

Université Pierre et Marie Curie -
Sorbonne Universités

MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »

GESTION DE PORTEE FLEXIBLE EN LABORATOIRE
D'HISTOCOMPATIBILITE

PHILIPPE PUILLANDRE

Année 2017-2018

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 D.U. concerné.».

AUTEUR :

Philippe Puillandre

Technicien en biologie médicale

Laboratoire d'Immunologie Biologique - Secteur Histocompatibilité



Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Centre Hospitalo-Universitaire Robert Debré
48 Bd Sérurier
75019 Paris

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr Michel Vaubourdolle ainsi que le Dr Pascal Pernet de m'avoir permis de suivre le Diplôme Universitaire « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » qui a parfaitement répondu à mes attentes.

Je remercie également tous les intervenants pour la qualité de leurs enseignements, les clefs de compréhension qu'ils m'ont fournies ainsi que les outils qu'ils m'ont fait découvrir.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnels du service d'Immunologie biologique de l'hôpital Robert Debré qui sont impliqués au quotidien dans l'assurance qualité du service. Le travail de gestion de portée d'accréditation repose sur nous tous avec une implication de chacun(ne).

Au premier rang le Pr Guislaine Carcelain, notre chef de service, pour la confiance qu'elle m'a accordé, son soutien et ses encouragements.

Le Dr Béatrice Pedron la biologiste du secteur HLA avec qui nous avons beaucoup œuvré pour mener à bien et maintenir l'accréditation du laboratoire.

Mes collègues techniciennes Audrey Pernoud, Magdalena Adechina et Karine Bruniquet pour leur travail, leur soutien et la bienveillance dont elles font preuve.

Enfin, je remercie ma cadre Véronique Mansuy et Catherine Hedin cadre paramédicale du pôle de biologie qui sont à l'origine de ce projet de formation et m'ont encouragé dans cette voie.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE.....	1
INTRODUCTION	2
1. GENERALITES	4
1.1. L'hôpital Robert Debré	4
1.2. Le Laboratoire de Biologie Médicale du CHU	4
1.3. Le laboratoire d'immunologie biologique	6
1.3.1. Le secteur de Culture cellulaire, cytométrie en flux, immunité humorale (CCH).....	6
1.3.2. Le secteur histocompatibilité (HLA).....	6
1.4. Mes rôle et missions au LBM de l'hôpital Robert Debré.....	7
2. L'HISTOCOMPATIBILITE ET SES PROBLEMATIQUES	8
2.1. Le système HLA ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)	8
2.2. Nomenclature internationale.....	9
2.3. Organisation et accréditation du typage HLA en France.....	10
2.4. Les différentes techniques utilisées au laboratoire	10
3. LA PORTEE FLEXIBLE D'ACCREDITATION.....	11
3.1. Définition de la portée flexible d'accréditation.....	11
3.2. Etat des lieux de l'accréditation ISO 15189 au laboratoire HLA.	13
3.3. Gestion de la ligne IC5 en portée flexible	13
3.4. Focus sur les modifications récentes, impactantes réalisées avant audit COFRAC (avril 2018).	15
3.4.1. Changement du spectrophotomètre mutualisé.	15
3.4.1.1. Comparaison de méthodes :	16
3.4.1.2. Répétabilité	17
3.4.1.3. Dossier de qualification complet.....	17
3.4.2. Modifications de la technique de PCR SSO Labtype (2017 – 2018)	17
3.4.2.1. Changement d'automate (Luminex 100 → Labscan 3D).....	19
3.4.2.2. Analyse des modifications induites par le changement de kits de PCR SSO	20
3.4.2.2.1. Tests effectués avant mise en production des kits XR	22
3.4.2.2.2. Tests complémentaires effectués	23

3.5.	Les Audits de l'année 2018	27
3.5.1.	Audit Blanc par la société Viskali-ACC (février 2018)	27
3.5.2.	Audit COFRAC (fin avril 2018) et réponses apportées aux écarts.	28
4.	GESTION DES CHANGEMENTS EN COURS ET A VENIR	29
4.1.	Ajout d'un locus en typage HLA.	29
4.2.	Qualification du kit AXR	30
4.3.	Accréditation du NGS en histocompatibilité	30
4.4.	Mise en place d'un nouvel EEQ national HLA.	31
4.5.	Changement de l'automate d'extraction d'ADN	31
4.6.	Changements des logiciels de gestion des patients et du SIL	32
4.7.	Autres changements envisageables et nouvelles technologies.....	32
4.8.	Veille réglementaire	32
	CONCLUSION - DISCUSSION.....	34
	BIBLIOGRAPHIE	36
	ANNEXES.....	37

GLOSSAIRE

AP-HP : Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
CSH : Cellules Souche Hématopoïétique
CHU : Centre Hospitalo -Universitaire
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COFRAC : COmité FRançais d'Accréditation
CoQ : Coordinateur Qualité
DO : Densité Optique
DVMO : Donneur Volontaire de Moelle Osseuse
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
EFI : *European Federation of Immunogenetic*
EFS : Etablissement Français du Sang
HLA : *Human Leucocytes Antigens*
Ig : Immuno-globuline
IMGT : *the international ImMunoGeneTics information system®*
LBM : Laboratoire de Biologie Médicale
MFI : *Mean Fluorescence Intensity* (moyenne de fluorescence)
NC : Non-Conformité
NGS : *New Generation Sequencing*
NMDP : *National Marrow Donor Program*
NV : *Normal Value* (valeur de fluorescence normalisée / billes contrôles))
PCR SSP : *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primer*
PCR SSO : *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide*
RAQ : Responsable assurance Qualité
ReQ : Référent Qualité
RIHN : Recherche Innovation Hors Nomenclature (cotation des actes de biologie)
SIL : Système Informatique de Laboratoire
SMQ : Système de Management de la Qualité
TLM : Technicien en Laboratoire Médical.
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Lien vers les standards EFI : https://www.efi-web.org/fileadmin/user_upload/Website_documenten/EFI_Committees/Standards_Committee/2017-10-31_Standards_version_7.pdf

INTRODUCTION

La réforme de la biologie médicale assujettie à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) suivant la norme ISO 15189.

« Conformément à l'article L.6221-1 du Code de la Santé Publique, un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation. »

« Conformément à l'arrêté du 5 août 2010 fixant les références des normes d'accréditation applicables aux laboratoires de biologie médicale, l'accréditation est délivrée selon la norme NF EN ISO 15189, complétée pour les examens de biologie médicale délocalisés, par la norme NF EN ISO 22870. Elles sont complétées par les exigences législatives et réglementaires strictement et directement liées à l'application des normes »

Le calendrier d'accréditation des examens de LBM, réévalué par la loi n°2013442 du 30 mai 2013, impose que 50% des examens de chaque famille soit accrédités avant le 1er novembre 2016 et 100% avant le 1er novembre 2020.

Les familles et sous familles ont été redéfinies dans l'arrêté du 4 novembre 2015 et révisée par le COFRAC dans le SH INF50 rev04 d'avril 2017. La révision 05 de ce document applicable à partir de sept. 2018 intervenue au cours de la rédaction de ce mémoire, apporte de nouvelles modifications dans les lignes de portées qui concernent notre laboratoire. J'aborderai ces mises à jour dans le chapitre 4.8 « veille réglementaire ».

Compte-tenu de ces exigences règlementaires et normatives, le LBM du CHU Robert Debré a engagé sa démarche d'accréditation avec une demande initiale déposée au COFRAC en novembre 2013. Dans cette demande initiale figurait la ligne de portée IC5 concernant la sous-Famille « Immunologie cellulaire spécialisée et Histocompatibilité (groupage HLA; ICELHISTOBM) » qui sera exposée ci-après.

Ce mémoire a pour objectif de décrire les différentes étapes mises en œuvre pour gérer dans le temps cette ligne de portée selon les exigences et les directives du COFRAC et d'en faire une analyse critique. Le laboratoire d'histocompatibilité n'étant soumis pour le moment, qu'à une seule ligne de portée, la notion de gestion de portée flexible est devenue rapidement une réalité à prendre en compte et à mettre en œuvre.

L'accréditation d'une ligne de portée par le COFRAC n'est pas un blanc-seing définitif. Il s'agit plutôt de la naissance d'une entité dont il va falloir surveiller la croissance, l'évolution, les changements et les mouvements en permanence. Afin de maintenir une qualité et une sécurité optimale il conviendra de suivre les préceptes PDCA (Plan (Planifier), Do (Faire), Check (Vérifier), Act (Améliorer)) représentés par la roue de Deming (figure 1) afin d'anticiper au mieux toutes les évolutions.

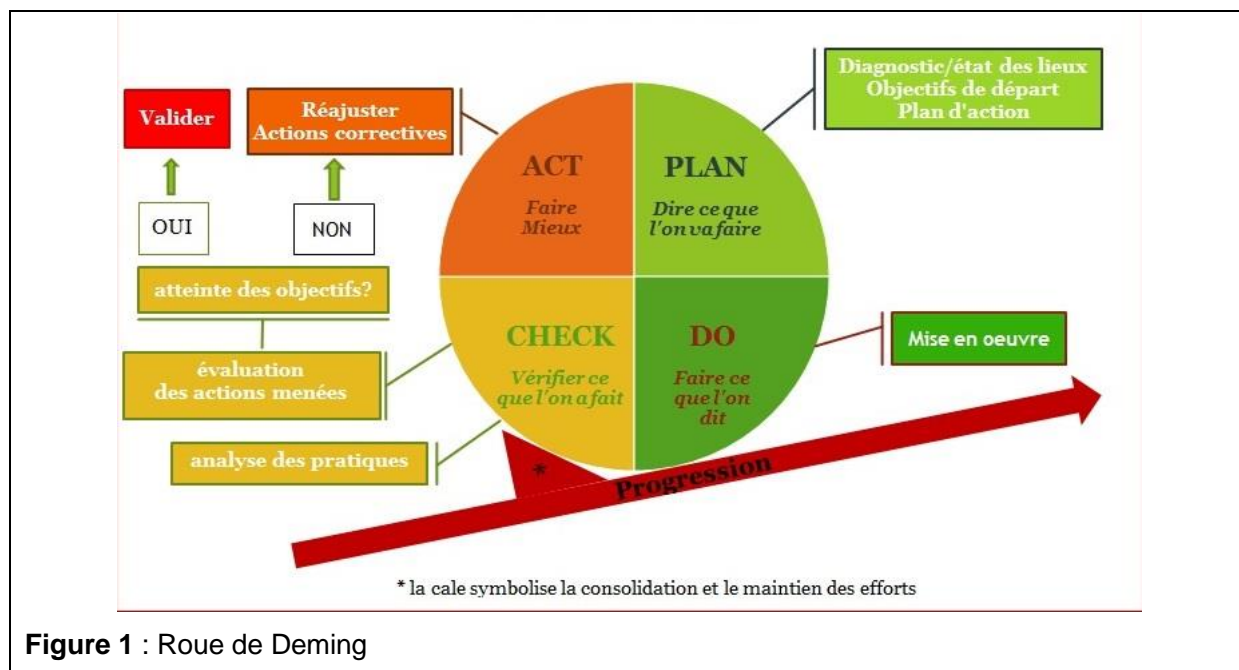


Figure 1 : Roue de Deming

P : Plan = planifier. Cette étape consiste à définir un sujet ou un problème, afin d'identifier des solutions à mettre en œuvre. Il faudra finaliser cette étape par un plan d'actions définissant les acteurs et le calendrier.

D : Do = réaliser. Cette étape est la mise en œuvre effective des plans et actions définies précédemment.

C : Check = vérifier. C'est l'étape de vérification de l'efficacité des actions entreprises. Pour cela on peut utiliser des mesures, des indicateurs, des observations. Un délai peut être défini selon la nature de l'action. Si les actions se révèlent inefficaces, il peut être nécessaire d'effectuer des ajustements en revenant à l'étape P.

A : Act = assurer et améliorer. C'est l'étape de finalisation de la démarche pour assurer la pérennité des résultats des actions mises en œuvre. Il convient d'élaborer ou de mettre à jour l'ensemble des documents s'y rapportant. Il s'agit également d'identifier des améliorations, en revenant à l'étape P pour les mettre en œuvre.

1. GENERALITES

1.1. L'hôpital Robert Debré

Situé aux portes de Paris, l'hôpital universitaire mère-enfant Robert Debré, est l'un de 12 GH de l'AP-HP. Né de la restructuration de la pédiatrie du nord et de l'est parisien, il est le résultat de la fusion des hôpitaux Herold (18^è arrdt) et Bretonneau (19^è arrdt), et fête cette année ses 30 ans.

Conçu comme un ensemble architectural original par Pierre Riboulet, c'est un vaisseau ouvert sur la ville par ses immenses terrasses, il permet d'y pénétrer, notamment pour les enfants, sans avoir la sensation d'entrer dans une unité de soin. Lieu de vie agréable et familier, il est aussi une école, un lieu de manifestation, une maison de l'enfant, une maison de l'adolescent et une maison des parents.

Il est par son volume d'activité le plus grand hôpital pédiatrique français. Sa vocation est la prise en charge des enfants, adolescents, femmes et futures mères. Son programme médical a pour originalité d'offrir pour une meilleure efficacité, un ensemble de disciplines coordonnées autour de la prise en charge de la mère et de l'enfant.

L'hôpital Robert Debré en quelques chiffres (2016) c'est :

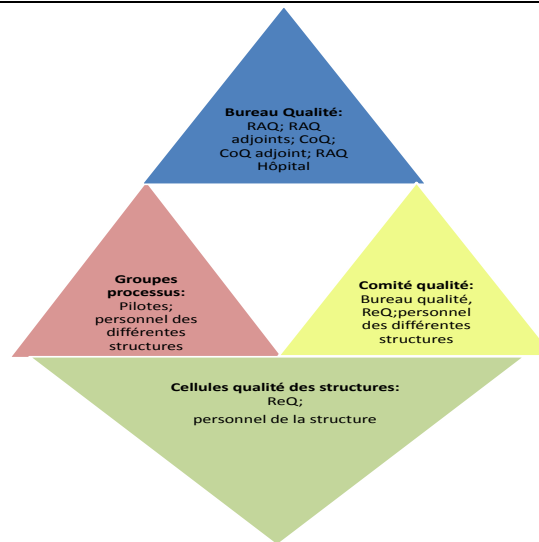
- Une activité organisée en 5 pôles regroupant 20 services, départements et unités fonctionnelles
- 412 lits et berceaux et 75 places en hôpital de jour
- Plus de 315000 patients pris en charge dont 99204 passages aux urgences pédiatriques et 161270 consultations
- une équipe de 2870 professionnels dont 442 personnels médicaux et 1880 personnels soignants

1.2. Le Laboratoire de Biologie Médicale du CHU

Le LBM fait partie du pôle Pôle « Biologie Recherche et Produits de santé ».

Il regroupe les laboratoires des différentes disciplines de la biologie médicale : Biochimie, Microbiologie, Hématologie, Immunologie, Génétique moléculaire, cytogénétique, anatomo- et foetopathologie.

Il est entré dans la démarche d'accréditation à la norme ISO 15189 depuis novembre 2013 et il était accrédité en février 2018 à 63,8%. L'organisation de ses structures qualité est décrite en figure 2.



« **Le bureau qualité** pilote la démarche qualité du pôle, définit la politique qualité du LBM, rédige les procédures transversales relatives au processus de management de la qualité et prépare les réunions du comité qualité et la revue de direction. »

« **Le comité qualité** approuve la démarche qualité du pôle, participe à la relecture des documents transversaux et valide leur diffusion, choisit les thématiques de travail des groupes transversaux. »

« **Les groupes processus** : rédigent les documents transversaux et assurent le suivi du processus (identification et maîtrise des risques associés). Un pilote est désigné pour chaque processus. »

« **Les cellules qualité** rédigent les procédures spécifiques aux structures et assurent, par l'intermédiaire du ReQ ou du gestionnaire documentaire, la diffusion des documents transversaux au sein de chaque structure. Elles participent à la réalisation des objectifs qualités.»

Figure 2 : Organisation Qualité du Laboratoire de Biologie Médicale de l'Hôpital Robert Debré

Les réunions qualité mensuelles du LBM rassemblent les personnes du comité qualité. Elles sont organisées de façon pluridisciplinaire avec un maximum d'hétérogénéité afin de balayer au mieux toutes les problématiques de la structure. Ces réunions mensuelles permettent de discuter de l'état d'avancement des projets et des plans d'actions établis par le comité Qualité dirigé par le bureau Qualité.

Le logiciel qualité utilisé par le LBM depuis 2015 est Kalilab comprenant les modules de gestion documentaire, gestion du matériel, produits et stocks, qualité, gestion du personnel, gestion des fiches qualités (Non conformités (NC) exception faite des NC pré-analytiques qui sont gérées dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL)). Le module de validation de méthodes est présent, mais ayant commencé nos dossiers avant le déploiement du logiciel, nous ne l'avons pas utilisé à ce jour.

1.3. Le laboratoire d'immunologie biologique

Le laboratoire d'Immunologie est divisé en 2 secteurs distincts comptant chacun un biologiste ReQ du secteur

1.3.1. Le secteur de Culture cellulaire, cytométrie en flux, immunité humorale (CCH).

L'équipe est composée de 5 technicien(ne)s et 1 biologiste. Les examens réalisés dans ce secteur sont :

- Phénotypages lymphocytaires en cytométrie de flux, dans le cadre des suivis post-greffes de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), le dépistage des déficits immunitaires, le suivi des enfants infectés par le VIH
- Analyse de reconstitution immunitaire dans les suivis post-greffes de CSH utilisant des Test de Transformation Lymphoblastique (TTL) par stimulation avec des antigènes spécifiques (toxine tétanique, candidine, tuberculine, CMV, AdV...) ou des mitogènes non spécifiques (PHA, CD3/CD28, ConA, PWD)
- Dosage pondéral des Immunoglobulines (Ig), des sous classes IgG et étude du système du complément, dans le cadre de la recherche de déficits immunitaires ou du système du complément, du suivi des patients de néphrologie, du suivi des patients en post greffe de CSH
- Dosage des IgE totales et spécifiques de toute une gamme d'allergènes dans le cadre du dépistage des allergies alimentaires et respiratoires.
- Tests Quantiféron dans le cadre du dépistage, diagnostic et suivi de la tuberculose

Il est actuellement accrédité pour environ 50% de son activité.

1.3.2. Le secteur histocompatibilité (HLA)

Ce secteur fonctionne avec une équipe de 4 technicien(ne)s et 1 biologiste. Il réalise des examens dans deux types d'activités distinctes dans leur finalité mais utilisant les mêmes techniques d'analyses.

- a) Le génotypage HLA des patients, des donneurs potentiels apparentés ou non apparentés dans le cadre des greffes de CSH.

Le nombre de greffes de CSH effectuées à l'hôpital R. Debré a été de 60 en 2017.

Différents cas de figure sont envisageables dans la prise en charge lors d'une greffe de CSH. Ils sont fonction du patient, de la pathologie et du contexte (Annexe 1). Le choix de la pertinence des analyses à réaliser et de la résolution voulue est fait selon les critères définis dans un arbre décisionnel établi et documenté par le laboratoire.

La prestation de conseil concernant cette partie greffe de CSH est indiquée sur le compte-rendu des patients et discutée notamment dans les échanges téléphoniques et courriels et lors des réunions clinico-biologiques hebdomadaires de coordination autour de la prise en charge des enfants des services d'oncohématologie pédiatrique des hôpitaux Robert Debré et Armand Trousseau.

b) Le deuxième axe d'activité du secteur est le génotypage HLA dans le cadre d'une recherche d'allèles ou d'haplotypes associés à certaines maladies. Les principaux allèles recherchés au laboratoire sont :

- ✓ l'allèle HLA-B*57:01 associé à l'hypersensibilité à l'Abacavir.
- ✓ L'allèle HLA-B27 chez les patients atteints de spondylarthrite ankylosante.
- ✓ Certains haplotypes DQA1/DQB1 dans le cadre de la narcolepsie.
- ✓ Certains haplotypes DRB1/DQB1 pour le diabète insulino-dépendant.
- ✓ Certains allèles DRB1* pour la polyarthrite rhumatoïde.
- ✓ Les haplotypes DQ2/DQ8 pour la maladie cœliaque.
- ✓ L'allèle HLA-B*58:01 associé à l'hypersensibilité à Allopurinol.

La prestation de conseil est rendue sur le compte-rendu du patient, indiquant la présence ou non de l'allèle ou de l'haplotype de susceptibilité à la pathologie diagnostiquée ou envisagée. Elle fait aussi partie intégrante des correspondances téléphoniques et courriels entre biologistes et cliniciens. Toute prescription doit inclure un consentement éclairé du patient.

Les réunions technico-biologiques hebdomadaires du secteur, pendant lesquelles tous les dossiers des patients en attente de greffes sont revus, sont aussi l'occasion d'une réunion qualité ou sont discutés tous les points de l'assurance qualité en cours, les résultats des EEQ et l'état d'avancement des projets. Ces réunions font l'objet d'un compte rendu dont la diffusion et la lecture sont tracées.

Le secteur HLA est actuellement accrédité pour 100% de son activité soumise à accréditation à la norme ISO 15189.

1.4. Mes rôle et missions au LBM de l'hôpital Robert Debré

Je fais partie de l'équipe des quatre techniciens du secteur HLA depuis 2006.

Nous sommes tous les quatre habilités à toutes les activités du secteur HLA. De plus, nous avons mis en place un planning de roulement des tâches récurrentes (gestion des besoins réactifs, maintenances mensuelles, mise à jour des fichiers et bases de données, test des arrivages, etc...) afin que chacun soit formé, habilité et responsabilisé à l'ensemble de ces processus.

Chacun d'entre nous assure également une charge de référence : qualité, métrologie, personnel compétent en radioprotection, informatique, gestion documentaire.

Dans ce cadre, je suis référent informatique chargé du paramétrage du SIL « Lab400 » (dans un proche avenir « Glims »). Je suis également administrateur para-mètreur du logiciel Kalilab. En missions transversales pour le LBM, je suis membre du groupe processus informatique « infolabo ».

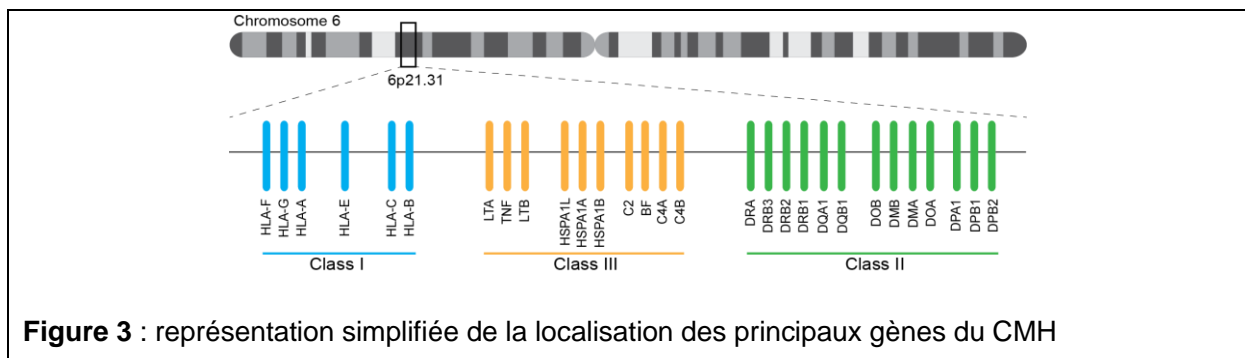
Dans le cadre de mes fonctions qualité, je participe en collaboration avec le ReQ du secteur aux dossiers de validation de méthode, notamment sur la partie recueil et traitement des données statistiques, ainsi qu'aux réunions du Comité Qualité du LBM.

2. L'HISTOCOMPATIBILITE ET SES PROBLEMATIQUES

2.1. Le système HLA ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Le CMH a été découvert par le français Jean Dausset, professeur de médecine qui a reçu le prix Nobel de médecine en 1980 pour ses travaux débutés en 1952.

Les gènes du CMH sont situés sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) (figure 3). L'ensemble des gènes s'étend sur environ 3,5 Méga bases. Ils codent pour des protéines présentatrices d'antigènes impliquées dans la reconnaissance du soi et la réponse immunitaire.



Depuis sa découverte, il a permis des avancées considérables dans le développement et la prise en charge des greffes d'organes et de CSH. Il a également permis de mieux comprendre la complexité et la variabilité des marqueurs tissulaires et de la réponse immunitaire associée.

Une des grandes caractéristiques de ces gènes HLA est leur polymorphisme avec un nombre de plus en plus importants d'allèles connus pour chaque gène de classe I (A, B, C) et de classe II (DR, DQ, DP) (figure 4). Cette grande variabilité nous oblige à utiliser des techniques toujours plus performantes et résolutive. Nous bénéficions pour cela du bond technologique et bio-informatique actuel.

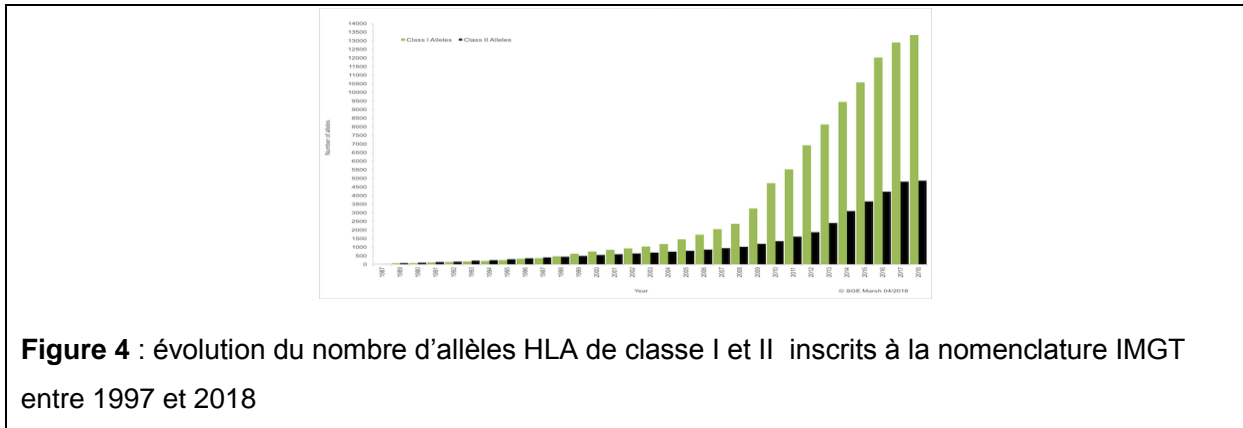


Figure 4 : évolution du nombre d'allèles HLA de classe I et II inscrits à la nomenclature IMGT entre 1997 et 2018

Deux grands groupes de locus (gènes) sont définis et impliqués dans la réaction immunitaire lors des greffes. Les locus de Classe I dont les molécules sont présentes à la surface de pratiquement toutes les cellules nucléées. Les locus de classe II dont l'expression est limitée aux cellules présentatrices d'antigène différenciées (cellules dendritiques, monocytes/macrophages et lymphocytes B). Leur fonction physiologique est de présenter aux lymphocytes T des antigènes (digérés en petits morceaux, les peptides) externes ou internes aux cellules.

Au laboratoire nous réalisons les typages des locus de Classe I : A, B et C et en Classe II : DRB1, DQA1, DQB1. Dans le cadre de l'amélioration de la prise en charge des patients et en accord avec les cliniciens, la prochaine étape est la mise en place du typage DPB1. Ces choix reposent sur les locus les plus importants pour assurer la compatibilité clinique des greffes de moelle.

2.2. Nomenclature internationale

Afin de gérer au mieux le polymorphisme des allèles HLA, leur identification est organisée de façon unique par le « [Immuno Polymorphism Database-IMGT/HLA](#) » (figure 5).

Exemple : pour l'allèle HLA-A*24:02:01:03L

A* ⇒ locus
24 ⇒ série allélique, sérologie générique
02 ⇒ polymorphisme exonique
01 ⇒ mutation synonyme ou silencieuse
03 ⇒ polymorphisme intronique
L ⇒ expression de la protéine (N=nul, L=low, S=secr, Q=quest)

Figure 5 : codification des allèles HLA dans la nomenclature IMGT

La résolution du typage HLA correspond à la précision obtenue à 2, 4, 6 ou 8 digits (chiffres après le *), c'est à dire la précision sur la séquence protéique traduite, notamment au niveau de la poche de fixation du peptide présenté à la surface cellulaire. Cette partie de la protéine est codée par les exons 2 (classe II), ou 2 et 3 (classe I) du gène.

De plus, afin de faciliter l'écriture des groupes d'allèles HLA dans les fichiers de DVMO, une codification internationale a été mise en place : les codes NMDP (National Marrow Donor Program). Pour exemple : HLA-DRB1*01:AD correspond à l'association des ambiguïtés DRB1*01:01 ou 01:04 et HLA-DRB1*01:AR aux ambiguïtés 01:01 ou 01:03 ou 01:06 ou 01:10.

2.3. Organisation et accréditation du typage HLA en France

La communauté d'immunologie a mis en place, au niveau européen, une organisation qui structure et régleme le diagnostic HLA. Tout laboratoire en France, a l'obligation réglementaire d'être accrédité par la « *European Federation of Immunogenetics* » (*EFI*) pour être autorisé à rendre des résultats de typage HLA aux centres donneurs.

L'accréditation *EFI* est une démarche d'assurance qualité nécessitant de répondre à des exigences (*standards EFI*. Cf. *lien internet en page 6*) pour les typages HLA réalisés au laboratoire. Après un audit initial d'accréditation, le maintien d'accréditation est assuré par des autoévaluations annuelles et un audit de surveillance sur site tous les 3 ans. Il se rapproche en cela de la gestion de portée flexible.

A l'AP-HP, quatre laboratoires, dont le laboratoire d'Immunologie de l'hôpital Robert Debré, sont accrédités par l'*EFI*. En province, ce sont principalement les EFS qui sont accrédités pour ce diagnostic, ainsi que quelques CHU.

Le laboratoire d'immunologie de l'hôpital Robert Debré est accrédité par l'*EFI* depuis 2001.

2.4. Les différentes techniques utilisées au laboratoire

- La PCR SSP Olerup (Annexe 2) Il s'agit d'un ensemble d'amplifications spécifiques dont le profil de positivité, obtenu par migration sur gel d'agarose, donne le résultat du typage

HLA. Chaque tube réactionnel contient un contrôle interne d'amplification et chaque kit contient un puits de blanc réactifs.

Cet examen a été accrédité en analyse qualitative en portée B en 2014.

- La PCR SSO Labtype Onelambda (Annexe 3): Cette technique met en œuvre une amplification des exons d'intérêt de chaque locus. La spécificité est apportée, lors de la phase d'hybridation, par des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'allèles, coatées à la surface de microbilles différenciables. Chaque série d'amplification pour chaque locus contient un témoin négatif et un ADN CQI. Chaque puits réactionnel contient, suivant le locus, 1 à 4 billes, *Positives Control* (PC) et une billes *Negative Control* (NC). A partir de ces billes sont calculées la *Normal Value* (NV) et la valeur seuil de chaque bille.

Cet examen a été ajouté à la ligne de portée IC5 en février 2016, en analyse qualitative en portée B, revu et modifié en 2017 lors du changement d'automate et de kits réactifs.

Ces deux techniques permettent de rendre un résultat à 2 ou 4 digits.

- Le séquençage NGSgo GenDX (Annexe 4): Utilisée en diagnostic depuis septembre 2016, cette technique est encore dans le fichier des actes RIHN (Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature) de la DGOS, donc non soumise à l'accréditation. C'est une technique de séquençage nouvelle génération sur plateforme Illumina (Miseq). Chaque série d'amplification pour chaque locus contient un témoin négatif et un CQI (ADN de lignée cellulaire, de typage connu validé). Actuellement la technique NGS permet un typage sans ambiguïté en 6 digits (ex : A*24:02:01).

Cet examen sera porté à l'accréditation en fin d'année 2019 ou 2020. Nous aurons à ce moment-là une vision à moyen terme du fournisseur choisi suite à l'appel d'offre du marché public en cours, et toute latitude pour rédiger le SHFORM correspondant.

3. LA PORTEE FLEXIBLE D'ACCREDITATION

3.1. Définition de la portée flexible d'accréditation

En 2010 le COFRAC a défini dans le SH REF 08 et le SH INF 50, la notion de portée flexible dans le cadre de l'accréditation à la norme ISO 15189. Cette notion est définie comme suit :

« La portée d'accréditation est l'énoncé formel et précis des activités qui concernent la demande d'accréditation d'un laboratoire. »

« La portée flexible correspond à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du Cofrac, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées (portée B) ou d'utiliser sous accréditation les révisions successives de méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées (portée A)»

Les portées d'accréditation sont composées de lignes de portées, regroupées au sein de Domaines, Familles, Sous-Domaines et de Sous-Familles rattachées selon la thématique de la section Santé humaine.

Une portée flexible est exprimée sous la forme d'une liste de compétences. Elle permet entre deux visites du COFRAC d'adopter des révisions successives de méthodes ou de nouvelles méthodes, en informant le COFRAC. Celui-ci fait confiance au LBM pour mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la maîtrise de la portée d'accréditation dans les conditions répondant à la norme ISO 15189. La bonne cohérence de l'ensemble des mesures mises en œuvre sera vérifiée lors de la visite de surveillance suivante. La description de la revue des portées d'accréditation doit être revue et retravaillée régulièrement. Ses revues sont transmises au COFRAC pour information.

Le LBM a défini dans sa procédure de gestion de portée flexible, les dispositions mises en œuvre pour garantir la maîtrise de la portée d'accréditation. Dans cette procédure sont passés en revue tous les processus impliqués par les changements intervenus. Ils sont regroupés et suivis dans le formulaire de gestion de portée flexible (Annexe 5). Depuis le dernier audit COFRAC de 2018, une nouvelle version plus précise de ce formulaire a été réalisé par le LBM et sera désormais utilisée.

Ces dispositions portent notamment sur :

- ✓ les dispositions organisationnelles mises en œuvre pour maîtriser la portée d'accréditation : procédure de gestion de portée flexible.
- ✓ le processus de revue, confirmation et autorisation d'emploi des méthodes : formulaire de gestion de portée flexible.
- ✓ la compétence et la capacité du personnel à pratiquer chacune des techniques : formation, habilitation, maintien des compétences
- ✓ les dispositions qui décrivent l'ensemble du processus sur la base du dossier de vérification de méthode (d'après SH REF 08).

Il convient donc à chaque fois qu'un changement intervient sur un examen d'une ligne de portée accréditée, d'en analyser l'impact sur chacun des processus et d'établir une analyse de risques et un plan d'action afin de garantir des conditions optimums de qualité.

3.2. Etat des lieux de l'accréditation ISO 15189 au laboratoire HLA.

La ligne de portée des examens de notre laboratoire HLA définie dans le SH-INF-50 rév04 – avril 2017 est la suivante :

(NB : les modifications liées à la révision 05 du SH INF 50 intervenue au cours de la rédaction de ce mémoire, seront abordées au chapitre 4.8).

Domaine : Biologie médicale

Famille : Hématologie-Immunologie-Biologie de la reproduction

Sous-domaine : Immunologie

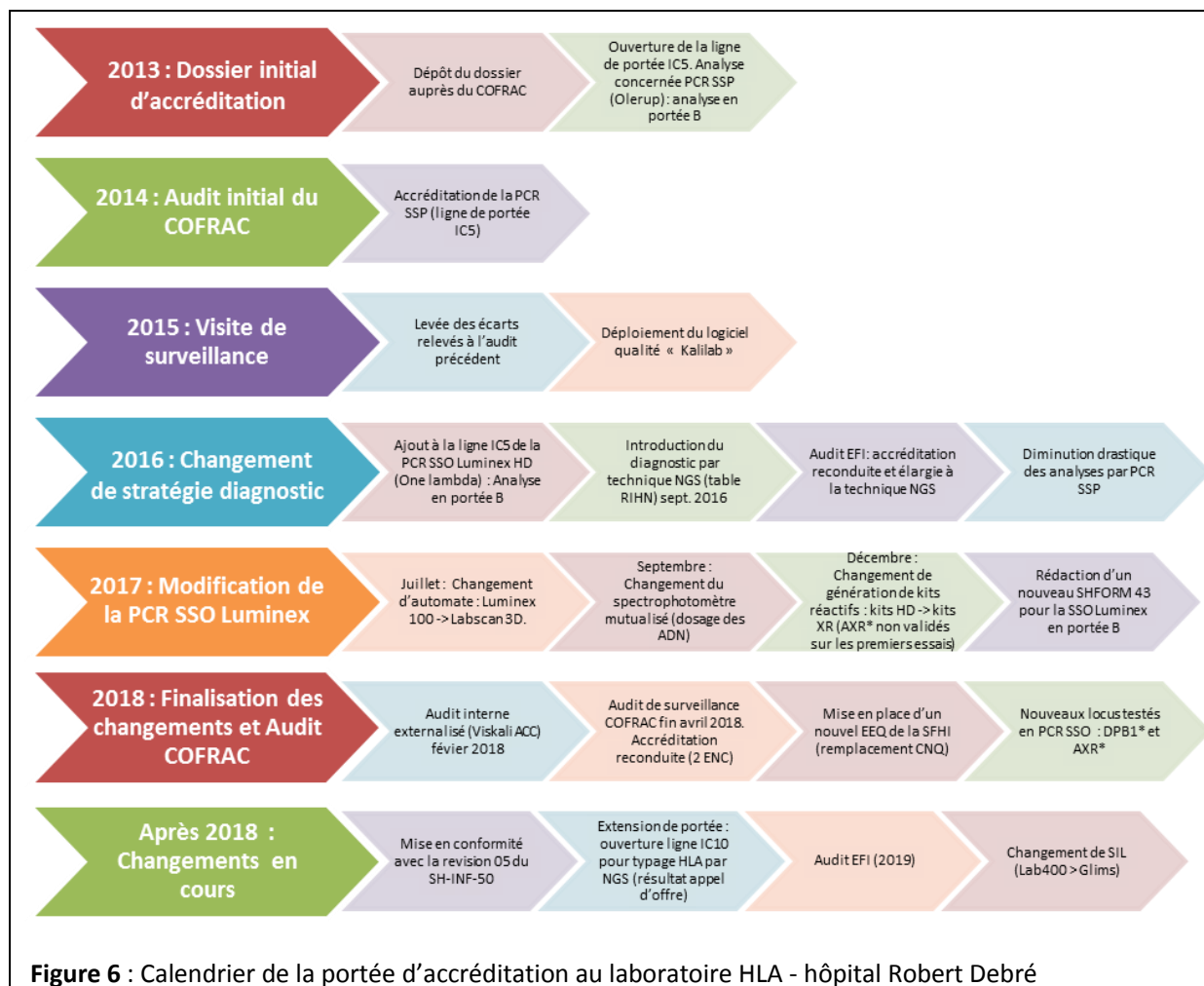
Sous-Famille : Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité (groupage HLA; ICELHISTOBM)

IC5	Échantillons biologiques d'origine humaine	Typage HLA	Méthode de type qualitatif Prétraitement : Extraction d'ADN Principe général des techniques : - PCR-SSP, PCR-SSO, PCR-SBT - PCR en temps réel...	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	
-----	--	------------	---	--	--

A ce jour, 100% des examens que nous réalisons, soumis à l'accréditation, sont accrédités sur la ligne de portée IC5. Ils sont tous réalisés par des techniques de biologie moléculaire dans le cadre des génotypages HLA.

3.3. Gestion de la ligne IC5 en portée flexible

Ouverte en 2013 avec la technique de PCR-SSP (kits Olerup), la ligne de portée d'accréditation IC5, a depuis été soumise dans notre laboratoire à de nombreux changements résumés dans la figure 6. Nous n'avons pas toujours pu maîtriser le planning des changements, comme nous l'aurions souhaité du fait de nombreux éléments extérieurs qui nous obligent à une adaptation constante pour garantir la qualité et la sécurité de nos résultats avec les moyens dont nous disposons.



Les principales étapes initiales ont été :

- **2014** : Accréditation pour la PCR SSP (analyse qualitative en portée B) suite à l'audit COFRAC initial de 2014, puis à l'audit de surveillance de 2015 (levée des écarts).
- **2016** : Ajout de la technique de PCR-SSO en technologie Luminex 2D (kits Labtype HD Onelambda). Cette technique permet de rendre des résultats qualitatifs (identification d'un haplotype d'allèles HLA) à partir de données quantifiables (fluorescence normalisée vis-à-vis de contrôles positifs). Cette analyse a été inscrite en analyse qualitative en portée B du fait d'adaptations locales par rapport aux données fournisseur. Ces adaptations ont été testées et justifiées dans le SH FORM 44, version 1 (mars 2016).

Toutefois, la notion d'analyse semi-quantitative n'est pas retenue par le COFRAC dans le SH GTA 04.

«Elles fournissent des résultats issus de données numériques. Remarque : Le dénombrement est une propriété quantitative, d'unité égale à 1. Les résultats issus d'un ratio (%) sont également considérés comme des résultats quantitatifs »

Nous nous voyons contraint d'effectuer une partie des tests liés à une analyse quantitative. Cela explique pourquoi dans la nouvelle version du SHFORM 43 (déc. 2017), nous avons effectué ces vérifications d'une analyse quantitative de portée B.

- **2016-2017** : Développement du typage HLA par la technique de NGS hautement résolutive (6 à 8 digits), entraînant une très forte diminution de la PCR-SSP haute résolution. Cette dernière, devenue obsolète en haute résolution, n'est pratiquement plus utilisée qu'en kits de basse résolution (2 digits) pour les contrôles effectués sur les locus présentant une homozygotie (*Standards EFI cf. lien internet page 6*). Les tests de validation de l'utilisation du typage par NGS ont été réalisés par les typages en double (PCR SSP haute résolution versus NGS) de février 2016 à septembre 2016 (échantillons patients, CQI (lignée cellulaire immortalisée) et EEQ). Le passage au diagnostic en routine est mis en place à partir de Septembre 2016.

Cette analyse est actuellement réalisée dans les mêmes conditions qu'une analyse accréditée (habilitation et maintien des compétences, gestion documentaire, maintenance du matériel, qualification logiciels, utilisation de CQI et rendu des résultats des EEQ). Elle est de plus déjà accréditée par l'EFI depuis le dernier audit sur site en mai 2016.

3.4. Focus sur les modifications récentes, impactantes réalisées avant audit COFRAC (avril 2018).

3.4.1. Changement du spectrophotomètre mutualisé.

En 2017, le LBM a été contraint de changer le spectrophotomètre mutualisé sur la plateforme de génétique (Nanodrop 1000). Nous utilisons ce matériel pour le dosage des ADN extraits lors du prétraitement des échantillons. Le fournisseur nous ayant prévenu à l'avance de l'obsolescence programmée de ce lecteur (arrêt des réparations nécessaires et changements de pièces lors des maintenances préventives annuelles), le laboratoire a entamé une revue des appareils du marché répondant le mieux aux besoins des différents utilisateurs de la plateforme. Le choix collectif s'est porté sur l'appareil « Varioskan lux » (Thermofisher) offrant la possibilité d'effectuer des dosages en spectrophotométrie par absorbance et en fluorométrie.

Pour la spectrophotométrie, qui est la technique que nous utilisons dans le laboratoire HLA, la lecture est faite sur une plaque spécifique à 16 positions (plaque μ drop, figure 7). Le principe de lecture des DO est le même que celui du Nanodrop 1000 : un ménisque formé à partir d'une microgoutte de l'éluât d'ADN (2 μ l) étirée à une longueur précise et fixe (trajet optique de lecture de DO). La différence entre les deux appareils résulte du fait que pour le « Varioskan lux », 16 dosages sont faits en simultanés alors que sur le Nanodrop les dosages sont unitaires. Dans le

protocole utilisé au laboratoire un blanc est effectué sur chaque position de la plaque, à toutes les longueurs d'ondes avant chaque lecture du spectre de DO.



La formation par le fournisseur a consisté principalement en la prise en main du logiciel de pilotage de l'appareil (Septembre 2017).

Dans la mesure où la méthode de dosage entre les deux appareils est la même (mesure d'absorbance), nous avons limité, pour le laboratoire HLA, la vérification de méthode à une comparaison entre les deux appareils sur un nombre important d'échantillons représentatifs de l'activité du laboratoire (60 dosages) ainsi qu'une étude de répétabilité sur 2 lectures de plaques.

3.4.1.1. Comparaison de méthodes :

Protocole : Pour la comparaison de méthode, en pratique nous avons comparé les concentrations [ng/ μ l] et les DO obtenues sur le Varioskan (xi) et le Nanodrop (yi) pour 60 patients couvrant l'étendue des valeurs obtenues en routine (hautes à basses). Pour chaque série, nous avons calculé la moyenne et l'écart-type.

Résultats : Nous avons établi les graphes des différences (xi-yi) fonction de xi et celui des rapports (yi/xi) fonction de xi. (Annexe 6)

La figure A, montre une répartition homogène des valeurs négatives et positives, ce qui élimine l'existence d'un biais. Les figures B et C montrent une répartition homogène des valeurs, hormis une discordance pour 3 valeurs (annexe 6-C). Les discordances étaient dans les 2 sens et n'ont pas eu d'impact sur la technique PCR SSO faite avec les ADN des trois échantillons (les MFI > 1000, pas de billes faussement positives ou faussement négatives, et aucun changement de cut-off de la Valeur Normalisée (NV).

Conclusion : La différence des moyennes de concentrations obtenues en comparant les deux appareils est égale à 4,4%. L'analyse de risque et l'expérience en biologie moléculaire ont montré que cela reste non significatif pour des ADN qui entrent ensuite dans une réaction de multiplication exponentielle par PCR.

3.4.1.2. Répétabilité

Protocoles : Nous avons réalisé 2 séries de dosages successives d'un même échantillon d'ADN sur les 16 positions soit un total de 32 lectures.

Résultats : La valeur moyenne de concentration est de 109,8 ng/µl à 260nm, avec un coefficient de Variation de 5,2%. Le ratio de DO (260nm (ADN) / 280nm (protéines)), qui rend compte de la pureté de l'éluât, est en moyenne à 1,8 (exactement la valeur cible en biologie moléculaire), ce qui représente un % de CV de 4,2%.

Conclusion : Un % de CV de 5,2% est non significatif pour un ADN qui entre ensuite dans une réaction de multiplication exponentielle par PCR.

3.4.1.3. Dossier de qualification complet

Enfin, du fait de la mutualisation de l'appareil, un protocole de vérification de méthode a été réalisé par le laboratoire de génétique sous la supervision de l'ingénieur du service. Le SH FORM 43 correspondant conclut à la conformité du nouvel appareil. Cependant, il porte sur l'analyse en fluorométrie et non en absorbance qui est la technologie que nous utilisons.

Pour étoffer notre dossier, nous avons mis en place à partir de juin 2018, un ADN CQI de dosage pour un suivi des performances de l'appareil en lecture d'absorbance, en vérifiant la conformité des résultats.

3.4.2. Modifications de la technique de PCR SSO Labtype (2017 – 2018)

En Annexe 7 est présentée une analyse de risque de ces modifications techniques par la méthode des 5M sous la forme d'un diagramme d'Ishikawa.

Toutefois, un schéma QQQQCP (figure 8), m'est apparu comme un outil d'analyse plus pertinent dans ce cas de figure. Il permet de mettre clairement l'accent sur les éléments essentiels à prendre en compte et à étudier, ainsi que l'organisation à adopter.

QUI?

- Qui est en charge du projet?
 - Fournisseur (commercial, ingénieur développement)
 - Biologiste, TLM
- Qui intervient dans le projet?
 - Fournisseur (ingénieur développement, SAV, commercial, informaticien)
 - Biologiste, TLM, Cadre, service biomedical, service informatique

QUAND?

- Date et durée des tests
 - Installation avril 2017. Tests préliminaires de mise en service de l'automate 3 mois. Mise en service Jul 2017
 - Tests préliminaires sur les kits XR (juil 2017 à nov. 2017)
 - Dossier de validation de méthode provisoire et mise en service des kits XR : Déc. 2017
 - Finalisation du dossier de validation de méthode : février 2018
- Durée formation personnels
 - 2 jours sur site en situation. Formation à l'utilisation réduite car les logiciels de pilotage et d'analyse sont inchangés
 - 1 jours de débriefing et ajustements

Où?

- Où sera réalisée l'analyse?
 - Même localisation que la technique utilisée actuellement. Pièce post-PCR climatisée
- Quel sont les exigences environnementales?
 - Mêmes conditions environnementales (température, hygrométrie, poussière, lumière) pour l'automate et les kits en cours
 - Mêmes conditions de stockage

Quoi?

- Changement d'automate: Luminex 100 > Labscan3D
- Changement de kits nouvelle génération développé par la société Onelambda
- Commandes et Gestion des stocks
- Faut il envisager d'autres changements ? : NON (même incubateur, même laveur, même pipettes)

Comment?

- Quels tests immédiats pour l'automate?
 - Qualification par comparaison de méthode entre les deux automates (EEQ)
- Quels tests avant mise en production pour les kits
 - Comparaison de méthode entre les 2 kits (EEQ),
 - sensibilité spécificité.
 - contamination inter-échantillons,
 - répétabilité,
 - variabilité inter-opérateur,
- Quels tests différables?
 - Reproductibilité
 - Robustesse
 - Adaptations techniques
 - Suivi des performances
- Quelles est le travail de gestion documentaire à réaliser?
 - Lister les procédures, mode opératoires, fiches d'instructions, documents externes à modifier
 - Rédiger les nouveaux documents de travail, de maintenance, etc...
- Paramétrages informatiques (Sil, logiciels embarqués, outils de gestion interne)
- Bibliographie et information auprès des autres laboratoires HLA

Pourquoi?

- Augmentation du nombre d'allèles nécessitant des évolutions techniques.
- Disparition des kits ancienne génération, prévue en fin d'année 2018 selon la disponibilité des stocks

Figure 8 : QQQQCP des modifications de la PCR SSO Luminex

3.4.2.1. Changement d'automate (Luminex 100 → Labscan 3D)

Toujours contraint par le développement exponentiel du nombre d'allèles HLA en classe I et II, inscrits à la nomenclature, Onelambda fabriquant des kits Labtype, a développé une nouvelle gamme de kits offrant 5 fois plus de possibilité de combinaisons d'allèles (Annexe 3). Un inconvénient est cependant associé à l'utilisation de ces nouveaux kits. Ils ne peuvent être utilisés que sur la dernière génération d'automate Luminex, le « Labscan 3D » alors que les kits HD en cours sont utilisables sur les deux automates Luminex 100 et Labscan 3D.

L'automate « Luminex 100 » utilisé dans la technique de PCR SSO Labtype par notre laboratoire est une mise à disposition par la société Ingen commercialisant en France les produits développés pour le diagnostic HLA par la société américaine Onelambda. En prévision de la commercialisation des kits nouvelle génération en remplacement des kits utilisés au laboratoire, la société Ingen a donc mis à disposition dans notre laboratoire un automate « Labscan 3D ». Dans les trois mois qui ont suivis nous avons procédé aux tests nécessaires pour qualifier l'automate et pouvoir rendre au fournisseur le « Luminex 100 » que nous utilisions jusqu'à présent.

Ce qui change :

- La capacité de l'automate à différencier 500 billes par une lecture de triple fluorescence interne au lieu de 100 en double fluorescence
- Système de prélèvement de l'échantillon (seringue à double piston)
- La calibration de l'appareil et les kits associés

Ce qui ne change pas :

- Le principe général de la technologie employée
- Les logiciels de pilotage de l'appareil : « xPonent » et d'analyse / interprétation « HLA Fusion ».
- les conditions environnementales et le positionnement de l'automate en pièce climatisée post-PCR.

La formation faite par le fournisseur à l'utilisation et la prise en main pour les technicien(ne)s de ce nouvel automate ont été grandement facilitées et accélérées du fait que les logiciels embarqués, interfaces utilisateurs (« xPonent » pour le pilotage et « HLA Fusion » pour l'analyse) sont inchangés.

Dans un premier temps nous avons procédé à la qualification immédiate de l'appareil « Labscan 3D » avec les kits HD en cours par :

✓ une étude qualitative :

Protocole : Quatre plaques (une par technicien) ont été passées en double sur le « Luminex 100 » et le « Labscan 3D », en utilisant les kits HD en cours. Nous avons vérifié les critères de validation technique définis dans notre procédure. Au total : 28 A / 62 B / 14 C / 40 DRB1 / 23 DQB1 ont ainsi été testés.

Résultats : les codes NMDP rendus pour tous les typages réalisés sont identiques sur les deux automates.

Conclusion : Nous observons une concordance des résultats qualitatifs de 100%.

✓ une étude quantitative

Protocole : Le test est effectué avec le kit DQB1, réalisé en parallèle en double lecture sur les deux automates Luminex 100 et Labscan 3D.

Nous avons effectué un suivi du Témoin CQI SSO (ADN de typage connu et validé extrait, congelé, passé à chaque expérience pour chaque locus), ainsi que les échantillons de 2 patients à 2 dates différentes. Nous avons comparé les NV de toutes les billes obtenues sur les deux automates et déterminé le nombre de billes avec NV identiques ou différentes.

Résultats : 80.3% des billes donnent un résultat identique entre les 2 automates. 19.7% des billes donnent des résultats différents mais sans impact sur la positivité de la bille par rapport à son seuil de positivité (cut off). Le résultat qualitatif (génotypage HLA) reste donc identique.

Conclusion : Il n'existe pas de différence significative entre les résultats des NV données par les 2 automates

✓ Conclusion :

Au vu des résultats de l'ensemble de ces vérifications, nous avons conclu que le « Labscan 3D » est conforme aux besoins et exigences définies au laboratoire.

L'appareil est mis en service en Juillet 2017, utilisé avec les kits HD en cours.

3.4.2.2. Analyse des modifications induites par le changement de kits de PCR SSO (kits HD → kits XR)

Nous avons ensuite travaillé sur les modifications induites par le changement de kits de la PCR SSO par de kits de nouvelle génération, plus résolutifs désignés sous le terme XR.

Ce qui change :

- les amorces de PCR notamment pour les locus de classe I pour lesquels des amorces d'amplification des exons 4&5, voir 6&7 pour le locus C ont été ajoutés aux exons 2 et 3 utilisés ultérieurement.
- les billes qui passent de 100 sondes différentes à 500 par puits d'analyse
- les amorces coatées à la surface des billes (marquage mono-spécifique)

Ce qui ne change pas :

- Le programme d'amplification unique pour tous les locus
- Le CQI et témoin blanc passé à chaque expérience.
- La technique d'hybridation, de lavage et de révélation des amplicons biotinylés par un complexe SAPE (streptavidine-phycoérythrine)
- Les conditions de stockages
- Les logiciels de pilotage de l'appareil : « xPonent » et d'analyse / interprétation « HLA Fusion ».

Cette analyse de PCR SSO qualitative à données quantifiables est jugée sur la pertinence des résultats de typages obtenus sur l'ensemble des données (profil de positivité) et non sur des données brutes individualisées. Pour des questions de coûts réactifs, de temps de mise à disposition et de charge de travail, nous avons été contraints de mener les tests induits par ce changement en deux parties. Ayant accès à un grand nombre d'ADN extraits d'EEQ des années précédentes nous nous sommes beaucoup appuyés sur ces ADN.

Dans un premier temps, nous avons réalisés les tests indispensables avant la mise en production et validés par une première version du SHFORM 43. Dans un second temps ont été effectués les tests dont la pertinence ne nous est pas parue bloquante pour la mise en service de ces kits, notamment les adaptations locales qui n'ont été appliquées qu'après la validation définitive du SHFORM 43.

Dès les premiers tests réalisés, le kit AXR concernant le locus A n'a pas donné les résultats escomptés. Nous avons exclu ce kit de la validation de méthode et décider de continuer un temps avec le kit du locus AHD en cours.

Le nombre d'allèles des locus DQA1 et DQB1 étant très inférieur par rapport aux autres locus, le fabricant n'a pas développé de kit XR et conserve la production du kit que nous utilisons déjà.

Les données de validation de méthode ci-dessous concernent donc les kits de nouvelle génération des locus B, C et DRB1.

Il est illusoire de vouloir suivre en continu, dans des données extraites, l'intégralité des données quantitatives de toutes les billes du système. Nous avons concentré nos analyses, lors des tests effectués, sur les billes *Positive Control* (PC) et *Negative control* (NC) ainsi que sur certaines billes dont la NV est proche de leur seuil de positivité.

3.4.2.2.1. Tests effectués avant mise en production des kits XR

- Test de contamination inter-échantillons (annexe 8) : pour une question d'efficacité, nous avons préféré effectuer ce test directement avec les kits XR plutôt que de le répéter avec les deux générations de kits dont l'une est vouée à disparaître.

Protocole : un échantillon du patient homozygote « B1 » est analysé 3 fois consécutivement (B1(1), B1(2), B1(3)), suivi d'un échantillon du patient homozygote « B2 » (B2(1), B2(2), B2(3)) également analysé 3 fois consécutives. Ces séquences sont répétées 5 fois de suite sur une même plaque d'analyse.

Le % de contamination doit être proche de zéro. Cependant, s'agissant d'une méthode qualitative à données quantifiables, il est de plus primordial que les typages restent identiques d'un échantillon à l'autre (mêmes codes NMDP).

Résultats : Les résultats obtenus permettent d'obtenir un % de contamination < 4,3% (Annexe 8).

Les typages restent identiques.

Conclusion : on peut conclure à l'absence de risque de contamination entre les échantillons passés sur une plaque de 96 puits.

- Répétabilité

Protocole : Les typages HLA-B* (classe I) et DRB1* (Classe II) d'un ADN UKNeqas (EEQ) ont été réalisés 5 fois de suite. Pour des raisons de coût, et parce que les CV obtenus sont satisfaisants, nous n'avons pas fait de répétabilité plus étendue.

Résultats : Nous avons observé le même résultat HLA-B et DRB1 (100% de concordance des typages en codes NMDP) pour les 15 tests.

Pour le locus DRB1, le CV d'une seule bille (588) était >10% (18.7%) mais cela n'a pas eu d'impact sur le rendu du résultat qualitatif car les codes NMDP étaient corrects.

Conclusion : Les données de répétabilité sont donc conformes aux limites acceptables.

- comparaison de méthode

Protocole : Dans la mesure où nos EEQ, une fois testés, sont stockés sous forme d'ADN congelés, ils sont très utiles dans les tests à effectuer avant la mise en service des nouveaux kits.

Nous avons utilisé 30 EEQ UK Neqas déjà testés avec les anciens réactifs (HD) sur le « Luminex 100 » (EEQ des années 2014, 2015 et 2016), que nous avons repris avec les nouveaux kits (XR) sur le nouvel automate.

Résultats : Ainsi, 30 EEQ en locus A/B/C/DRB1/DQB1/DQA1 soit 90 typages en HLA classe I et 90 typages en HLA classe II différents ont été comparés. Nous avons obtenu 180 résultats identiques.

Conclusion : Nous observons une concordance à 100% des résultats entre les deux générations de kits.

- Variabilité Inter-Opérateur

Protocole : Analyse des CQI réalisés par chaque technicien(ne) lors de sa série. Sur le même principe, dans le cadre du maintien d'habilitation, cette absence de variabilité inter-opérateurs est contrôlée chaque trimestre.

Résultats : Les résultats obtenus par tous les technicien(ne)s avec les kits XR sur le Labscan 3D, sont identiques (mêmes allèles et mêmes codes NMDP sur tous les locus).

Conclusion : Nous n'avons pas mis en évidence de variabilité inter-opérateurs pour l'utilisation des nouveaux kits sur le nouvel automate.

- Sensibilité et Spécificité Analytique

Protocole : La sensibilité et la spécificité ont été établies par l'analyse des données du fournisseur One Lambda (*LABType XR and CWD Typing Test*) et par l'analyse des typages HLA-A/B/C/DRB1/DQB1/DQA1 de 30 EEQ UKNEqas.

Résultats : Il existe une concordance à 100% entre les typages de référence (consensus des EEQ UK Neqas) et ceux réalisés par le laboratoire.

Conclusion : On peut donc conclure à une sensibilité à 100% ainsi qu'à une spécificité à 100%.

L'ensemble de ces premières analyses a permis de valider une première version du SHFORM43 en décembre 2017 et de mettre en place ces kits en diagnostic.

3.4.2.2.2. Tests complémentaires effectués

Afin de finaliser le dossier de validation de méthode pour la visite du COFRAC de la fin avril 2018, nous avons effectué les tests de robustesse, de fidélité intermédiaire, ainsi que les nouveaux tests concernant nos propres adaptations par rapport au fournisseur. Ces adaptations ne seront effectives et appliquées qu'une fois le dossier de validation de méthode final clos.

- Stabilité des réactifs (Annexe 9)

Protocole : Les réactifs sont conservés dans les conditions et délais recommandés par le fournisseur. Les réactifs sont suivis sur un fichier Excel sécurisé qui permet la traçabilité des lots, arrivages, des ouvertures et fin de kits et des stocks.

Un typage HLA de classe I (HLA-B*) et de classe II (DRB1*) sur le CQI ont été suivis durant la période d'utilisation d'un arrivage de chaque kit testé (8 à 10 mesures). Les MFI des billes *Positive Control* (PC) et *Negative Control* (NC), des billes Faux Positif / Faux Négatif et les résultats de typages en codes NMDP ont été analysés

Résultats : Pendant la durée d'utilisation des kits, les MFI des billes PC restent supérieures à 1000 comme préconisé par le fournisseur et les codes NMDP restent conformes aux résultats attendus. Pour tous les typages réalisés, la positivité ou la négativité de chaque bille, par rapport au seuil établi par le fournisseur est celle attendue; seuls les seuils de 2 billes faussement positives ont été changés.

Conclusion : Dans les conditions de stockage des réactifs définis par le fournisseur, la stabilité des réactifs est conforme aux besoins du laboratoire.

- Fidélité Intermédiaire (Annexe 10)

Protocole : Afin de gagner du temps, lors de chaque expérience faite avec les kits HD en cours sur le Labscan 3D qualifié, nous avons inclus un puits témoin blanc et un puits témoin CQI de chacun des trois kits XR. Réalisant une à deux expériences par semaine en routine, nous avons ainsi accumulé des données de reproductibilité sur 20 mesures entre décembre 2017 et mi-mars 2018 pour avoir suffisamment de données statistiquement interprétables.

Du fait du très grand nombre de données (500 billes différentes comptées à minima 75 fois chacune sur une vingtaine d'expériences) nous avons fait le choix d'une analyse ciblée. Pour les locus concernés, l'analyse est faite sur des billes *Positives control* (PC) (entre 1 et 4 selon les locus), la bille *Negative control* (NC) et en choisissant de plus 5 billes positives et 5 billes négatives les plus proches de leur seuil de positivité. Nous avons considéré que l'analyse des billes positives au moins à 100% ou parfaitement négatives est moins pertinente.

Pour toutes les billes sélectionnées nous avons calculé la moyenne, l'écart type et le % de CV de la Moyenne de fluorescence (MFI) pour les billes PC et NC et des valeurs normalisées exprimées en % pour les autres.

Résultats :

- Billes négatives : le panel des CV est large mais les NV varient de 1 à 18. Il n'y a aucun impact sur le rendu du résultat qualitatif. Les billes concernées restent négatives selon les

critères du fournisseur et le génotypage obtenu est conforme à celui attendu. On peut considérer qu'il n'y a donc pas d'impact sur le reste des billes parfaitement négatives éloignées de leurs cut-off respectifs.

- Billes positives : malgré une variation du CV pouvant atteindre 38% (les NV varient de 17 à 216), il n'y a pas d'impact sur le rendu du résultat qualitatif. Les billes concernées restent bien positives en comparaison au cut-off défini par le fournisseur. Le génotypage obtenu reste inchangé. On peut considérer qu'il n'y a donc pas d'impact sur le reste des billes parfaitement positives éloignées de leurs cut-off respectifs.

Conclusion : Nous avons ainsi défini qu'un CV acceptable peut être fixé \leq à 38 % pour les billes positives et ne nécessite pas d'être fixé sur les billes négatives tant que le résultat de la NV est sans impact sur le résultat qualitatif.

- Les adaptations techniques adaptées au laboratoire.

L'expérience acquise de façon empirique de la technologie PCR SSO en Luminex utilisée au laboratoire depuis janv. 2009, ainsi que l'ensemble de nos résultats d'EEQ et de CQI sur cette longue période, nous ont permis d'ajuster quelques éléments de variation de façon acceptable et sécurisée. Ses adaptations ne peuvent pas être faites en même temps sur une même analyse.

- Changement du seuil d'analyse d'une bille

Le fournisseur précise que la MFI de chaque sonde est normalisée par rapport à la MFI de la bille « contrôle positif » et de la bille « contrôle négatif ». Le résultat est exprimé sous forme d'un pourcentage de la MFI de la bille « contrôle positif ». La valeur seuil de chaque sonde a été établie par le fournisseur au moyen d'un panel de 100 à 200 échantillons d'ADN.

Lorsque le logiciel propose 2 allèles, le seuil d'une bille est parfois un peu modifié lorsque la bille est soupçonnée d'être faussement positive ou négative en raison de la rareté d'au moins un des allèles de la combinaison allélique proposée, ou de son comportement par rapport au panel d'échantillons du fournisseur.

Tout changement important est subordonné à la confirmation des allèles obtenus par une autre technique plus résolutive (SSP haute résolution et/ou NGS) ou le renouvellement de l'expérience. Aucun changement au niveau générique à 2 digits n'est accepté.

Protocole : Les EEQ pour lesquels un changement de seuil a été réalisé ont été comparés aux typages réalisés par une autre technique de biologie moléculaire (PCR-SSP et NGS).

Résultats :

Nom	Typage SSO avant changement seuil	Bille dont le seuil est modifié Cut off (Changé/initial)	Typage SSO après changement de seuil	Typage NGS ou consensus
Neqas 4A206/2017	Mêmes codes NMDP mais avec 673 FN	673 (26/30)	C*03:AUYTJC, 06:ATSTS dont 03:03, 06:02	C*03:03, 06:02
Neqas 4A206/2017	DRB1*15:107	901 (44/32)	DRB1*10:AVKVR, 15:AUXSP dont 10:01, 15:01	DRB1*10:01, 15:01
Neqas 4A207/2017	C*12:XX, 14:BE dont C*12:92	565 (19/15)	C*12:AVGZT, 14:AVDJD dont 12:03, 14:02	C*12:03, 14:02
Neqas 4A208/2017	DRB1*15:107	901 (38/32)	DRB1*03:AUXUB, 15:AUYSV dont 03:01, 15:01	DRB1*03 :01, 15 :01
Neqas 4A209/2017	DRB1*13:148	823 (30/20)	DRB1*03:AVFTF, 13:AUWSF dont	DRB1*13:01, 03:01

Conclusion : Les valeurs seuil étant variables de 7 à 70 (en % de MFI par rapport à la bille témoin positive) nous avons fixé arbitrairement un ajustement maximum à $\leq 20\%$ de cette valeur. (Exemple valeur seuil = 12 la variation acceptable est de $10 < x < 14$). Les résultats des typages obtenus par reverse-SSO, après changement de seuil, sont concordants à 100% avec les résultats de typage obtenus par NGS ou le consensus.

Ce changement doit être limité à deux billes pour un échantillon. S'il est au-delà, un contrôle sera fait par une autre technique ou une nouvelle expérience sera réalisée.

- modulation du nombre minimum de billes comptées (low bead count)

Protocole : Comparaison de typages HLA-B, C et DRB1 effectués avec ou sans « low bead count (LBC) ». Les codes NMDP obtenus avec un LBC, ont été comparés à ceux obtenus en présence d'un nombre de billes préconisé par le fournisseur (≥ 75), ou à un typage de référence (obtenu en NGS ou du consensus pour les EEQ).

Résultats : Ce comptage minimum des billes assure une valeur moyenne statistiquement fiable.

Conclusion : Les résultats qualitatifs de typage obtenus avec des billes comptées au-moins 60 fois sont tous conformes.

- modulation de la valeur minimum des MFI de toutes les billes lues par l'automate

Le fournisseur préconise, que la MFI des billes « contrôle positif » soit supérieure à 1000. Il précise toutefois que la MFI peut être en dehors de cette plage, à condition que les utilisateurs déterminent leur propre plage de valeurs de contrôle.

Protocole : A partir de l'ADN du CQI (UKNEQAS 4A201/2015), une amplification des locus d'intérêt (B et DRB1) sont réalisés; les amplicons sont ensuite dilués au $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ pour HLA-B, et au $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{64}$ pour HLA-DRB1. A partir de l'amplicon pur et des amplicons

dilués, une hybridation est réalisée puis analysée sur le Labscan3D. La MFI des billes « contrôles positifs » et le résultat des typages HLA-B et DRB1 ont été analysés.

Résultats :

Amplicons kit BXR	pur	1/2	1/4	1/8	1/16
MFI bille PC exon 2	5254	3766	2171	947	11
MFI bille PC exon 3	4707	3388	2104	1153	10
MFI bille PC exon 4/5	4885	3905	3040	1943	15
MFI bille NC	99	15	10	16	13
Typage SSO	B*07:AYHDV, 57:AJNUA dont 07:02, 57:01	B*07:AYHDV, 57:AJNUA dont 07:02, 57:01	B*07:AYHDV, 57:AJNUA dont 07:02, 57:01	B*07:AYHDV, 57:AJNUA dont 07:02, 57:01	Pas de résultat
Résultat consensus	B*07:02, 57:01				

Amplicons kit DRXR	pur	1/2	1/4	1/16	1/32	1/64
MFI bille PC exon 2	4299	3257	1257	698	272	161
MFI bille NC	19.5	19	15	16.4	11.3	16
Typage SSO	DRB1*04:XX, 13:05 dont 04:01	DRB1*04:XX, 13:05 dont 04:01	DRB1*04:XX, 13:05 dont 04:01	DRB1*04:XX, 13:05 dont 04:01	DRB1*04:XX, 13:05 dont 04:01	Pas de résultat
Résultat consensus	DRB1*04:01, 13:05					

Conclusion : Lorsque les MFI des billes PC sont ≥ 600 , les typages obtenus pour le locus B et DRB1 sont conformes.

3.5. Les Audits de l'année 2018

3.5.1. Audit Blanc par la société Viskali-ACC (février 2018)

Pas d'écarts relevés mais plusieurs axes d'amélioration ont été suggérés et mis en place :

PCR - SSO : ajout en 2016 dans la portée - date de validation de méthodes : 02/2016 - MàJ SH FORM06 : 02/2016
 - habilitation personnel : 2014 car méthode historique
 Sur le formulaire « Revue de portée » : la date de mise en service historique (2009) a été mise comme date de mise en service. Clarifier le formulaire sur ce point (la date de mise en service en revue de portée correspond à la date de décision d'entrée dans la portée)
 La chronologie suivante doit être respectée lors des ajouts dans la portée (nouveau paramètre, modification de méthode, changements d'automates ayant une incidence sur la méthode) :

- initiation du formulaire revue de portée
- réalisation des étapes de la revue avec traçabilité des dates des étapes
- validation de méthode
- Conclusion d'aptitude et mise en service
- mise à jour du SH Form 06 par le pôle

PCR - SSO : changement d'automate et réactif associé en 2017 (meilleure résolution) :
 Dossier de validation réalisée en 2 étapes :

1. comparaison avec ancien automate, passage de 30 EEQ conformes.
2. Performance réalisée de juil. 2017 à fév. 2018. Pas d'impact du changement d'automate (et de la validation réalisée après mise en production car nouvelle fonctionnalité (haute résolution) non utilisée (passage en NGS depuis courant 2016)).

V2 du dossier de validation (cf. point 2 ci-dessus) :

- Validation du changement de valeur seuil au max de 20%, robustesse PCR, nombre de billes
- rajouter la validation de l'utilisation de la nouvelle méthode de quantification (Nanodrop remplacé par Varioskan, même principe (DO))

3.5.2. Audit COFRAC (fin avril 2018) et réponses apportées aux écarts.

Faute d'auditeur technique disponible sur la période, cet audit a été réalisé en mode visio-conférence. L'auditrice qualicienne sur site a tenu le rôle de témoin pour apporter les preuves de notre argumentaire. Deux écarts non critiques et deux points à surveiller ont été posés par l'auditrice technique.

Ecart FL01

Constat (dont les éventuelles conséquences avérées) :

Le Laboratoire a prévu dans ses dispositions, le maintien des compétences des biologistes à travers plusieurs critères décrits dans Kalilab pour « Biologiste sénior ».

Les critères ne précisent pas la part qui revient à la Structure HLA par rapport à celle de la Structure Immunologie cellulaire.

De ce fait, lors de l'analyse du dossier de Mme V G , nous n'avons pas retrouvé les preuves de 10 analyses d'EEQ exactes en HLA pour 2017, mais 5, ni la preuve des participations aux « deux réunions de concertation clinico-biologique par an ».

Critères de maintien insuffisamment précis pour apporter la preuve de la compétence des biologistes aux HLA.

Risque induit : risque faible, les EEQ traités le sont correctement, les dossiers de validation sont signés régulièrement, la compétence des biologistes qui sont séniors est effective

Réponse apportée par le service

ANALYSE DE L'ETENDUE DE L'ECART (antériorité - prestations et clients - impact)

Cet écart concerne le processus gestion des ressources humaines et plus précisément le maintien de l'habilitation des biologistes, dans les secteurs HLA et CCH (Structure Immunologie cellulaire).

Dans les autres secteurs du pôle, les fiches d'habilitations ont été rédigées par secteur.

Impact modéré : le référent forme régulièrement le suppléant par des journées de training.

ANALYSE DES CAUSES : Méthode : les fiches d'habilitations ne précisent pas les spécificités de secteurs HLA et CCH et les tâches spécifiques aux référents ou suppléants.

ACTIONS DECIDEES POUR CORRIGER L'ECART (SUR L'ETENDUE IDENTIFIEE) ET POUR EVITER SA REPRODUCTION

Suppression de la fiche de qualification biologiste Senior et création de deux fiches de qualifications spécifiques HLA et CCH, avec des critères optionnels selon que le biologiste soit référent ou suppléant (30/06/2018)

Formalisation des maintiens des habilitations des biologistes avec les nouveaux critères (30/06/2018)

Ecart FL02

Constat (dont les éventuelles conséquences avérées) :

Le Laboratoire n'a pas prévu, dans ses dispositions, de suivre la tendance des données quantitatives de ses CIQ. Or il existe des données quantifiables. De plus, certains résultats de CIQ peuvent être

ininterprétables et ne sont pas suivis par le laboratoire, même si celui-ci analyse tous les trois mois les Low Bead Count.

Le laboratoire ne peut démontrer la stabilité de son processus

Risque induit : ne pas détecter une dérive qui pourrait conduire à des échecs de réalisation. Ne pas avoir toutes les données pour analyser ces situations potentielles.

Réponse apportée par le service

ANALYSE DE L'ETENDUE DE L'ECART (antériorité - prestations et clients - impact)

Cet écart concerne le processus analytique et plus précisément la revue à moyen terme des résultats des CIQ dans le secteur immunologie HLA, et ne concerne que l'analyse PCR-SSO.

Impact faible, les bons résultats des EEQ montrent la fiabilité de la méthode.

ANALYSE DES CAUSES

Méthode : méthode quantitative avec des résultats qualitatifs.

Les non-conformités des CIQ ne sont pas enregistrées dans Kalilab pour en suivre la tendance.

ACTIONS DECIDEES POUR CORRIGER L'ECART (SUR L'ETENDUE IDENTIFIEE) ET POUR EVITER SA REPRODUCTION Délai(s) de mise en œuvre :

Création d'un tableau de suivi des données quantifiables du CIQ passé à chaque série (MFI des billes positives de chaque locus) , et ajout des données des cinq derniers CIQ.

Cf. preuve (Tableau suivi des MFI du CQI SSO) (07/05/2018)

Mise à jour de la procédure de gestion des CIQ : RD-IM-IMGGEN-PT-006 (Utilisation du nouveau fichier, et déclaration de NC dans Kalilab en cas de CIQ non conforme). (30/06/18)

Points à surveiller (sur le plan technique)

1 - Pour le maintien de compétence des techniciens, il est prévu d'utiliser les EEQ, mais aucun critère précis n'est formalisé.

Mise en place d'un calendrier avec les EEQ réalisés par technicien afin de tracer le respect du nombre d'EEQ de maintien d'habilitation pour chacun(ne)

2 - Pour le dossier de validation de méthode : le laboratoire devra étoffer le nombre d'échantillons concernant les modifications techniques modification de cut-off. Le nombre de 5 échantillons (EEQ) est trop limité pour assurer une conclusion solide.

Les low bead count pour un locus sur un EEQ étant rares, le dossier sera étoffé au cours du temps par les résultats d'EEQ à venir.

4. GESTION DES CHANGEMENTS EN COURS ET A VENIR

D'autres importants changements sont en cours ou à prévoir.

4.1. Ajout d'un locus en typage HLA.

Dans le cadre de l'amélioration de la prise en charge des patients et en accord avec les cliniciens, nous allons mettre en place le typage du locus DPB1* en routine, d'une part en NGS,

et également en PCR SSO Labtype uniquement pour le contrôle systématique de tous les allèles homozygotes par une deuxième technique (l'un des *standards EFI*).

Ce nouveau typage concerne les patients et les DVMO afin d'éliminer un mismatch supplémentaire qui augmente le risque de GVH (*Graft Versus Host*) réaction du greffon contre l'hôte ou de rejet du greffon. N'ayant pas encore de résultats de DPB1 au laboratoire nous nous sommes une fois de plus appuyé sur nos reliquats d'EEQ des années précédentes (le consensus sur les DPB1* réalisés par les autres laboratoires du programme).

Protocole : Nous avons effectué les génotypes DPB1 de 30 EEQ en technique NGS et en PCR SSO Labtype.

Résultats : la concordance des résultats qualitatifs est de 100% dans les deux techniques et la concordance est de 100% par rapport aux résultats consensus.

Conclusion : la spécificité et la sensibilité sont conformes aux besoins du laboratoire. La comparaison de méthode est conforme.

Le dossier va être complété dans les semaines à venir en utilisant notre CQI SSO. Ainsi seront réalisés un test de répétabilité sur une expérience de vingt points d'amplification, avec hybridation et analyse, plus un test de reproductibilité sur une trentaine d'expériences faites par l'ensemble des technicien(ne)s habilités.

Actuellement notre témoin CQI est passé à chaque expérience avec le kit DPB1 afin d'accumuler des données notamment pour les calculs de reproductibilité.

4.2. Qualification du kit AXR

Les problèmes initiaux rencontrés avec le kit AXR (présence de billes faussement positives entraînant des indéterminations de typage HLA) ayant été levés sur les nouveaux tests effectués en Juin 2018, nous avons décidé de procéder à sa qualification en même temps que le kit DPB1. Nous avons donc commencé à faire un test CQI et témoin négatif, avec ce kit à chaque expérience afin de produire des données exploitables pour les validations à venir. La répétabilité, la justesse, la fidélité intermédiaire, la robustesse restent à tester et valider avant mise en production.

4.3. Accréditation du NGS en histocompatibilité

La technique NGS, nouvellement développée, est encore dans le fichier des actes RIHN (Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature) de la DGOS. Les services achats de l'AP-HP ont ouvert pour octobre 2018 un appel d'offre pour les fournisseurs de kits que nous utiliserons dans les prochaines années. Des tests de tous les kits (réactifs, protocoles de travail,

et logiciels d'analyses) des fournisseurs répondants à l'appel ont été répartis et réalisés dans les 4 laboratoires HLA de l'AP-HP.

Une fois le choix collectif fait par tous les laboratoires HLA de l'AP-HP, il nous faudra gérer le dossier d'une extension. Nous avons longtemps envisagé cette analyse comme un ajout en portée flexible, mais selon la révision 5 du SH-INF-50 applicable au 1^{er} septembre 2018, le séquençage haut débit figure sur une nouvelle ligne de portée IC10 ce qui se traduit par une extension de portée.

Pour cette accréditation, la gestion documentaire a déjà été intégrée. L'appareil est déjà géré et accrédité sur une ligne de portée en génétique, le personnel est formé et habilité. Si les mêmes kits sont choisis pour le nouveau marché, nous aurons à notre disposition de nombreux résultats d'EEQ et de CQI pour finaliser rapidement notre dossier de validation de méthode.

4.4. Mise en place d'un nouvel EEQ national HLA.

Suite à l'arrêt des Contrôles Nationaux de Qualité (CNQ) HLA, la société savante d'histocompatibilité (SFHI), a décidé de mettre en place un nouvel EEQ à partir de cette année 2018. Cette année, 4 échantillons, sur lesquels nous avons réalisé des typages HLA en PCR SSO et en NGS, nous ont été envoyés.

4.5. Changement de l'automate d'extraction d'ADN

Tout comme le spectrophotomètre évoqué plus haut, nous allons, dans un avenir proche, être confrontés à la problématique de l'obsolescence programmée de notre automate d'extraction d'ADN. Nous utilisons depuis 2007 un « GenoM6 », appareil de première génération des « EZ1 » de la société Qiagen. Le fabricant nous a fait part de l'arrêt du changement de pièces lors des maintenances préventives annuelles ou de maintenances curatives en fin d'année 2019. C'est d'autant plus dommage que cette appareil est robuste, fiable, ne nécessite presque aucun entretien et utilise les même cartouches réactifs que les générations suivantes.

Dans les différentes structures du LBM cela représente 3 automates à changer dans un délai et avec un budget non encore défini pour l'instant. Toutefois les exigences du COFRAC et de l'EFI en matière de maintenance préventive des appareils et l'obligation de permanence des soins qui est le cœur de métier de l'hôpital, nous obligent à nous organiser au sein du LBM dans le cadre de la gestion des portées flexibles impactées, afin de déterminer les besoins de chacun et de sélectionner la meilleure des options de remplacement. Cette réflexion a d'ores et déjà débuté et se poursuit entre les différentes structures du LBM.

4.6. Changements des logiciels de gestion des patients et du SIL

Un très important chantier va impacter l'ensemble du LBM mais aussi les services cliniques. C'est le changement des logiciels de gestion des patients Orbis, de prescription connectée PCS et du SIL : Lab400 → Glims (date non encore définie).

En juin 2018, dès les premiers tests Orbis réalisés en production, des problèmes bloquants sont apparus sur la prescription médicamenteuse pédiatrique. Le planning de déploiement est en train d'être réétudié avec des échéances possibles à l'automne 2019 voire au printemps 2020.

Les décisions qui vont être prises par les DSI sur le calendrier de déploiement des logiciels auront bien entendu un impact très important sur tout le LBM dans les mois à venir.

4.7. Autres changements envisageables et nouvelles technologies.

Le renouvellement des marchés de tous les lots réactifs en histocompatibilité est en cours à l'AGEPS. Les résultats des appels d'offre est attendu pour octobre 2018. Il est donc possible dans un proche avenir, en fonction des résultats d'attributions, que nous ayons à intégrer de nouveaux changements sur les analyses de la ligne de portée (changement de fournisseurs, de réactifs, voire de technologie). La gestion du calendrier de déploiement des nouveautés va être très compliquée, si plusieurs changements interviennent simultanément. En effet nous sommes contraints, entre octobre et novembre, de les mettre en application tout en garantissant le maintien du niveau de qualité et en gérant les dossiers de validation de méthodes conformément aux exigences du COFRAC. Il conviendra de les prendre en compte avec la pertinence, la méthodologie et les outils présentés lors de ma formation à ce DU. Il conviendra aussi d'éviter de répéter les erreurs que nous avons pu commettre jusqu'à présent.

Dans ces conditions il est clair qu'un certain immobilisme est tentant. Il ne faudrait pas que le gros travail que représente la gestion des portées flexibles bloque les laboratoires dans une certaine inertie. Nous devons rester toujours à l'écoute des adaptations techniques et à l'arrivée des nouvelles technologies développées par les fabricants, ainsi qu'aux besoins exprimés par les cliniciens.

4.8. Veille réglementaire

Dans le nouveau SH-INF-50 rev.05 de juillet 2018, applicable au 1^{er} septembre 2018, la sous-famille « IMMUNOLOGIE CELLULAIRE SPECIALISEE ET HISTOCOMPATIBILITE » a été entièrement revue et restructurée par le COFRAC afin de clarifier les choses par rapport à la génétique et de tenir compte des avancées technologiques.

Tableau de correspondance :

Sous-famille	SH INF 50 rev05	SH INF 50 rev04
ICELHISTOBM	IC1	IC1
	IC2	IC2
	IC3	IC3+IC4
	IC4	IC5+IC6
	IC5	IC7
	IC6	IC8
	IC7	IC9+IC10
	IC8	création
	IC9	création
	IC10	création

Concernant les techniques de typage HLA, la ligne de portée IC5 est fusionnée avec la ligne IC6 en une ligne nommée IC4. Il conviendra d'effectuer les changements nécessaires dans notre système documentaire et le dossier de la portée pour appliquer cette nouvelle classification.

IC4	Échantillons biologiques d'origine humaine	Génotypage HLA Chimérisme Polymorphismes génétiques	Prétraitement : Tri des cellules et/ou Extraction d'ADN - PCR-SSP, PCR-SSO, PCR-SBT - PCR-STR - PCR en temps réel...	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Contexte de réalisation à préciser : « Transplantation, Greffe, HLA et prédisposition à certaines maladies, autres »
-----	--	---	--	--	---

D'autre part, une nouvelle ligne de portée a été ajoutée pour combler le vide qui existait sur les techniques de séquençage haut débit de type NGS. De ce fait la technique NGS qui va être portée à l'accréditation du laboratoire d'Immunologie d'ici quelques mois fera l'objet d'une extension avec ouverture de la ligne de portée IC10.

IC10	Échantillons biologiques d'origine humaine	Génotypage HLA	Prétraitement : Extraction d'ADN avec ou sans purification d'acides nucléiques - Séquençage à Haut débit - Traitement bio-informatique	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Contexte de réalisation à préciser : « Transplantation, Greffes, HLA et prédisposition à certaines maladies, autres »
------	--	----------------	---	--	--

CONCLUSION - DISCUSSION

La gestion de portée flexible sera, après 2020, l'essentiel du travail d'assurance qualité pour tous les LBM. A cette date, les laboratoires devront tous être accrédités à 100%, sur l'ensemble de leurs lignes de portée. Il conviendra alors de gérer dans le temps ses lignes de portée selon les critères du COFRAC.

Les contraintes budgétaires, de temps et le manque chronique de personnels rendent quelques fois difficiles l'application stricte et dans les délais, des tests à réaliser dans une gestion de portée flexible d'accréditation. Nous avons essayé de gérer au mieux le triple changement qui s'est imposé à nous sur une courte période et avec une urgence à le faire avant l'audit COFRAC dont le calendrier nous contraint. Un travail fastidieux a été réalisé pour mettre à jour la partie documentaire de l'examen (procédure, instructions techniques, documents externes, formulaires, enregistrements et fichiers Excel de calcul, de suivi des performances, de gestion des stocks ...).

Nous sommes conscients que nous aurions pu faire certaines choses différemment (choix du SHFORM 44 en 2016, utilisation de deux sous processus dans un seul SHFORM 43 au lieu de deux SHFORM distincts,...). Nous aurions pu nous voir reprocher une utilisation en diagnostic peut être un peu rapide des nouveaux kits XR. Toutefois, nos résultats patients sont le produit d'une synthèse d'analyses, de dispositions contrôles, de vérifications et de comparaison entre techniques et nous avons pratiqué, avant mise en production, les tests indispensables. La moindre discordance, incohérence ou le moindre doute sont systématiquement contrôlés. Les garde-fous que nous nous imposons autour du typage HLA et des *standards EFI* que nous respectons depuis près de 20 ans (ex : alignement des haplotypes familiaux, déséquilibre de liaisons des locus, contrôle systématique des homozygoties, etc...), nous ont amené lors de l'analyse de risque, à considérer certaines vérifications du dossier de validation de méthode du COFRAC comme pouvant être différées ou non applicables.

Comme je l'ai indiqué au début du chapitre 3.4.2.2, la PCR SSO est une analyse qualitative à données quantifiables, mais les résultats de typage sont obtenus par un ensemble de données présentant un profil de positivité et non sur des données brutes individualisées. Nous avons donc traité ce dossier d'analyse quantitative avec quelques adaptations.

Au vue des informations qui m'ont été dispensées pendant les cours du DU, il est certain que nous allons désormais essayer de mieux anticiper les changements en cours et à venir afin de mieux gérer le calendrier et les plans d'actions. Mais comme je l'ai indiqué lorsque plusieurs changements ont lieu de façon concomitante, il faudra s'adapter et différer certains tests ou certaines mises en production.

Pour arriver à une bonne efficacité, l'outil de questionnement QQQQCP présenté dans ce mémoire et dont j'ai appris à me servir lors du DU me semble un outil très intéressant et qui permet d'être efficace.

De gros chantiers sont à prévoir pour notre laboratoire, le pôle de biologie et l'hôpital dans les mois et années à venir, avec les contraintes budgétaires que nous connaissons tous. Il est impératif de toujours envisager ces modifications et changements au travers d'analyses de risques, afin de maintenir les exigences de la norme ISO 15189. Il est capital d'être exhaustif et de vérifier l'ensemble des processus impactés pour n'oublier aucune action ni aucun document. Il faut toutefois garder à l'esprit que la contextualisation est nécessaire pour ne pas se perdre dans des analyses non pertinentes et risquer d'aboutir à une démotivation des équipes dans ce travail au long court.

BIBLIOGRAPHIE

- Article L. 6221-1 du Code de la santé publique.
- Arrêté du 5 août 2010 fixant les références des normes d'accréditation applicables aux laboratoires de biologie médicale. Journal officiel; 1er septembre 2010.
- Ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
- Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale.
- Norme NF EN ISO 15189 Décembre 2012 « Exigences concernant la qualité et la compétence »
- SH REF08 rév. 05 mars 2017 « Expression et évaluation des portées d'accréditation »
- SH INF 50 « Portées-types d'accréditation» rev. 04 d'avril 2017 et rev. 05 de juillet 2018.
- Note sur l'évolution des lignes de portée-type d'accréditation du SH INF 50 révision 05.
- SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale
- Standards EFI : https://www.efi-web.org/fileadmin/user_upload/Website_documenten/EFI_Committees/Standards_Committee/2017-10-31_Standards_version_7.pdf

ANNEXES

Annexe 1 : Les différents choix possibles pour un greffon de CSH	p 38
Annexe 2 : Principe de la technique de PCR SSP.....	p 39-40
Annexe 3 : Principe de la technique Labtype SSO sur Luminex100 et sur Labscan3D.....	p 41-42
Annexe 4 : Principe de la technique NGSgo GenDX sur plateforme Illumina Miseq.....	p 43-45
Annexe 5 : Formulaire de gestion de portée flexible.....	p 46-51
Annexe 6 : Graphes récapitulatifs de comparaison de méthode Nanodrop 1000 -> Varioskan lux	p 52-53
Annexe 7 : Diagramme d'Ishikawa – analyse de risques.....	p 54
Annexe 8 : Résultats du test de contamination inter échantillons.....	p 55
Annexe 9 : Résultats du test de stabilité des réactifs dans les conditions d'utilisation.....	p 56
Annexe 10 : Résultats des tests de fidélité intermédiaire.....	p 57-58

Lorsqu'une greffe de CSH est envisagée par les cliniciens, plusieurs cas de figure sont possibles en fonction des probabilités de trouver un donneur le plus compatible possible avec le patient à traiter.

A noter : les chiffres en 10^{ème} ou 6^{ème} correspondent au nombre d'allèles présentant un matching (identité) entre les deux individus comparés pour leur génotypes HLA.

- ✓ une greffe géno-identique avec un donneur apparenté 10/10^{ème} compatible (fratrie) c'est à dire 2 allèles de chaque locus d'intérêt A*, B* C*, DRB1* et DQB1*. La probabilité est au sein d'une fratrie de ¼ selon les lois de Mendel de transmission autosomique codominante.
- ✓ une greffe phéno-identique avec un donneur non apparenté (Donneur Volontaire de Moelle Osseuse (DVMO) des fichiers internationaux) compatible 9 ou 10/10^{ème}. La probabilité dépend de nombreux facteurs : rareté des allèles du patient, origine géographique, nombre de donneurs dans les fichiers internationaux, les déséquilibres de liaisons, etc...
- ✓ une greffe haplo-identique avec un donneur semi-compatible (l'un des 2 parents en ce qui concerne les patients que nous traitons). Elles sont de plus en plus utilisées dans le monde chez les patients adultes devant la difficulté à trouver des donneurs compatibles, plus rarement pour nos patients enfants. Elles sont la résultante de progrès dans l'utilisation des molécules d'immunosuppresseurs et modulateurs, mais posent encore de nombreuses questions sur les effets secondaires induits à long terme par ces molécules.
- ✓ une greffe avec une unité de sang placentaire (apparenté ou non apparenté) 4 à 6/6^{ème} c'est-à-dire 2 allèles des locus d'intérêt A*, B* et DRB1* en résolution allélique. Les cellules pluripotentes de sang placentaire offrent une plus grande tolérance de *matching*.

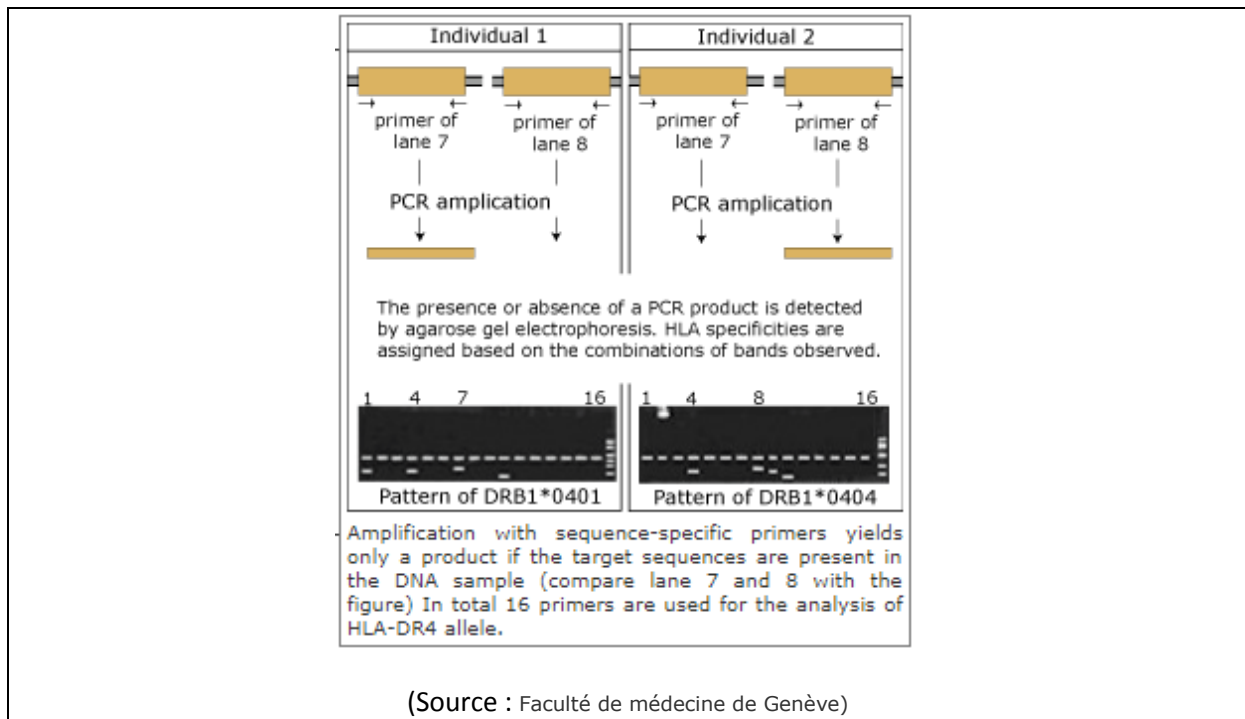
L'arbre décisionnel est discuté lors des réunions clinico-biologiques et constamment adapté suite aux résultats obtenus pour répondre au mieux aux besoins du patient.

ANNEXE 2 : Principe de la technique de PCR SSP

La PCR est une technique qui utilise des amorces spécifiques des zones polymorphes des allèles HLA.

Chaque puits d'amplification contient un couple d'amorces spécifiques. Il contient également un couple d'amorces spécifiques d'une région hyper-conservée du gène ubiquitaire de l'hormone de croissance qui sert de témoin d'amplification.

Après une migration par électrophorèse en gel d'agarose, le résultat est obtenu par analyse du profil des positivités obtenues.



L'analyse est réalisée sur un logiciel dédié (SCORE). Le résultat du typage donné par le logiciel est systématiquement vérifié manuellement avec comme référentiel, les tables d'interprétation du fournisseur (cf. ci-après)

Exemple de table d'interprétation des kits SSP Olerup (Source Olerup page 1/8)

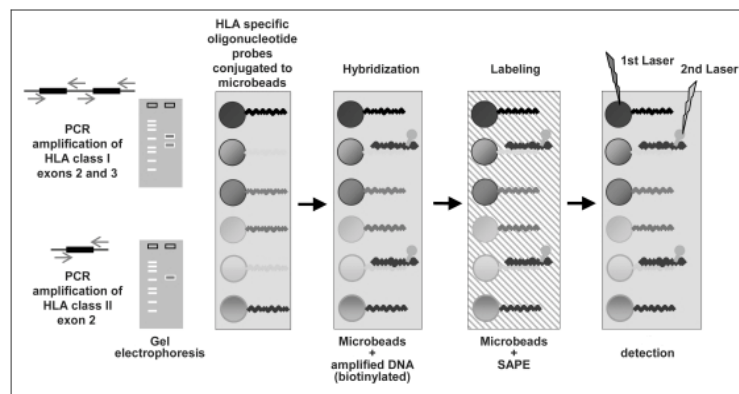
INTERPRETATION TABLE																
DRB1*04 SSP subtyping																
Allele-specific amplification patterns of the DRB1*0401 to *0464 alleles																
	Tube ⁴															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Length of spec.	215	150	225	225	170	115	260	260	215	170	175	180	170	200	215	150
PCR product		215									220	265	225	220		
Length of int.	515	430	430	515	430	430	430	430	430	515	430	515	430	430	430	515
pos. control ¹																
5'-primer(s) ²	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	37
	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-A CA ²	F-g TA ¹
3'-primer(s) ³	71	49	74	74	57	37	86	86	71	57	58	59	56	67	71	74
	F-CTT ²	F-C CA ²	F-C CT ²	F-C Cg ²	F-gCT ²	F-C gg ²	F-C AC ²	F-C CA ²	F-gCT ²	F-ATC ²	F-C CT ²	F-CTg ²	F-Agc ²	F-gAT ²	F-CTT ²	F-C CT ²
		71							71	57	73	88	74	73		
		F-CTc ²							F-gCT ²	F-ATC ²	F-g gc ²	F-AA T ²	F-CA g ²	F-ggA ²		
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DRB1 allele																
*040101-040102	+			+				+		+						
*0402		+		+					+		+			+		
*040301-040303			+						+	+	+					+
*0404				+					+	+	+					
*040501-040504				+	+			+		+						
*040601-040602			+			+			+	+						
*040701-040703			+					+		+	+					+
*0408				+				+		+	+					
*0409	+			+	+			+								
*0410				+	+				+	+						
*0411			+		+				+	+						+
*0412					+				+	W			+	+		
*0413	+			+					+		+					
*0414		+		+				+		+				+		
*0415				+					+	+		+				
*0416	+			+				+		+		+				
*0417			+		+			+		+						+
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Il s'agit d'une technique de reverse SSO. Elle se déroule comme suit :

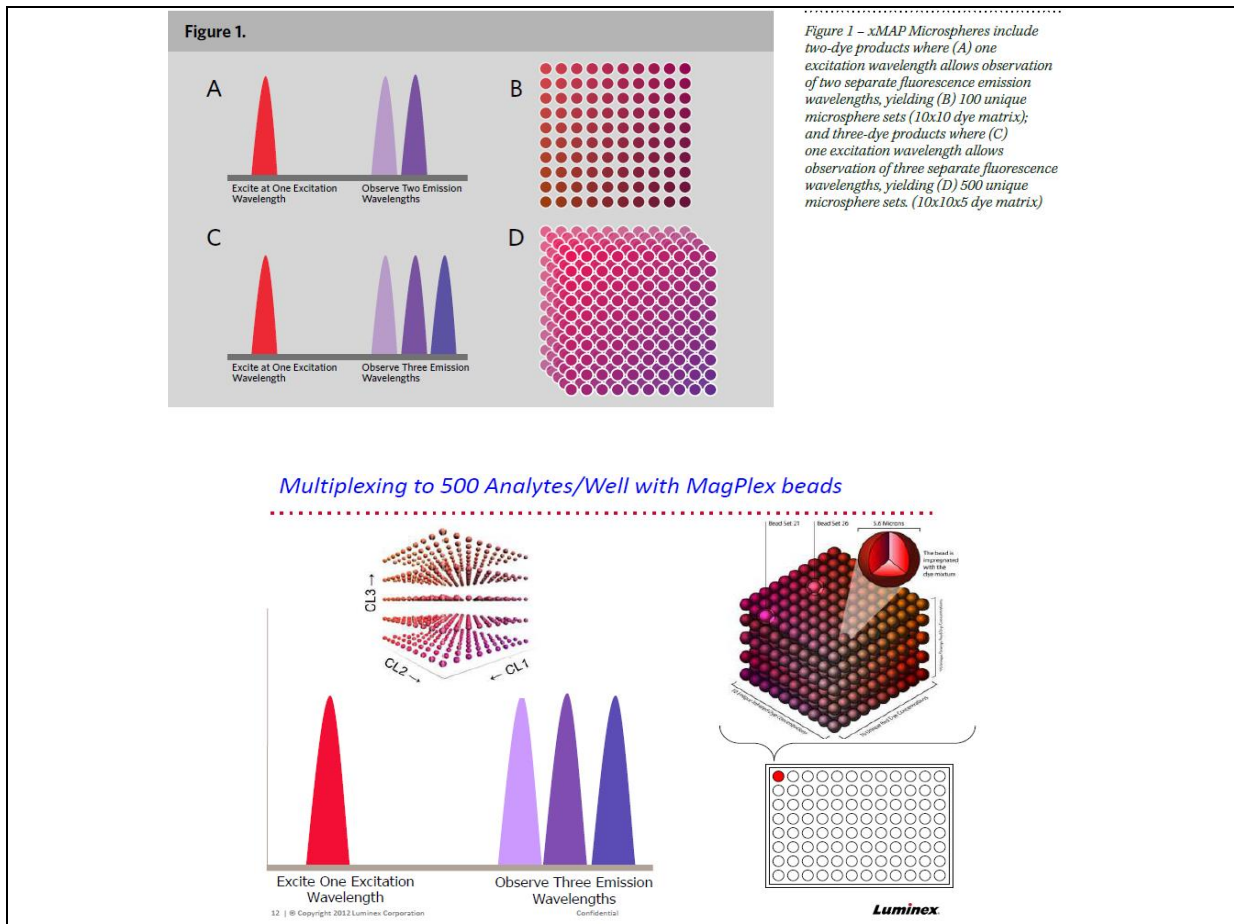
- Etape 1 : PCR
 - Les amorces sont complémentaires des séquences conservées des exons d'intérêts
 - Les amplicons produits sont biotinylés
- Etape 2 : Hybridation:
 - Sondes oligonucléotides coatées sur microsphères fluorescentes
 - Couleur de la microsphère spécifique de chaque sonde (% relatifs de rouge, infrarouge et orange)
- Etape 3 : Révélation = Streptavidine (forte affinité pour la biotine fixée aux amplicons) + Phycoérythrine (fluorochrome)
- Etape 4 : Acquisition des données (CMF Luminex)
 - Laser vert → Phycoérythrine
 - Laser rouge → couleur de la bille correspondante
- Etape 5 : Analyse bio-informatique sur logiciel « HLA Fusion ». La résolution dépend de la spécificité des sondes coatées sur les billes

La spécificité allélique est portée par les différentes sondes fixées sur un jeu de 100 billes différenciables par leur fluorescence interne pour les kits HD et 500 billes pour les kits XR

Shémas de principe de la PCR SSO Labtype (Source : société Luminex)



Source: Heinemann, Falko Markus. "HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 36.4 (2009): 273–278. PMC. Web. 19 July 2016.



Les Systèmes LABScan3D™ et Luminex 100. Evolution d'une technologie.

L'optique, l'électronique et un logiciel adapté, permettent aux systèmes LABScan de traiter rapidement jusqu'à 96 échantillons. Les systèmes LABScan3D et Luminex 100 sont basés sur la technologie Luminex® xMAP®. Ils utilisent le logiciel Luminex® xPONENT® pour le pilotage de l'automate et l'acquisition de données.

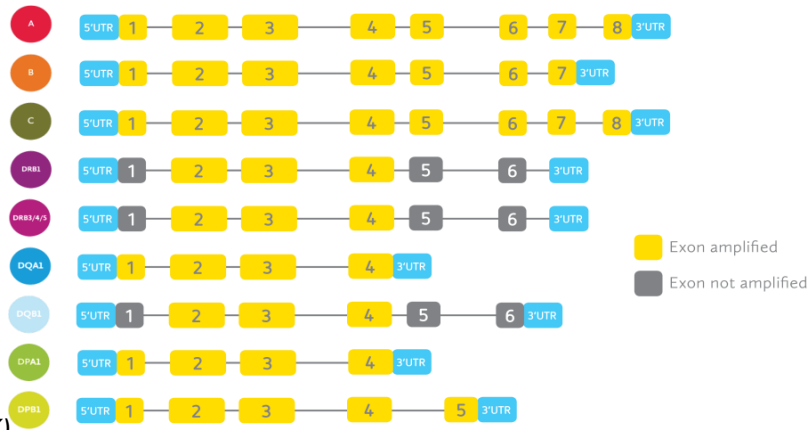
L'utilisation des systèmes LABScan avec les produits LABType™ permet de réaliser des typages HLA avec le logiciel d'analyse de HLA Fusion™.

- Luminex 100: Cytomètre de flux sensible capable de traiter jusqu'à 100 billes différentes simultanément et par voie de conséquence 100 sondes spécifiques différentes.
- LABScan3D: C'est le système Luminex le plus avancé à ce jour. Les pompes à double seringue et les réservoirs à réactifs permettent des débits plus élevés et des programmes de maintenance planifiés. Avec sa capacité à traiter simultanément 500 billes différentes, il a augmenté significativement le nombre des séquences ADN criblées. Lorsqu'il est utilisé avec des produits LABType XR et CWD (exclusivement conçus pour LABScan3D), 500 billes peuvent être multiplexées simultanément dans un seul échantillon.

Préparation de la Library en kit NGSgo (source GenDX) les différentes étapes :

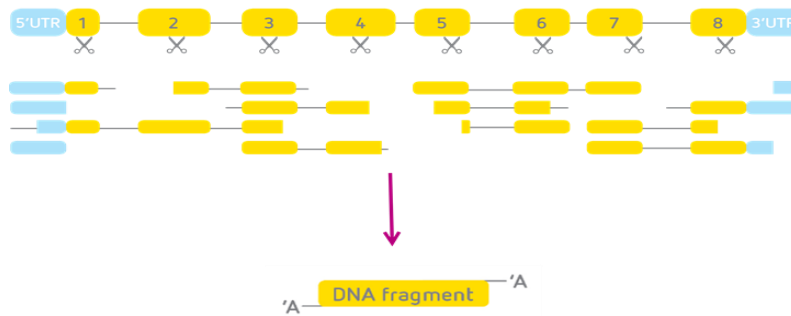
- Amplification par long Range PCR locus spécifique. Programme PCR unique

Exons amplifiés en fonction du locus (source



GenDX)

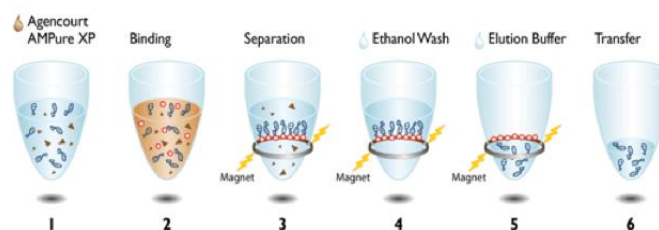
- Fragmentation enzymatique et fixation d'une queue polyA. La taille des fragments est optimisée pour la réaction de séquence sur l'automate Miseq



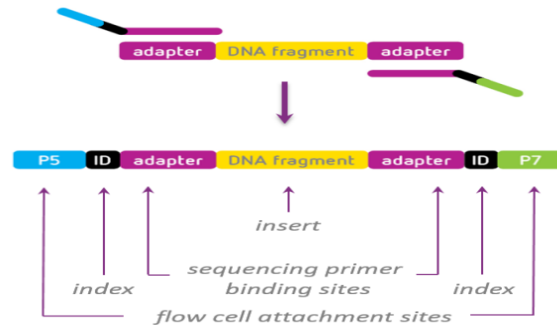
- Intégration des adaptateurs à l'aide d'une queue polyT et d'une ligase. Ils vont servir d'amorces lors du marquage des patients par les index



- Lavage et sélection des fragments en fonction de leurs tailles par billes AMPpure XP (source Agencourt)

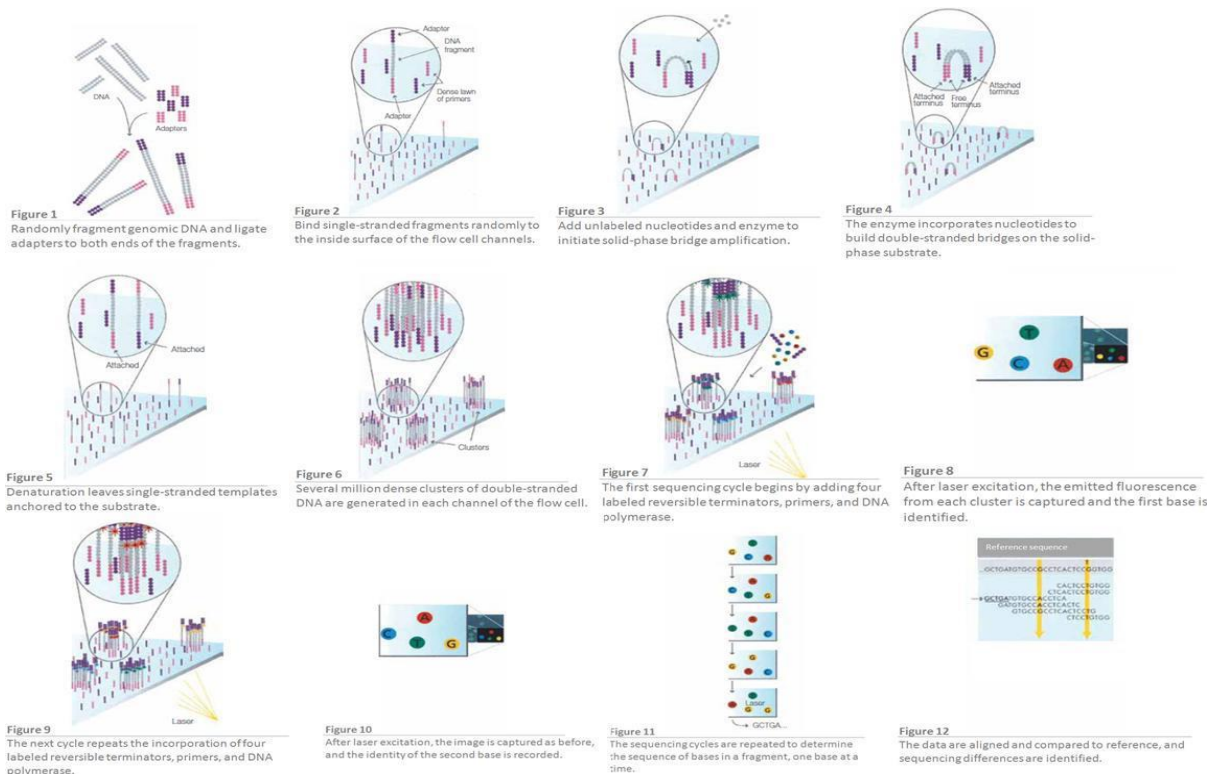


- Indexation par patient = marquage d'identification par des couples de code barre ADN de 6 nucléotides (ils serviront à démultiplexer lors de l'analyse bio-informatique) et ajout des séquences de fixation à la *flow cell* (cellule réactionnelle du séquençage sur Miseq Illumina)



La technologie Illumina (source Illumina)

- La réaction de séquence à proprement parlé est une succession de cycles au court desquels les 4 bases vont être injectées en alternance, intégrées là où elles trouvent leurs bases complémentaires, détectées par fluorescence (spécifique de la base). Nous utilisons les kits 300 cycles V2.
150 cycles sont effectués dans un sens de la séquence d'ADN plus les séquences index. Le brin complémentaire est détruit, la molécule retournée et 150 cycles supplémentaires sont réalisés soit un au total 318 cycles



L'analyse est réalisée sur un logiciel (NGSEngine) qui va reconstruire la séquence à l'aide d'algorithmes dont la finalité est la reconstruction des séquences d'ADN et leur alignement sur les séquences de référence de la base de données internationale IMGT-HLA.

NGSEngine est équipé de deux algorithmes de Phasing indépendants: l'algorithme Classic et Cluster.

- Classique

Basé sur l'analyse statistique de toutes les lectures, l'algorithme classique détermine pour chaque position si elle est homozygote ou hétérozygote. Lorsqu'il est hétérozygote, l'algorithme classique détermine pour chaque position hétérozygote sa phase par rapport aux positions hétérozygotes voisines.

- Cluster

L'algorithme de mise en phase de Cluster sépare les lectures en deux groupes en identifiant les groupes de lectures susceptibles de provenir du même allèle.



Hôpital Robert Debré
Pôle de Biologie

REVUE DE PORTEE D'ACCREDITATION : PCR-SSO LABscan 3D (N°
serie FM3DD16348022)

EXAMEN BIOLOGIQUE

Nom de l'examen biologique :

Typage HLA par PCR-SSO Luminex LABSCAN 3D (N° série FM3DD16348022)

Référence du dossier de validation/vérification : [RD-IM-IMGEN-DE-135](#)

RAISON DE LA MISE EN PLACE DE L'EXAMEN BIOLOGIQUE

Ajout d'examen sur la portée accréditée Nouvel examen (extension) Suppression d'un examen

Modification d'une méthode existante Changement d'automate Changement de SIL

Autre (précisez) : évolution des kits réactifs (XR au lieu de HD)

REVUE DES CRITERES POUR QUE L'EXAMEN BIOLOGIQUE VALIDE ENTRE DANS LA PORTEE D'ACCREDITATION

SOUS-DOMAINE		SOUS-FAMILLE	
<input type="checkbox"/>	Biochimie.	<input type="checkbox"/>	Biochimie générale et spécialisée
		<input type="checkbox"/>	Pharmacologie-toxicologie
<input type="checkbox"/>	Hématologie	<input type="checkbox"/>	Hématocytologie
		<input type="checkbox"/>	Hémostase
<input checked="" type="checkbox"/>	Immunologie	<input type="checkbox"/>	Allergie
		<input type="checkbox"/>	Auto-immunité
		<input checked="" type="checkbox"/>	Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité

<input type="checkbox"/>	Microbiologie	<input type="checkbox"/>	Bactériologie
		<input type="checkbox"/>	Parasitologie-mycologie
		<input type="checkbox"/>	Sérologie infectieuse
		<input type="checkbox"/>	Virologie
<input type="checkbox"/>	Génétique.	<input type="checkbox"/>	Génétique constitutionnelle
		<input type="checkbox"/>	Génétique somatique
MATRICE BIOLOGIQUE (Nature de l'échantillon biologique)			
<input checked="" type="checkbox"/>	Sang	<input type="checkbox"/>	Sérum/plasma
<input type="checkbox"/>	Urine	<input type="checkbox"/>	Autre :
<input type="checkbox"/>	LCR		

PRINCIPE DE LA METHODE			
<input type="checkbox"/>	Quantitative	<input type="checkbox"/>	Technique automatisée Principe : PCR-SSO Luminex
<input checked="" type="checkbox"/>	Qualitative	<input checked="" type="checkbox"/>	Technique semi-automatisée Principe : PCR-SSO Luminex
TYPE DE PORTEE			
<input type="checkbox"/>	Portée A	<input checked="" type="checkbox"/>	Portée B

IMPACTS

Se référer au SH REF 08 et à la procédure « gestion des portées d'accréditation »

IMPACTS	OUI	NON	Action à entreprendre	RESPONSABILITE (Nom)
PROCESSUS LOCAUX ENVIRONNEMENT HYGIENE ET SECURITE				
Organisation des locaux (travaux, déménagement visite)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	L'automate est sensiblement du même modèle et prend la place du précédent (même pièce, même endroit de la	

de pré-installation...)			pièce)	
Gestion des déchets	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Sécurité des personnes et des installations (équipements de protection, onduleur...)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
PROCESSUS GESTION DES STOCKS ET MATERIEL				
Gestion du matériel (achat d'équipement, livraison, installation, mise en inventaire...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Livraison du LABScan/FlexMap 3D (N° série FM3DD16348022) le 23/04/2017 Mise à disposition	Techniciens HLA Céline C. (Ingen)
Gestion des consommables et réactifs (stock pour la mise en route, vérification des marchés, planification des commandes...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Commande des nouveaux réactifs LabType (XR) et dans un deuxième temps arrêt des commandes des anciens réactifs (HD)	Techniciens HLA Véronique M
Métriologie (mesure température ambiante, raccordement SI du matériel critique...)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
PROCESSUS SYSTEME INFORMATIQUE DU LABORATOIRE				
Paramétrage de l'examen	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Compte rendu (papier, serveur de résultats...)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	.	
Connexion de l'équipement	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Connexion du logiciel Fusion à PGP à prévoir	Techniciens HLA informaticiens (PGP)
Qualification des liaisons	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Qualification des liaisons à faire quand la liaison sera faite	Beatrice. P. Techniciens HLA

				informaticiens (PGP)
PROCESSUS RESSOURCES HUMAINES				
Formation du personnel	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Formation sur site des techniciens par le fournisseur (Ingen) le 23- 24 avril et 27 juin 2017.	Céline C. (Ingen)
Qualification et habilitation du personnel	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Pas de modification de la qualification et de l'habilitation des techniciens car le fonctionnement de l'appareil est identique au précédent. Les logiciels de pilotage et d'analyse des données, sont inchangés	
PROCESSUS PRE-ANALYTIQUE				
Réalisation des prélèvements	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Acheminement des prélèvements	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Enregistrement des examens	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Prétraitement des échantillons	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Gestion des urgences	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
PROCESSUS ANALYTIQUE				
Validation/vérification de méthode	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Rédaction SHFORM 43: RD-IM-IMGEN-DE-135 version 1 : comparaison de méthode faite avant la mise en production, répétabilité Prévoir une version 2 avec la vérification/validation complète	Béatrice. P Techniciens HLA

			(reproductibilité, robustesse ...)	
CIQ	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Vérification de la conformité du CIQ à chaque série. Contrôles inter-techniciens à mettre en place	Béatrice. P Techniciens HLA
EEQ	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-Rétrospectif : Comparaison des résultats obtenus sur 30 EEQ UKNeqas avec le consensus: conforme -Prospectif : faire les EEQ de 2017	Béatrice. P Techniciens HLA
Mode dégradé	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
PROCESSUS POST-ANALYTIQUE				
Validation des résultats (valeurs de références, valeurs critiques, interprétation des résultats...)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Transmission des résultats	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Gestion des urgences	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Conservation et stockage des échantillons	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
PROCESSUS POLITIQUE QUALITE				
Communication (prescripteurs, préleveurs internes et externes, bureau qualité, référent cofrac...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	- pas de changement pour ce qui concerne les prescripteurs et préleveurs -Avertir le Cofrac via le COQ	Sylvia. B
Organisation générale (portée d'accréditation...)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		

PROCESSUS MAITRISE DOCUMENTAIRE				
Documentation externe (bibliographie, référencement des documents, liste des documents externes...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mise à jour des documents externes : nouveaux documents fournisseurs intégrés dans Kalilib.	Béatrice. P Techniciens HLA
Documentation interne (pré-analytique, analytique, post-analytique, portée d'accréditation, liste des examens accrédités...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mise à jour de la procédure Typage HLA classe I et II par PCR-SSO Luminex Labtype (RD-IM-IMGEN-MT-004) Mise a à jour des MOP, formulaires, enregistrements	Béatrice. P Techniciens HLA
Enregistrement et archivage (résultats, CIQ, EEQ...)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
PROCESSUS EVALUATION ET AMELIORATION				
Audits internes (audit de la portée flexible)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Revue de direction (CIQ, EEQ, gestion de la portée d'accréditation)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
CONCLUSION				

L'ensemble des points de maitrise contrôlés est satisfaisant.

Le dossier de validation de méthode est satisfaisant.

Date de mise en service de l'automate: 4 juillet 2017

	Nom du responsable Qualité :
	Béatrice P

Annexe 6: Graphes récapitulatifs de comparaison de méthode Nanodrop 1000 -> Varioskan lux

Figure A

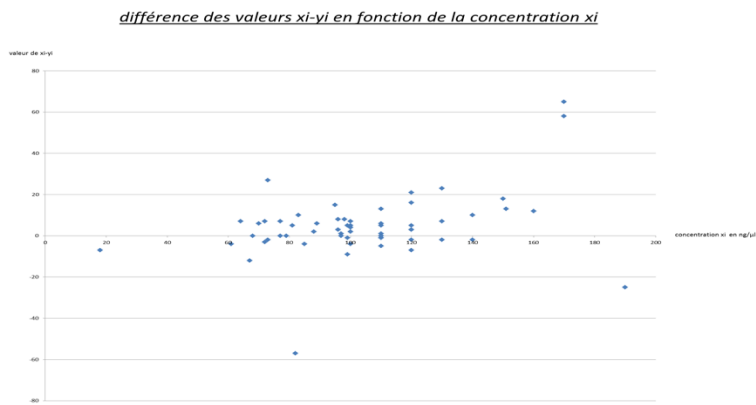


Figure B

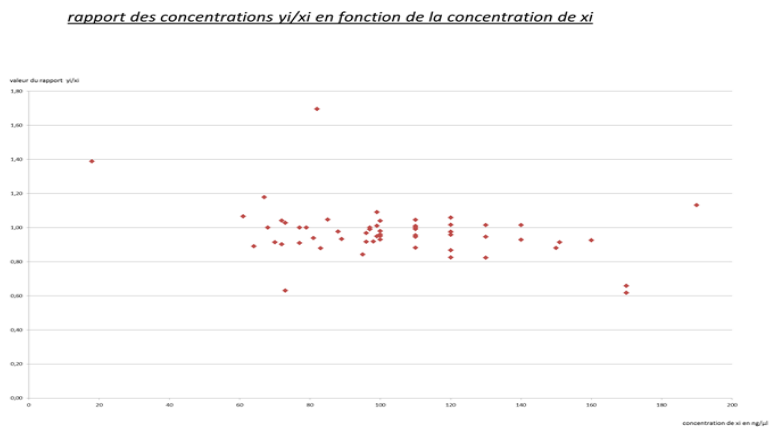
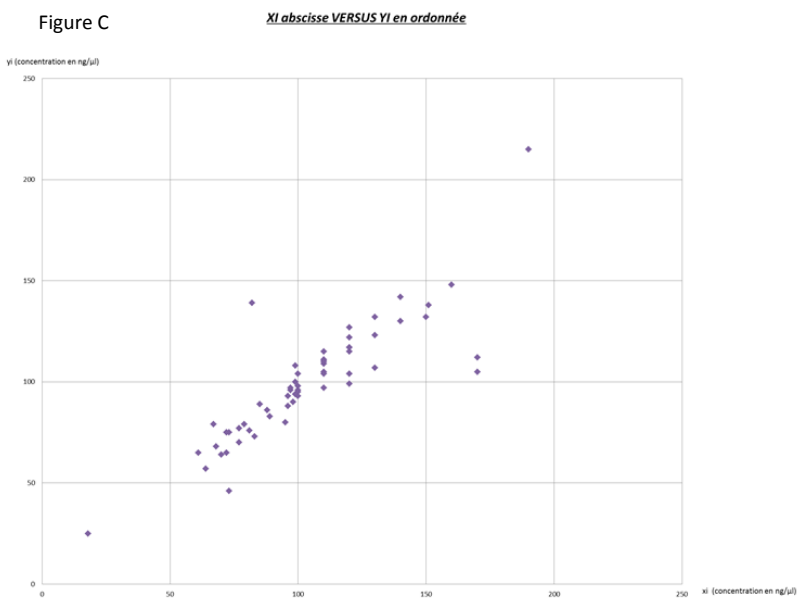


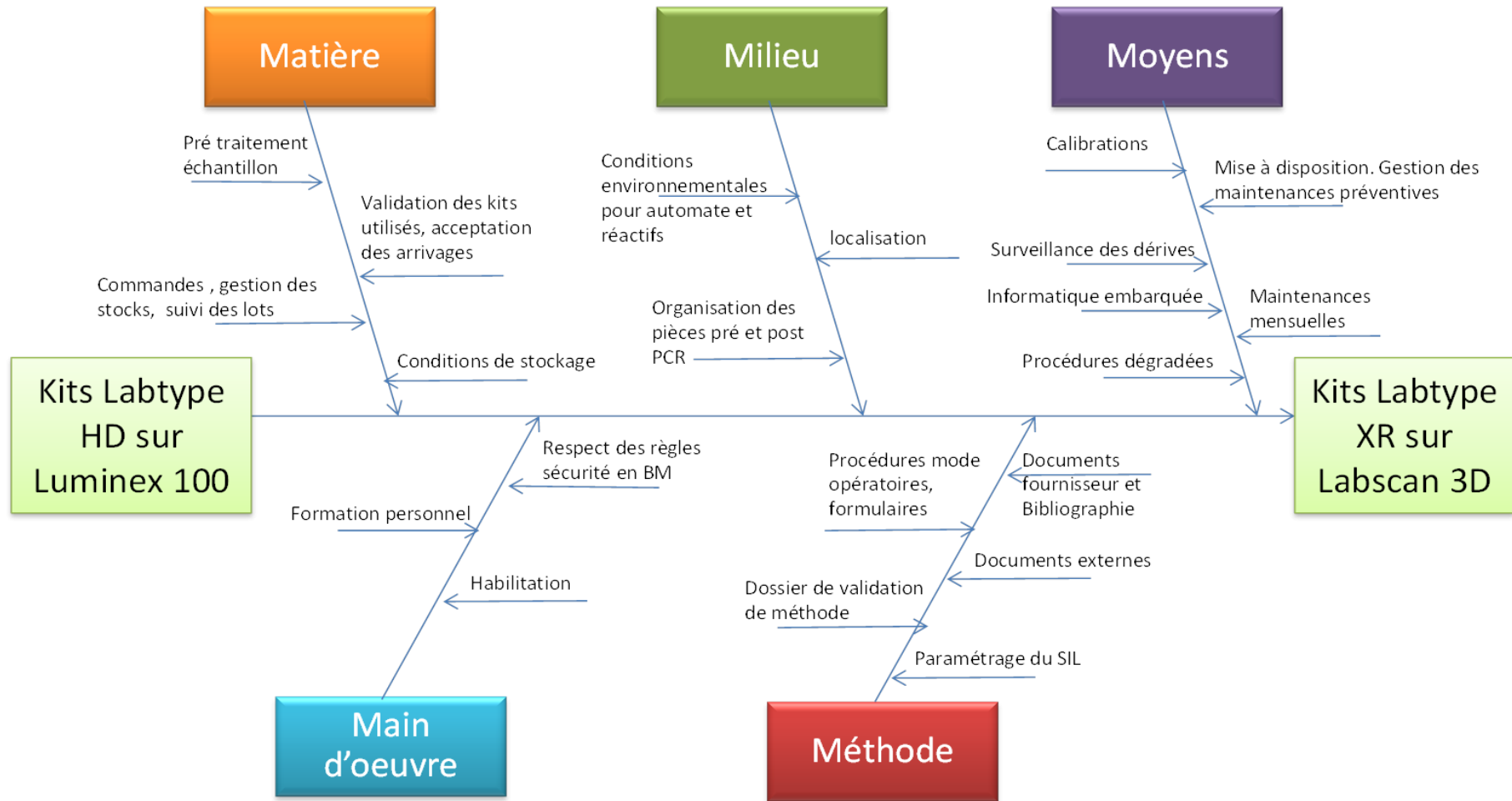
Figure C



La figure A, montre une répartition homogène des valeurs négatives et positives, ce qui élimine l'existence d'un biais.

Les figures B et C montrent une répartition homogène des valeurs, hormis une discordance pour 3 valeurs. Effectivement nous avons observés 3 échantillons discordants et la discordance était dans les 2 sens. Ceci n'a pas eu d'impact sur la technique PCR SSO utilisée (MFI > 1000 et pas de Faux Positifs, Faux Négatifs, ni changement de cut-off de la NV).

Annexe 7 : Diagramme d'ISHIKAWA résumant une analyse de risque par la méthode des 5M



Annexe 8 : Résultats du test de contamination inter échantillons

Protocole

Un échantillon de patient homozygote B1 est analysé 3 fois consécutivement (B1(1), B1(2), B1(3)) suivi d'un échantillon de patient homozygote B2 (B2(1), B2(2), B2(3)) «également analysé 3 fois consécutivement. Ces séquences sont répétées 5 fois sur une même plaque d'analyse

Plan de plaque du protocole

Tneg	B2(1)	B2(3)	B1(2)	B2(1)						
Tpos	B2(2)	B1(1)	B1(3)	B2(2)						
H20	B2(3)	B1(2)	B2(1)	B2(3)						
H20	B1(1)	B1(3)	B2(2)							
H20	B1(2)	B2(1)	B2(3)							
B1(1)	B1(3)	B2(2)	B1(1)							
B1(2)	B2(1)	B2(3)	B1(2)							
B1(3)	B2(2)	B1(1)	B1(3)							

Méthode de calcul :

Le calcul du % de contamination inter-échantillon est déterminé comme suit:

$$(\text{MoyB2(1)} - \text{MoyB2(3)} \times 100 / (\text{MoyB1} - \text{MoyB2(3)}) \quad \text{ou} \quad (\text{MoyB1(1)} - \text{MoyB1(3)} \times 100 / (\text{MoyB2} - \text{MoyB1(3)})$$

Tableau de synthèse des résultats d'absence de contamination inter échantillons en PCR SSO Labscan 3D							
<i>les billes 620 et 806 positives pour les deux échantillons ont été écartées</i>							
% de risque de contamination de l'échantillon B1 vers l'échantillon B2							
n° de bille	moyenne B1	moyenne B1 (1)	moyenne B1 (3)	B1(1)-B1(3)	moyenne B2	moyenne B2-B1(3)	% conta inter éch.
610	140,0	138,0	141,2	-3,2	1,0	-140,2	2,3
619	93,2	93,0	93,8	-0,8	5,7	-88,1	0,9
630	141,3	139,6	142,8	-3,2	0,0	-142,8	2,2
638	108,0	107,6	108,4	-0,8	1,0	-107,4	0,7
649	257,3	255,8	258,0	-2,2	0,0	-258,0	0,9
658	101,6	101,2	101,8	-0,6	0,0	-101,8	0,6
661	208,7	207,2	209,8	-2,6	0,0	-209,8	1,2
712	105,5	104,2	106,8	-2,6	7,5	-99,3	2,6
748	83,5	83,2	84,2	-1,0	0,0	-84,2	1,2
766	135,0	133,8	136,6	-2,8	0,0	-136,6	2,0
775	200,6	199,0	202,6	-3,6	0,0	-202,6	1,8
816	134,5	133,4	135,2	-1,8	0,0	-135,2	1,3
953	103,1	102,0	103,8	-1,8	6,7	-97,1	1,9
toutes les billes Pos	139,4	138,3	140,4	-2,1	1,7	-138,7	1,5
% de risque de contamination de l'échantillon B2 vers l'échantillon B1							
n° de bille	moyenne B2	moyenne B2 (1)	moyenne B2 (3)	B2(1)-B2(3)	moyenne B1	moyenne B1-B2(3)	% conta inter éch.
607	71,1	70,6	71,2	-0,6	0,0	-71,2	0,8
623	75,2	75,0	75,0	0,0	0,0	-75,0	0,0
657	81,3	80,6	81,6	-1,0	0,0	-81,6	1,2
673	111,8	110,2	112,6	-2,4	0,0	-112,6	2,1
684	19,3	19,0	19,8	-0,8	1,0	-18,8	4,3
697	67,1	67,0	67,6	-0,6	10,9	-56,7	1,1
742	167,9	168,0	167,4	0,6	0,0	-167,4	-0,4
876	135,9	136,2	137,2	-1,0	0,0	-137,2	0,7
900	61,5	61,0	61,6	-0,6	0,0	-61,6	1,0
903	70,0	69,8	70,0	-0,2	0,0	-70,0	0,3
949	92,2	93,2	90,6	2,6	0,0	-90,6	-2,9
974	105,5	105,8	106,0	-0,2	3,4	-102,6	0,2
toutes les billes Pos	88,23	88,03	88,38	-0,35	1,27	-87,11	0,71

Résultats :

Conclusion : Absence de contamination inter-échantillons.

Stabilité des réactifs**Résultats attendus:** - concordance des typages (codes NMDP)

- Pas de FP/FN

Résultats:

RSSO B XR								
	date	MFI exon 2 bille 513	MFI exon 3 bille 532	MFI exon 4&5 bille	MFI neg ctrl 535	Arrivage du :	modif cut off	codes NMDP
ouverture kit	03/01/2018	6136	4218	5585	20	07/11/17 lot004 batch189531 - boite 1		B*07:AUVAG, 57:AJNUA
	11/01/2018	5827	3873	5423	24			B*07:AUVAG, 57:AJNUA
	15/01/2018	6501	5055	6170	23			B*07:AUVAG, 57:AJNUA
19/01/2018	5628	5120	5344	21			B*07:AUVAG, 57:AJNUA	
	moyenne	6023	4566,5	5630,5	22			
	ET	381,1	618,4	373,4	1,8			
	CV %	6,3	13,5	6,6	8,3			
ouverture kit	23/01/2018	6731	5065	5599	19	07/10/17 lot004 batch189531 - boite 2		B*07:AUVAG, 57:AJNUA
	29/01/2018	5736	4536	5378	18		bead 47 : 16>18	B*07:AUVAG, 57:AJNUA
	05/02/2018	5366	3290	5135	17			B*07:AUVAG, 57:AJNUA
12/02/2018	5736	3767	5393	15			B*07:AUVAG, 57:AJNUA	
	moyenne	5892,25	4164,5	5376,25	17,25			
	ET	585,7	789,9	189,8	1,7			
	CV %	9,9	19,0	3,5	9,9			

RSSO DR XR							
	date	MFI exon 2 bille 534	MFI neg ctrl 535	Arrivage du :	modif cut off	codes NMDP	
ouverture kit	03/01/2018	4074	28	07/11/2017 lot 004 BATCH0000217578 - BOITE 1		DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	11/01/2018	5132	20			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	15/01/2018	4491	16			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	19/01/2018	4709	14			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
fin de kit	23/01/2018	5760	16		630 : 20>22	DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	moyenne	4833,2	18,7				
	ET	643,7	5,6				
	CV %	13,3	30,0				
ouverture kit	29/01/2018	5553	13	07/11//2017 lot 004 BATCH0000217578 - BOITE 2		DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	05/02/2018	4181	11			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	12/02/2018	5070	16			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	16/02/2018	5739	15			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
fin de kit	21/02/2018	5549	22			DRB1*04:AVGZR, DRB1*13:05	
	moyenne	5218,4	15,4				
	ET	630,6	4,2				
	CV %	12,1	27,2				

Conclusion : Pendant la durée d'utilisation des kits, les MFI des billes PC restent supérieures à 1000 comme préconisé par le fournisseur (p10 notice) et les codes NMDP restent conformes aux résultats attendus. Pour tous les typages réalisés, la positivité ou la négativité de chaque bille, par rapport au seuil établi par le fournisseur est celle attendue; seuls les seuils de 2 billes faussement positives ont été changés.

Résultats obtenus avec les trois kits XR à valider :

Kit RSSOX1B (lot 004):

Echantillons	Nombre (n)	bille	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Concordance des résultats
ADN témoin (CQI)	20	PC 513 (MFI)	5690	761	13.38	conforme
		PC 532 (MFI)	4564	721	15.79	conforme
		PC 654 (MFI)	5079	587	11.55	conforme
		NC 535 (MFI)	22.9	9.4	40.99	conforme
		Pos761 (NV)	171.45	14.45	8.43	conforme
		Pos 769 (NV)	155	16.23	10.47	conforme
		Pos 794 (NV)	40.97	3.38	8.24	conforme
		Pos 510 (NV)	34.72	3.84	11.07	conforme
		Pos 785 (NV)	36.17	4.04	11.16	conforme
		Neg 582 (NV)	9.52	2.56	26.88	conforme
		Neg 770 (NV)	10.97	1.94	17.66	conforme
		Neg 768 (NV)	0.59	0.50	85.5	conforme
		Neg 988 (NV)	6.72	2.34	34.85	conforme
Neg 664 (NV)	9.76	2.17	22.19	conforme		

Kit RSSOX1C (lot 001):

Echantillons	Nombre (n)	bille	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Concordance des résultats
ADN témoin (CQI)	20	PC 513 (MFI)	4365	683.84	15.67	conforme
		PC 532 (MFI)	3235	445.24	13.76	conforme
		PC 654 (MFI)	3773	759.54	20.13	conforme
		PC 667 (MFI)	4035	615.27	15.25	conforme
		NC 535 (MFI)	34	9.84	28.90	conforme
		Pos 607 (NV)	37.39	6.49	17.35	conforme
		Pos 748 (NV)	45.13	3.97	8.80	conforme
		Pos 697 (NV)	54.26	4.45	8.21	conforme
		Pos 816 (NV)	68.70	8.35	12.15	conforme
		Pos 955 (NV)	61.35	6.41	10.44	conforme
		Neg 828 (NV)	9.61	3.61	37.62	conforme
		Neg 588 (NV)	12.91	2.07	15.99	conforme
		Neg 855 (NV)	7.35	2.55	34.72	conforme
Neg 502 (NV)	6	2.58	42.94	conforme		
Neg 602 (NV)	7	2.30	32.80	conforme		

Kit RSSOX2B1 (lot 004) :

Echantillons	Nombre (n)	bille	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Concordance des résultats
ADN témoin (CQI)	20	PC 534 (MFI)	5258	928.21	17.66	conforme
		NC 535 (MFI)	19.54	4.85	24.8	conforme
		Pos 575 (NV)	45.67	10.40	22.78	conforme
		Pos 542 (NV)	71.30	7.78	10.91	conforme
		Pos 506 (NV)	73.48	27.77	37.79	conforme
		Pos 582 (NV)	79.41	12.50	15.74	conforme
		Pos 770 (NV)	65.52	7.30	11.14	conforme
		Neg 604 (NV)	1.63	0.97	59.32	conforme
		Neg 606 (NV)	9.44	2.17	13	conforme
		Neg 762 (NV)	6.67	1.71	25.65	conforme
		Neg 814 (NV)	3.52	0.75	21.4	conforme
Neg 570 (NV)	7.48	1.12	15	conforme		

Argumentaire de la conclusion :

Billes négatives : large panel de CV mais les NV varient de 1 à 18, très en dessous des seuils de positivité et il n'y a aucun impact sur le rendu du résultat qualitatif. Les billes concernées restent négatives selon les critères du fournisseur et le génotypage obtenu est conforme à celui attendu.

Billes positives : malgré une variation du CV pouvant atteindre 38% (les NV varient de 17 à 216), il n'y a pas d'impact sur le rendu du résultat qualitatif. Les billes concernées restent bien positives selon les critères du fournisseur et le génotypage obtenu reste inchangé.

Nous pouvons ainsi définir qu'un CV acceptable peut être fixé à 38 % pour les billes positives et ne nécessite pas d'être fixé sur les billes négatives tant que le résultat de la NV est sans impact sur le résultat qualitatif.