850035-21	LCH
CD4	APPENDICE	LDE	ELASTASE	14B011991-2	ACA	PLAP	4 8 8 3 4 8 D	LCH
CD5	APPENDICE	MHO	EMA	APPENDICE	MHO	PMS2	APPENDICE	ACO
CD7	APPENDICE	LDE	EMBP	14B012230	MHO	PRGQ	14B011818-8	FWA
CD8	APPENDICE	MHO	F VIII	APPENDICE	FWA	P3A	14B011798-4	LCH
CD10	APPENDICE	MHO	GATA-3		LCH	RO81	R O 8 - 1	ACA
CD15	APPENDICE	MHO	GCDFP 18	8 3 9 9 4 0 - 1	FWA	3AA	6 4 3 8 1 3 - 4	MHO
CD20	APPENDICE	MHO	HME1	6 8 0 7 8 0 R	MHO	SPIROCHETE	14B002288	MHO
CD21	APPENDICE	MHO	HP	16B001163-32	MHO	SYNAPTO	APPENDICE	ACO
CD23	APPENDICE	MHO	HERPE3		LDE	S100	3 2 6 7 5 7 - C	LDE
CD30	APPENDICE	MHO	HHV8	13B001764-16	MHO	TGB	8 0 3 1 7 8 - 2	MHO
CD31	APPENDICE	LDE	HMB46	8 1 6 7 3 4 - 3	LDE	TOXO	AU1284-13J	MHO
CD34	APPENDICE	LDE	IG G4		ACD	TTF1	14B003899-02	ACA
CD45	APPENDICE	MHO	INHIBINE	6 6 2 8 7 2 - 1 B	MHO	VIMENTINE	APPENDICE	MHO
CD56	APPENDICE	ACA	KAPPA	APPENDICE	MHO	WT1	14B008840	ACA
CD68	APPENDICE	ACA	K67	APPENDICE	ACO			
CD79a	APPENDICE	MHO	LAMBDA	APPENDICE	MHO			
			MAMMAGLOBIN	14B015499-07	FWA			

Annexe VIII : Fiche technique : Validation de méthode qualitative en IHC

 HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE	FICHE TECHNIQUE : VALIDATION DE METHODE QUALITATIVE EN IHC
---	---

1- Nouvel Ac ou marqueur à tester pour la validation de la méthode sélectionné par le pathologiste référent

2- Si l'Ac nécessite un témoin externe, demander à Véronique Colmant et Olivier Boucher d'ajouter l'Ac à la liste des témoins à couper pour la routine et la liste de travail IHC

3- Vérifier s'il existe un bloc témoin récent, sinon en créer un à partir d'une pièce opératoire en accord avec le médecin.

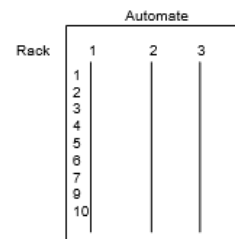
- Faire plusieurs blocs
- Faire des fragments n'exoédant pas 1cm2
- Si nécessaire, faire des blocs multi tissulaire (exemple rein, rate, estomac, thyroïde)

4- Tester le bloc témoin pour contrôler la mise au point

5- Faire valider le contrôle par le pathologiste

6- Préparer 18 lames et les étiqueter comme suis :

- Identification du cas : T+
- Dans la seconde fenêtre d'ajout de cas, sélectionner l'Ac et en commentaire de lame mettre : AUTOMATE RACK-POSITION (ex : TITI 1-1, TITI 1-2.....)



7- Préparer le dossier de validation de méthode

8- Faire lire les lames et remettre le dossier de validation de méthode en version papier et numérique

- Faire remplir la partie description de l'Ac et associer 1 à 3 photos
- Imprimer la version finale
- Faire signer le dossier

9- Archiver le dossier et les lames

10- Si nécessaire, mettre à jour le tableau des Ac de routine, la liste des témoins

Annexe IX : Plan d'expérience Validation de méthode qualitative en IHC portée A



EXAMEN D'IHC :

Ac

Pathologiste responsable de la validation :

Critères	Nombre et nature des échantillons testés	Date	Opérateurs
Fidélité (Répétabilité)	Bloc témoin : X 10 lames sur le même rack		
Fidélité (Fidélité intermédiaire)	Période du XX au XX Changement de lot : Oui / Non Nombre de technicien passés sur le secteur : X Nombre de lames : X		
Justesse/exactitude (Approche)	Récupération des antécédents : Oui / Non Mise au point : - Dilution : X - Restauration site Antigénique : X		
Comparaison	Comparaison entre automates 1 lame par rack par automate Bloc témoin : X		

Partie technique du dossier de validation de méthode remplie : **Oui / Non**

Dossier transmis au pathologiste référent : **Oui / Non** ; Date : **XX**

La mise en place d'une démarche qualité selon la norme NF EN ISO 15189 constitue un projet au long cours pour une structure d'Anatomie Cytologie Pathologiques (ACP). L'ampleur du travail dépend du niveau de maturité de la structure dans le domaine de la qualité, du type de structure et des moyens humains et financiers dont elle dispose, c'est un projet collectif. Le Département de Pathologie des HUPNVS recherche l'amélioration de l'efficacité de ses activités en tenant compte des risques identifiés. Cette amélioration continue de la qualité est renforcée au travers de ce travail sur la mise en place de la validation de méthode sur le secteur ImmunoHistoChimie (IHC).

Dans un premier temps, il nous a fallu remettre à niveau le processus analytique du secteur IHC en mettant en place un système efficace de contrôle de la qualité en s'appuyant sur le SH GTA 06, ainsi que les documents fournis par la cellule qualité. Notre base documentaire sur ce secteur a donc été réévaluée. Afin d'apporter plus de précision quant à nos pratiques, et pour se mettre au niveau de nos nouvelles exigences détaillées dans le SH REF 02 §5.5 et §5.6, RBPACP et le SH GTA 03 §5.5 et §5.6.

Enfin, nous nous sommes focalisés sur l'objectif de vérifier/valider les méthodes analytiques du secteur IHC. La vérification des procédures analytiques est réalisée suivant les recommandations du SH GTA 04. Les méthodes du fournisseur qui sont normalisées et reconnues par l'état de l'art sont à « vérifier sur le site de la structure » avant mise en application. La vérification sur site consiste à évaluer, dans notre propre environnement (locaux, personnel, équipements/réactifs, etc.), les performances de la technique (temps d'incubation, température, tampon de démasquage de sites antigéniques, etc.). En plus, il s'agit pour chaque technique réalisée sur le secteur IHC d'identifier les paramètres de performance à retenir et de gérer l'incertitude sur le résultat. Un rapport de suivi de maîtrise par l'analyse des CIQ et des déclarations de dysfonctionnement est constitué et intégré au dossier de validation de méthode de l'anticorps. L'ensemble du travail fourni nous permet de savoir si la méthode est apte à être utilisée au laboratoire. Et de prouver notre maîtrise d'un savoir-faire selon les exigences de la norme et selon l'état de l'art.

Mots clés : ACP, contrôle qualité, Immunohistochimie, norme NF EN ISO 15189, validation de méthode.