

Étude de la stabilité des sérums suite à une séquence de congélation-décongélation dans le cadre de l'accréditation COFRAC



Amandine POUSSARD
Étudiante pharmacie en 5ième AHU
2013 - 2014

Accréditation COFRAC ISO NF 15189

- **But:**

Reconnaissance par ce comité français d'accréditation, qu'un laboratoire est **compétent** pour effectuer des tâches spécifiques.

- **Étapes:**

- Audit initial par des experts COFRAC pour déterminer si le dossier d'un laboratoire est recevable
- Visites et résultats des autocontrôles
 - > But: s'assurer de la compétence d'un laboratoire pour les analyses pour lesquelles il a demandé l'accréditation
- Décision définitive par le directeur du COFRAC
- Obtention de l'accréditation pour une durée déterminée, renouvelable
- **Surveillance** par des audits de contrôle

Méthodologie

- Dosage lors de l'arrivée du prélèvement dans le laboratoire. Puis, chaque sérum a été congelé 1 fois puis décongelé afin de le tester à nouveau.
 - **Exception** des Ig E spécifiques, où l'on a réalisé 3 séquences de congélation-décongélation successives pour se rapprocher des conditions réelles.
- Exploitation des résultats:
 - Méthode ELISA: reproductibilité de la méthode est acceptable si valeur du CV laboratoire moyen est **<15%** (mesure de la dispersion des résultats, déterminé par la laboratoire)

$$\text{CV en \%} = \frac{(s)}{m} \times 100$$

Dosage des anticorps anti-thyroperoxydase (TPO)

- **Méthodologie** : Méthode de dosage immunologique en 2 étapes par chimioluminescence.
 - 1) Fixation des Ac anti-TPO du sérum du patient, s'ils sont présents, sur des microparticules recouvertes de TPO (Ag).
 - 2) Ajout d'un conjugué marqué qui reconnaît les Ig G humaines. La chimioluminescence détectée est proportionnelle à la quantité d'Ac anti-TPO du patient.
- Appareil utilisé Architect system[®] (Abbott).



Dosage des anticorps anti-thyroperoxydase (TPO)

- 82 sérums testés chez 67 patients

Date_1	Valeurs	Date_2	Valeurs	Moyenne	Ecart type	CV laboratoire
26/03/2012	80	04/09/2012	85	82,5	3,536	4,285%
09/04/2013	155	07/05/2013	152	153,5	2,121	1,382%
07/03/2013	7306	13/05/2013	7126	7216	127,279	1,764%
10/11/2011	1624	04/05/2012	1446	1535	125,865	8,200%
03/05/2012	1428	10/04/2013	1369	1398,5	41,719	2,983%
21/09/2011	1477	31/08/2012	1440	1458,5	26,163	1,794%
30/08/2012	991	04/09/2013	1086	1038,5	67,175	6,468%
11/07/2011	1816	11/06/2012	1505	1660,5	219,910	13,244%
24/09/2012	53	17/12/2012	54	53,5	0,707	1,322%
31/08/2011	20	10/01/2012	14	17	4,243	24,957%
18/05/2012	1601	25/03/2013	1483	1542	83,439	5,411%
15/05/2012	812	11/06/2012	736	774	53,740	6,943%
05/12/2012	192	27/06/2013	229	210,5	26,163	12,429%
31/01/2013	28	04/04/2013	20	24	5,657	23,570%
23/09/2011	57	20/01/2012	48	52,5	6,364	12,122%
20/01/2012	59	25/09/2012	61	60	1,414	2,357%
28/07/2011	1967	06/11/2012	1334	1650,5	447,599	27,119%
27/07/2013	110	09/08/2013	111	110,5	0,707	0,640%
15/03/2012	15	28/09/2012	13	14	1,414	10,102%
27/07/2011	2316	07/03/2012	2876	2596	395,980	15,253%
05/03/2012	727	25/03/2013	690	708,5	26,163	3,693%
25/03/2013	77	28/06/2013	92	84,5	10,607	12,552%
14/11/2011	220	20/11/2012	229	224,5	6,364	2,835%
30/08/2011	122	28/11/2012	75	98,5	33,234	33,740%
01/08/2011	720	12/11/2012	520	620	141,421	22,810%
25/01/2012	72	03/04/2012	87	79,5	10,607	13,342%
31/10/2011	1734	30/10/2012	1675	1704,5	41,719	2,448%
24/10/2012	1241	10/09/2013	1266	1253,5	17,678	1,410%
09/08/2012	33	29/08/2012	33	33	0,000	0,000%
15/11/2011	31	12/02/2013	33	32	1,414	4,419%
16/01/2012	414	28/02/2013	492	453	55,154	12,175%
25/05/2011	724	21/09/2012	632	678	65,054	9,595%
19/09/2011	47	27/01/2012	48	47,5	0,707	1,489%
03/01/2012	1636	03/05/2012	1912	1774	195,161	11,001%
24/04/2012	1600	12/10/2012	1579	1589,5	14,849	0,934%
17/12/2013	92	19/04/2013	92	92	0,000	0,000%
10/04/2013	11	25/09/2013	14	12,5	2,121	16,971%
20/08/2012	1151	05/09/2013	1112	1131,5	27,577	2,437%
06/09/2011	1156	14/06/2013	771	963,5	272,236	28,255%
03/05/2013	76	29/08/2012	75	75,5	0,707	0,937%
04/12/2012	62	25/09/2013	64	63	1,414	2,245%
04/01/2012	12	27/06/2013	14	13	1,414	10,879%
21/05/2012	443	18/09/2013	438	440,5	3,536	0,803%

Dosage des anticorps anti-thyroperoxydase (TPO)

Date_1	Valeurs	Date_2	Valeurs	Moyenne	Ecart type	CV laboratoire
20/02/2012	11	08/05/2012	11	11	0,000	0,000%
07/03/2012	60	20/09/2013	53	56,5	4,950	8,761%
23/09/2011	38	02/12/2011	38	38	0,000	0,000%
22/07/2011	184	12/08/2011	221	202,5	26,163	12,920%
12/08/2011	200	26/06/2012	147	173,5	37,477	21,600%
18/10/2011	5	05/10/2012	2	3,5	2,121	60,609%
05/10/2011	15	05/12/2011	16	15,5	0,707	4,562%
24/04/2013	436	28/06/2013	360	398	53,740	13,503%
27/06/2013	315	27/08/2013	300	307,5	10,607	3,449%
23/06/2011	12	10/10/2011	14	13	1,414	10,879%
07/10/2011	17	06/12/2011	16	16,5	0,707	4,285%
07/06/2011	9	03/09/2013	11	10	1,414	14,142%
19/04/2013	11	05/09/2013	11	11	0,000	0,000%
06/09/2011	12	27/06/2012	9	10,5	2,121	20,203%
26/05/2011	369	02/07/2013	376	372,5	4,950	1,329%
11/01/2012	1291	27/03/2013	1430	1360,5	98,288	7,224%
08/01/2013	1598	20/06/2013	1455	1526,5	101,116	6,624%
03/04/2012	331	17/01/2013	299	315	22,627	7,183%
01/02/2013	11	19/04/2013	12	11,5	0,707	6,149%
16/04/2013	12	26/04/2013	12	12	0,000	0,000%
24/09/2012	6	18/09/2013	6	6	0,000	0,000%
19/07/2011	17	01/06/2012	15	16	1,414	8,839%
25/04/2012	333	13/06/2013	343	338	7,071	2,092%
14/06/2012	206	20/08/2013	206	206	0,000	0,000%
19/07/2011	698	18/09/2013	644	671	38,184	5,691%
20/07/2011	21	07/01/2013	15	18	4,243	23,570%
19/01/2012	17	13/11/2012	19	18	1,414	7,857%
13/12/2011	46	10/06/2013	50	48	2,828	5,893%
30/06/2011	12	12/08/2011	14	13	1,414	10,879%
22/02/2012	343	13/05/2013	317	330	18,385	5,571%
05/04/2013	10	10/04/2013	16	13	4,243	32,636%
10/04/2013	16	02/08/2013	13	14,5	2,121	14,630%
14/05/2012	2	06/08/2013	4	3	1,414	47,140%
15/06/2011	95	13/06/2012	88	91,5	4,950	5,410%
13/06/2012	107	16/05/2013	125	116	12,728	10,972%
20/07/2011	938	14/06/2012	810	874	90,510	10,356%
13/06/2012	388	07/05/2013	372	380	11,314	2,977%
17/02/2012	859	10/05/2012	828	843,5	21,920	2,599%
10/05/2012	470	17/09/2012	497	483,5	19,092	3,949%
16/08/2011	242	27/09/2012	168	205	52,326	25,525%

CV laboratoire
moyen = 9,7 %

Objectif du CV
laboratoire fixé
<15%

IFI

- **Méthodologie** : Méthode d'immunofluorescence indirecte grâce à un Ac anti (Fab')₂ marqué à la fluorescéine.

Remarque: Le même opérateur a été choisi pour lire les titres, afin de garantir la meilleure reproductibilité possible.

- Appareil utilisé : Distribution: PhD system[®] de Bio-Rad
Lecture: Microscope à fluorescence

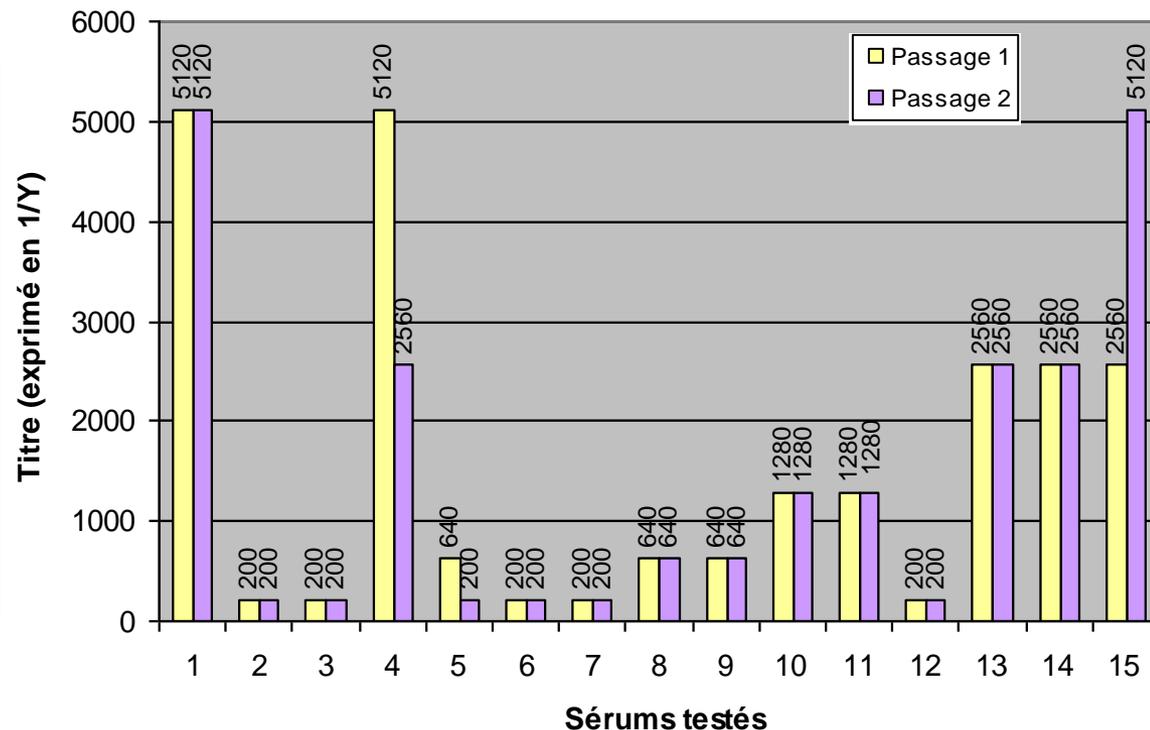
Immunofluorescence indirecte

•Résultats: (15 sérums)

2 sérums: ↓ de leurs titres d'une dilution.

1 sérum: ↑ de son titre d'une dilution.

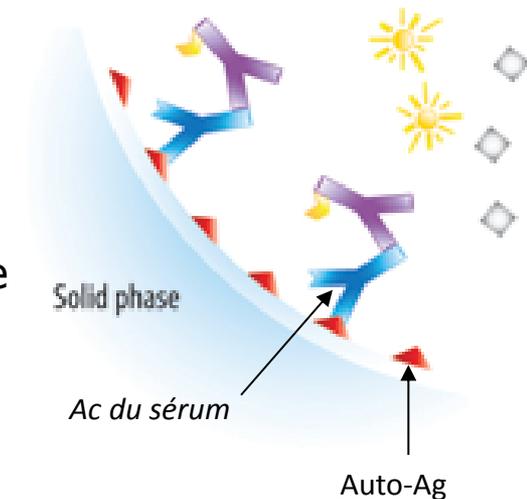
Écart non significatif entre les valeurs



Dosage des anticorps anti-myéloperoxydase (MPO) et anti-protéinase 3 (PR3)

○ **Méthodologie** : Utilisation d'une méthode directe ELISA.

- 1) Fixation des Ac du sérum du patient à des auto-Ag spécifiques.
- 2) Ajout d'un conjugué marqué par une enzyme afin de révéler la réaction. La fluorescence de l'éluât est ensuite mesurée et est proportionnelle à la quantité d'Ac fixée.



○ Appareil utilisé : ImmunoCAP[®] 250 de Thermo Fisher

Dosage des anticorps anti-myélopéroxydase (MPO) et anti-protéinase 3 (PR3)

- Ac anti- PR3 (12 sérums)

Date_1	Valeurs (Uv/mL)	Date_2	Valeurs (Uv/mL)	Moyenne	Ecart type	CV Laboratoire
17/04/2013	16	14/05/2013	16	16	0	0,000%
20/06/2013	6,3	15/07/2013	5,9	6,1	0,282	4,637%
23/05/2013	7,6	20/06/2013	11	9,3	2,404	25,851%
14/05/2013	8,7	23/05/2013	9,5	9,1	0,565	6,216%
17/04/2013	16	14/05/2013	16	16	0	0,000%
28/02/2013	58	17/04/2013	42	50	11,313	22,627%
07/05/2013	72	10/06/2013	73	72,5	0,707	0,975%
08/08/2013	30	19/09/2013	36	33	4,242	12,856%
05/06/2013	160	11/07/2013	122	141	26,870	19,057%
23/10/2012	27,33	17/12/2012	30,91	29,12	2,531	8,693%
11/07/2013	46	08/08/2013	46	46	0	0,000%
29/11/2012	63	14/01/2013	62	62,5	0,707	1,131%

CV laboratoire moyen =
8,5 %

Objectif du CV laboratoire
fixé **<15%**

Dosage des anticorps anti-myélopéroxydase (MPO) et anti-protéinase 3 (PR3)

- Ac anti-MPO (22 sérums)

date_1	Valeurs (Uv/mL)	date_2	Valeurs (Uv/mL)	Moyenne	Ecart type	CV laboratoire
13/03/2012	98	09/05/2012	121	109,5	16,263	14,852%
09/05/2012	62	21/06/2012	60	61	1,414	2,318%
21/06/2012	32	12/07/2012	29	30,5	2,121	6,955%
12/07/2012	26	10/07/2013	17	21,5	6,363	29,600%
13/07/2012	15	17/05/2013	13	14	1,414	10,102%
17/05/2013	6,3	26/07/2013	4,9	5,6	0,989	17,678%
28/08/2012	8,4	29/10/2012	6,6	7,5	1,272	16,971%
18/10/2012	130	14/10/2012	160	145	21,213	14,630%
24/09/2012	127	18/10/2012	131	129	2,828	2,193%
31/01/2013	18	28/02/2013	20	19	1,414	7,443%
21/12/2012	26	31/01/2013	24	25	1,414	5,657%
26/11/2012	43	21/12/2012	39	41	2,828	6,899%
17/09/2012	130	26/11/2012	130	130	0	0,000%
27/11/2012	13	04/03/2013	12	12,5	0,707	5,657%
04/03/2013	9,6	28/06/2013	7,8	8,7	1,272	14,630%
10/09/2012	11	27/11/2012	15	13	2,828	21,757%
23/02/2012	23	07/02/2012	23	23	0	0,000%
12/01/2012	33	23/02/2012	41	37	5,656	15,289%
24/04/2013	92	17/06/2013	109	100,5	12,020	11,961%
17/06/2013	38	08/07/2013	25	31,5	9,192	29,182%
28/02/2013	18	05/08/2013	22	20	2,828	14,142%
16/01/2012	16	04/06/2013	16	16	0	0,000%

CV laboratoire
moyen = 11,3 %

Objectif du CV
laboratoire fixé
<15%

Dosage des Ac anti-Peptide Cyclique Citrulliné (CCP)

- **Méthodologie** : Technique ALBIA (Adressable Laser Bead Immuno Assays) ou de multiplexage
 - 1) Fixation des Ac du sérum du patient sur un Ag spécifique préalablement fixé à une bille fluorescente.
 - 2) Ajout d'un conjugué possédant un fluorochrome que l'on excite avec un laser afin de déterminer la quantité d'Ac fixé.

- Appareil utilisé : BioPlex® 2200 de Bio-Rad.

Dosage des Ac anti-Peptide Cyclique Citrulliné (CCP)

- 15 sérums testés:

Date	Valeurs	Date	Valeurs	Moyenne	Ecart type	CV Laboratoire
18/12/2012	241	07/10/2013	237	239	2,828	1,183%
27/10/2012	27,6	07/10/2013	26,9	27,25	0,494	1,816%
19/09/2012	19	07/10/2013	18,5	18,75	0,353	1,886%
27/09/2013	5,6	07/10/2013	5,7	5,65	0,070	1,252%
04/06/2013	65,7	07/10/2013	65,4	65,55	0,212	0,324%
03/12/2012	5,9	07/10/2013	5,9	5,9	0	0,000%
20/12/2012	204,6	07/10/2013	239,2	221,9	24,465	11,026%
04/01/2013	3,4	07/10/2013	3,5	3,45	0,070	2,050%
31/01/2013	28,7	07/10/2013	29,3	29	0,424	1,463%
27/10/2012	17	07/10/2013	21	19	2,828	14,886%
18/01/2013	177	07/10/2013	232	204,5	38,890	19,018%
01/03/2013	123	07/10/2013	141	132	12,727	9,642%
06/09/2013	185	07/10/2013	189	187	2,828	1,513%
14/09/2012	174	07/10/2013	161	167,5	9,192	5,488%
09/11/2012	147	07/10/2013	135	141	8,485	6,018%

CV laboratoire moyen =
5,2%

Objectif du CV
laboratoire fixé **<15%**

Bilan



○ Exploitation des résultats:

- Similitude des résultats après une séquence de congélation-décongélation des sérums (en tenant compte de la petite taille des échantillons)
- Éléments du sérum, mis en jeu dans ces réactions, ne sont donc pas altérés au vu des résultats
- Tests effectués sont suffisamment performants en regard des objectifs que le laboratoire d'immunologie s'est fixé: CV laboratoire moyen **<15 %**

Dosage	Ac anti-TPO	Ac anti-PR3	Ac anti-MPO	IgE spécifique	Ac anti-CCP
CV laboratoire moyen	9,7%	8,5%	11,3%	7,2%	5,2%

La conservation des sérums au congélateur plusieurs mois pour réaliser de nouvelles analyses, si nécessaire, est donc validée.

Remarque: Analyses réalisées sur un nombre restreint de sérums.



○ Sources utilisées:

-Guide technique d'accréditation: en biologie médicale, et le guide technique d'accréditation: contrôle de qualité en biologie médicale

=> réalisés par le COFRAC

-<http://www.phadia.com/en/>



Merci de votre attention

*Un grand remerciement à toute l'équipe du
laboratoire d'immunologie...*