
DIRECTION
QUÉBÉCOISE
DU CANCER

**Guide sur l'assurance qualité en
anatomopathologie**

Phases pré-analytique et analytique

Comité consultatif en anatomopathologie

Novembre 2011

Ce guide constitue un outil fondé sur les données probantes. Il a été élaboré par le Comité consultatif en anatomopathologie. Son contenu n'engage que ses auteurs.

Ce document est disponible en version électronique à l'adresse www.msss.gouv.qc.ca/cancer.

Le genre masculin utilisé dans ce document désigne aussi bien les femmes que les hommes.

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2011

Bibliothèque et Archives Canada, 2011

ISBN : 978-2-550-63419-5 (version PDF)

Tous droits réservés pour tous pays. La reproduction, par quelque procédé que ce soit, la traduction ou la diffusion du présent document, même partielles, sont interdites sans l'autorisation préalable des Publications du Québec. Cependant, la reproduction partielle ou complète du document à des fins personnelles et non commerciales est permise, uniquement sur le territoire du Québec et à condition d'en mentionner la source.

© Gouvernement du Québec, 2011

Le *Guide sur l'assurance qualité en anatomopathologie – phases pré-analytique et analytique* a été préparé par le Comité consultatif en anatomopathologie. La production de ce document a été rendue possible grâce au soutien financier de la Direction québécoise du cancer du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS).

Rédaction

M. Jim Boulanger, Ph.D., Direction québécoise du cancer, MSSS
 M. Bruno Houde, technologiste médical, Hôpital Fleurimont (CHUS)
 M^{me} Mélanie Morneau, M.Sc., MBA, Direction québécoise du cancer, MSSS
 M^{me} Céline Plourde, technologiste médicale, Hôpital du Saint-Sacrement (CHAUQ)
 D^r Gilles Théorêt, anatomopathologiste, Cité de la Santé (CSSS de Laval)
 D^r Pierre-Paul Turgeon, anatomopathologiste, Hôpital du Haut-Richelieu (CSSS Haut-Richelieu-Rouville)

Révision externe

M. Alain Leclaire, assistant chef technologiste, Hôpital du Haut-Richelieu (CSSS Haut-Richelieu-Rouville)
 L'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec (OPTMQ) émet un avis favorable quant au contenu de ce document. Les membres du sous-comité en anatomopathologie de l'Ordre ont participé à sa révision :

- › M. Denis Bouchard, T.M.
- › M^{me} Martine Chalifoux, T.M.
- › D^r Louis Gaboury, anatomopathologiste, président de l'Association des pathologistes du Québec (APQ)
- › M. Bruno Houde, T.M., vice-président de l'OPTMQ
- › M^{me} Cindy Laliberté, T.M.
- › M^{me} Anne-Marie Martel, T.M., chargée de dossiers scientifiques de l'OPTMQ
- › M^{me} Josée Senécal, T.M.
- › M^{me} Chantale Tremblay, T.M.

L'APQ a approuvé le contenu de ce document lors d'une rencontre de son conseil d'administration.

Révision interne et adoption

Comité consultatif en anatomopathologie

Exécutif :	Bernard TÊTU, président, anatomopathologiste à l'Hôpital du Saint-Sacrement (CHAUQ) Louis R. BÉGIN, anatomopathologiste à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, représentant du RUIS de l'Université de Montréal Pierre-Paul TURGEON, anatomopathologiste au Centre de santé et de services sociaux (CSSS) du Haut-Richelieu-Rouville, représentant de l'APQ Mélanie KAVANAGH, coordonnatrice, Ph.D., Direction québécoise du cancer, MSSS
Membres :	Chantal BERNARD, anatomopathologiste à l'Hôpital pour Enfants de Montréal (CUSM), représentante du RUIS de l'Université McGill Jim BOULANGER, Ph.D., Direction québécoise du cancer, MSSS Chantal CARON, anatomopathologiste à l'Hôpital du Saint-Sacrement (CHAUQ), représentante du RUIS de l'Université Laval (membre jusqu'en août 2011) Christian COUTURE, anatomopathologiste à l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, représentant du RUIS de l'Université Laval (membre depuis novembre 2011) Micheline FAUVEL, représentante du Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) Normand GERVAIS, chirurgien au CSSS de Rivière-du-Loup, représentant du Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO) Bruno HOUDE, technologiste médical à l'Hôpital Fleurimont (CHUS), représentant de l'OPTMQ Sylvain MAILHOT, anatomopathologiste au CSSS de Rimouski-Neigette, président du Comité d'assurance qualité en pathologie du LSPQ Edmond RIZCALLAH, anatomopathologiste à l'Hôpital Fleurimont (CHUS), représentant du RUIS de l'Université de Sherbrooke

Résumé

Le Comité consultatif en anatomopathologie a été formé en 2008 par la Direction de la lutte contre le cancer, maintenant Direction québécoise du cancer depuis le 1^{er} avril 2011, pour répondre aux besoins de cette spécialité. Le mandat général de ce Comité consiste à déterminer les principaux enjeux de l'anatomopathologie (p. ex. : qualité, recherche, besoins de formation, effectifs) et à proposer des interventions spécifiques pour l'amélioration continue de la qualité en respect des principes de la médecine fondée sur les données probantes. L'un de ses mandats plus spécifiques est de développer un programme global d'assurance qualité en anatomopathologie et d'émettre des recommandations visant l'amélioration de la qualité.

Afin de répondre à ce mandat, le Comité consultatif en anatomopathologie a déposé à la Direction de la lutte contre le cancer le 30 octobre 2009 le Plan global d'assurance qualité en anatomopathologie, lequel comprend 20 recommandations pour l'implantation d'un Programme québécois d'assurance qualité en anatomopathologie. Ces recommandations touchent notamment l'assurance qualité interne, les contrôles externes de qualité et les diverses mesures de soutien pour les laboratoires. Le Comité consultatif a jugé prioritaire de revoir les pratiques en assurance qualité pour les phases pré-analytique et analytique des techniques histologiques de base. Le présent document porte sur l'assurance qualité en histopathologie pour les phases pré-analytique et analytique et constitue le premier d'une série.

En 2003, Jacques C. Fortier et René Hould ont publié le volume de référence intitulé « Histotechnologie : théorie et procédés ». Cet ouvrage constitue l'assise du présent guide de pratique. En complément de cet ouvrage, une revue de la documentation scientifique a été effectuée en utilisant l'outil de recherche *PubMed*. La période couverte s'est étendue de janvier 2003 à octobre 2011. Les recommandations émises par quatre associations internationales ont été retenues. Deux articles de revue et trois consensus d'experts ont également été répertoriés.

L'analyse de la documentation scientifique permet de confirmer que des contrôles de qualité doivent être appliqués systématiquement dans tout laboratoire d'anatomopathologie. Ceux-ci doivent cibler tant les composantes pré-analytiques (prélèvement, transport et fixation des spécimens, puis préparation des lames) que l'analyse et les composantes post-analytiques en histologie (entreposage du matériel biologique et des rapports d'anatomopathologie).

Considérant les données probantes disponibles à ce jour, le Comité consultatif en anatomopathologie a énoncé une série de recommandations dans le but d'améliorer la qualité des manipulations effectuées relativement aux composantes pré-analytiques et analytiques de l'histologie, de même qu'à leur consignation dans un registre pour l'évaluation interne et externe du laboratoire.

Summary

The Pathology Advisory Committee was formed in 2008 by the Direction de la lutte contre le cancer (now called Direction québécoise du cancer since April 1, 2011) to address special needs in this field. Its overall mandate is to identify key issues in pathology (e.g., quality, research, training needs, staffing) and suggest specific interventions for the ongoing improvement of quality in accordance with the principles of evidence-based medicine. One of its more specific mandates is to develop a comprehensive quality assurance program in pathology and to make recommendations aimed at improving quality.

To fulfill this mandate, the Pathology Advisory Committee submitted a comprehensive quality assurance plan to the Direction de la lutte contre le cancer on October 30, 2009, that included 20 recommendations for implementing a Québec quality assurance program in pathology. These recommendations address issues of internal quality assurance, external quality control, and laboratory support measures. The advisory committee's priority was to review quality assurance practices in basic histological techniques. This first document focuses on histopathology quality assurance in the preanalytical and post-analytical phases.

In 2003 Jacques C. Fortier and René Houde published a reference work entitled *Histotechnologie: théorie et procédés*. It was used as the basic document for this guideline. In addition a literature review was conducted using the PubMed search tool. The search period covered January 2003 to October 2011. Recommendations from four international associations, two review articles, and the three consensus reports were identified.

An analysis of the scientific literature confirms that quality controls must be applied systematically in all pathology laboratories. They must cover both the preanalytical (sampling, transportation and fixation of specimens, and slide preparation) and post-analytical (storage of biological material and of pathology reports) components.

Considering the available data to date, the Pathology Advisory Committee laid out recommendations to improve quality of the preanalytical and post-analytical histological components and how these should be recorded for internal and external laboratory audit.

Table des matières

Résumé	4
Summary	5
1. Question clinique	7
2. Mise en contexte	7
3. Méthode	8
4. Résultats	9
4.1. Fortier et Hould	9
4.1.1. Prélèvement et transport des tissus	9
4.1.2. Fixation	10
4.1.3. Circulation	11
4.1.4. Inclusion/enrobage	11
4.1.5. Microtomie	12
4.1.6. Étalement	12
4.1.7. Coloration de routine	12
4.1.8. Montage des lames	13
4.1.9. Conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie	13
4.2. <i>College of American Pathologists</i>	13
4.3. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques	15
4.4. Association canadienne des pathologistes	16
4.5. <i>American Society of Clinical Oncology</i>	17
4.6. Autres publications	17
5. Discussion et recommandations	20
5.1. Prélèvement et transport des tissus	20
5.1.1. Identification du (des) prélèvement(s)	20
5.1.2. Transport des spécimens	21
5.1.3. Réception des spécimens	22
5.2. Fixation	23
5.2.1. Protocole de fixation pour les tumeurs du sein	24
5.3. Circulation	25
5.4. Inclusion/enrobage	27
5.5. Microtomie	28
5.6. Étalement	28
5.7. Coloration et préparation des lames	29
5.8. Conservation des blocs, des lames et des rapports d'anatomopathologie	31
5.9. Entretien de l'équipement	31
6. Conclusion	33
7. Références	34
8. Annexe I	35
9. Annexe II	36
10. Annexe III	37

1. Question clinique

Quelles sont les procédures d'assurance qualité interne de base qui devraient être effectuées systématiquement dans tout laboratoire d'anatomopathologie relativement aux composantes pré-analytique et analytique de l'histologie, c'est-à-dire du prélèvement jusqu'à la coloration histologique de base, de même qu'à la consignation des éléments requis dans un registre pour l'évaluation interne et externe du laboratoire ?

2. Mise en contexte

Le Comité consultatif en anatomopathologie a été formé à l'automne 2008 par la Direction de la lutte contre le cancer, maintenant Direction québécoise du cancer depuis le 1^{re} avril 2011, pour répondre aux besoins de cette spécialité. Le mandat général de ce Comité consiste à déterminer les principaux enjeux de l'anatomopathologie (p. ex. : qualité, recherche, besoins de formation, effectifs) et à proposer des interventions spécifiques pour l'amélioration continue de la qualité en respect des principes de la médecine fondée sur les données probantes. L'un des mandats spécifiques de ce Comité consistait à développer un programme global d'assurance qualité en anatomopathologie et à émettre des recommandations visant l'amélioration de la qualité, notamment en donnant suite au rapport de l'Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS) sur la détermination du statut du marqueur HER-2 dans le cancer du sein [1] et en proposant des critères permettant au ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) de développer un modèle organisationnel pour l'évaluation de marqueurs de thérapie ciblée.

Afin de répondre à ce mandat, le Comité consultatif en anatomopathologie a déposé à la Direction de la lutte contre le cancer le 30 octobre 2009 le Plan global d'assurance qualité en anatomopathologie, qui comprend 20 recommandations pour l'implantation d'un Programme québécois d'assurance qualité en anatomopathologie (PAQ) [2]. Ces recommandations touchent notamment l'assurance qualité interne, les contrôles externes de qualité, la hiérarchisation des laboratoires et les diverses mesures de soutien pour les laboratoires. Le MSSS a signifié son engagement à adopter l'ensemble des recommandations contenues dans ce Plan global en rendant public le 31 mars 2010 un Plan d'action ministériel visant la mise en œuvre du PAQ [3].

Plus spécifiquement, l'une des recommandations du Plan global d'assurance qualité en anatomopathologie est à l'effet que des lignes directrices concernant le contrôle interne de qualité soient précisées en fonction de techniques spécifiques. Ce guide de pratique constitue donc le premier d'une série de documents qui permettront de répondre à cette recommandation. À cet effet, le Comité consultatif a jugé prioritaire de revoir en premier lieu les pratiques en assurance qualité pour les phases pré-analytique et analytique des techniques histologiques de base.

Ce guide de pratique fait donc état de la documentation scientifique pertinente sur ce sujet et vise à déterminer les mécanismes d'assurance qualité interne de base qui devraient être effectués systématiquement dans tout laboratoire d'anatomopathologie relativement aux composantes pré-analytique et analytique de l'histologie, c'est-à-dire du prélèvement jusqu'à la coloration histologique de base, de même qu'à la consignation des éléments requis dans un registre pour l'évaluation interne et externe du laboratoire.

3. Méthode

En 2003, Jacques C. Fortier et René Hould ont publié le volume de référence « Histotechnologie : théorie et procédés ». Cet ouvrage constitue l'assise du présent guide de pratique clinique.

En complément de cet ouvrage, un suivi continu et prospectif de la littérature scientifique publiée entre janvier 2003 et novembre 2011 a été effectué en utilisant les mots clés *Histology* [MeSH], *pathology* [MeSH] et *histological preparation techniques* [MeSH] dans l'outil de recherche *PubMed*. La recherche s'est limitée aux essais cliniques randomisés, aux méta-analyses, aux revues systématiques et aux guides de pratique publiés en anglais ou en français. Seules les publications traitant de la phase pré-analytique de l'histopathologie ont été répertoriées. Les études à caractère économique n'ont pas été retenues.

Les guides de pratique et les recommandations pour la pratique clinique émis par certains organismes internationaux, associations professionnelles et agences de cancer ont également été répertoriés. Notamment, les sites Internet des organismes suivants ont été consultés : le *College of American Pathologists* (CAP), l'Association canadienne des pathologistes (ACP), le *Quality Management Program – Laboratory Services* (QMP-LS) de l'Ontario, l'Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques (AFAQAP), l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO), *Cancer Care Ontario*, la *British Columbia Cancer Agency*, l'*European Society of Medical Oncology*, la *National Guideline Clearinghouse*, le *National Institute for Health and Clinical Excellence*, la *Cochrane Library of Systematic Reviews* et la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer. La bibliographie des articles sélectionnés a permis de compléter la revue de la documentation scientifique.

Un sous-comité du Comité consultatif en anatomopathologie a rédigé le présent guide et un groupe d'experts indépendants a par la suite effectué la révision externe. Des représentants de l'Association des pathologistes du Québec et de l'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec ont également révisé le document, qui a été entériné par chacune des associations. Le Comité consultatif en anatomopathologie a finalement adopté la version finale du présent document.

4. Résultats

La revue des données probantes a permis d'identifier les publications suivantes :

- › « Histotechnologie : techniques et procédés », de Fortier et Hould [4] ;
- › la liste d'accréditation du CAP pour l'anatomopathologie [5] et les recommandations pour la conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie [6] ;
- › les recommandations de bonnes pratiques en anatomie et cytologie pathologiques de l'AFAQAP [7] ;
- › les recommandations de l'ACP pour la standardisation des tests d'immunohistochimie [8] et la conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie [9] ;
- › les recommandations de l'ASCO concernant les tests de détermination du statut des récepteurs hormonaux et du HER-2 dans le cancer du sein [10, 11].

Cinq autres publications ont également été répertoriées grâce à l'outil de recherche *Pubmed*, incluant deux revues de la littérature [12, 13] et trois consensus d'experts [14-16].

Les recommandations de chacune de ces publications sont décrites successivement en détail dans les sections qui suivent.

4.1. Fortier et Hould

En 2003, Jacques C. Fortier et René Hould ont publié le volume de référence « Histotechnologie : théorie et procédés », qui décrit l'ensemble des procédés de routine ou spécialisés utilisés dans les laboratoires d'histopathologie, de cytologie et de cytogénétique, et dans lequel sont revues les bases chimiques et physiques de ces méthodes, leur portée et leurs limites, de même que l'interprétation des résultats [4]. Les éléments propres à l'assurance qualité interne des phases pré-analytique et analytique retrouvés dans ce volume sont décrits en fonction de neuf sous-thèmes, qui correspondent aux différentes étapes du prélèvement jusqu'à la conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie.

4.1.1. Prélèvement et transport des tissus

En principe, tous les prélèvements tissulaires et cellulaires doivent parvenir au service de pathologie et être soumis à un examen anatomopathologique. Ceci inclut tous les prélèvements chirurgicaux, c'est-à-dire les tissus prélevés par le biais d'une intervention chirurgicale, et les spécimens biopsiques prélevés dans le but d'obtenir un diagnostic rapide et précis. Ces derniers doivent faire l'objet d'un acheminement prioritaire et rapide afin d'être traités sans délai. Les prélèvements peuvent également inclure les implants artificiels enlevés au cours d'interventions chirurgicales et les corps étrangers qui sont retirés du corps humain.

Fortier et Hould recommandent qu'un protocole de prélèvement des échantillons soit fourni par le service de pathologie à toute personne susceptible de soumettre des spécimens au laboratoire de pathologie. Ce protocole doit contenir des instructions précises sur les échantillons, incluant les méthodes de fixation de tous les types de prélèvements, les critères d'acceptation d'un spécimen, et les instructions relatives aux modalités de transmission des échantillons.

Tous les échantillons doivent être clairement identifiés à l'aide d'un formulaire attaché à l'envoi, sous format papier ou électronique, qui devrait contenir le nom et prénom du patient, au moins un identifiant supplémentaire (numéro de dossier, numéro d'assurance maladie ou date de naissance), le site et la nature du prélèvement, la date et l'heure du prélèvement, le nom du médecin requérant et le nom des

médecins devant recevoir une copie du rapport final, les renseignements cliniques pertinents, les résultats de l'observation macroscopique *in vivo* et les examens prescrits.

Les prélèvements tissulaires doivent être acheminés à l'état frais ou dans une solution saline s'ils peuvent être envoyés très rapidement. Dans le cas des prélèvements qui ne peuvent être acheminés dans les plus brefs délais au laboratoire, il faut prévoir l'ajout d'un fixateur qui convient à la majorité des spécimens. Celui-ci doit correspondre au protocole établi par le laboratoire de pathologie, qui doit être distribué à tous les services susceptibles d'envoyer des spécimens. Lorsqu'il s'agit d'organes entiers comme le poumon, la rate, le foie ou l'intestin, il est préférable d'acheminer promptement le spécimen au laboratoire de pathologie où une préparation particulière, avant la fixation, assure la conservation adéquate de la totalité du tissu.

La réception des spécimens doit être sous la responsabilité d'un membre du personnel de laboratoire possédant les compétences nécessaires. Le préposé à la réception doit suivre les instructions du cahier de politique du laboratoire concernant la réception et l'acceptation d'échantillons, c'est-à-dire vérifier les éléments suivants : s'assurer que le formulaire d'analyse dûment rempli accompagne le spécimen, vérifier qu'il y a concordance entre les renseignements du formulaire et du spécimen, inscrire sur le formulaire tout phénomène susceptible d'affecter la qualité du spécimen (p. ex. : autolyse), assigner à chaque spécimen un numéro de laboratoire, et éviter d'inscrire l'un après l'autre les noms de patients identiques ou semblables et les échantillons de même type afin de réduire les risques de confusion et de contamination. Selon les politiques et la loi en vigueur, les renseignements suivants doivent être consignés dans un registre : la date, le numéro du laboratoire, les nom et prénom du patient, le nom du médecin requérant, le type d'échantillon reçu et toute autre donnée pertinente. La consultation des données relatives à l'enregistrement doit être possible en tout temps.

4.1.2. Fixation

La fixation est un traitement qui a pour effet d'immobiliser les composantes cellulaires d'un tissu dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, tout en assurant d'abord sa conservation et en facilitant ensuite la confection de préparations permanentes en vue de l'examen microscopique de ce tissu. La fixation est la seule étape de la technique histologique qui soit **définitive et irréversible**.

Fortier et Hould ont identifié plusieurs facteurs pouvant influencer la qualité de la fixation :

- › vitesse de pénétration : les liquides fixateurs pénètrent les tissus à des vitesses différentes en fonction de l'agent fixateur utilisé. Il doit y avoir concordance entre la vitesse de pénétration du fixateur, le temps de séjour du tissu dans le fixateur et les dimensions de la pièce de tissu. De façon générale, les liquides fixateurs standards ont une vitesse de pénétration approximative de 1,0 mm/h.
- › vitesse de la réaction de fixation : ce facteur est plus difficile à déterminer, étant donné que la réaction n'a pas nécessairement lieu au moment où le fixateur pénètre le tissu.
- › volume de fixateur : pour obtenir des résultats optimaux, le tissu devrait idéalement être plongé dans une quantité de fixateur équivalent à 15 à 20 fois son volume.
- › épaisseur de la pièce de tissu : une épaisseur de 3 à 5 mm est considérée comme idéale pour les tissus à fixer avec les fixateurs usuels.
- › consistance des pièces : plus un tissu est dense, plus il sera difficile pour le fixateur de le pénétrer, et plus il est susceptible de durcir de façon excessive si on le laisse trop longtemps dans certains fixateurs.

- › Durée de la fixation : la durée de fixation est capitale, car elle peut être responsable de plusieurs des effets négatifs de la fixation. Elle dépend de l'agent fixateur utilisé, de son volume, de sa concentration, de son pH, de l'épaisseur de la pièce à fixer, etc.
- › Concentration : généralement utilisée selon une préparation déjà établie.
- › Température : la chaleur modérée est susceptible d'accélérer la fixation.
- › pH : il est conseillé d'employer des fixateurs dont le pH se situe entre 6 et 8, les valeurs extrêmes étant plutôt nuisibles et pouvant entraîner des réactions tissulaires indésirables.

Toute constatation concernant un spécimen incorrectement fixé doit être immédiatement signalée au clinicien responsable et systématiquement notée dans le rapport d'analyse. Il est possible de refuser un spécimen qui n'est pas fixé et qui présente une autolyse majeure, car il pourrait en résulter un diagnostic inadéquat.

4.1.3. Circulation

La circulation a pour but de donner un support interne au tissu, c'est-à-dire de rendre le tissu solidaire, en tout point, d'un milieu suffisamment rigide pour que l'on puisse le manipuler sans risquer de l'abîmer puis le couper en tranches minces pour l'observation microscopique. La circulation comprend trois étapes, soit la déshydratation, l'éclaircissement et l'imprégnation.

Fortier et Hould recommandent que le technicien respecte les étapes suivantes, afin d'éviter toute inversion ou perte de tissus : 1) programmer le circulateur en fonction de la taille des tissus afin d'optimiser la fixation ou la post-fixation, s'il y a lieu ; 2) au moment de la déshydratation, s'assurer que la concentration du premier bain d'agent déshydratant, généralement de l'éthanol, se situe entre 50 et 70 %, et que celle du dernier bain atteint 100 % ; 3) à l'étape de l'éclaircissement, s'assurer que la solution contenue dans les bains soit pure ; 4) sur le plan de l'imprégnation à la paraffine, s'assurer qu'au moins deux bains, sinon trois, contiennent une paraffine pure, sans trace de xylène ou de toluène ; 5) vérifier quotidiennement le niveau de liquide dans les bains et procéder au renouvellement des solutions et au décalage des bains selon les exigences établies par le laboratoire, noter le moment de ces changements dans un registre et les parapher ; 6) vérifier et enregistrer quotidiennement la température de la paraffine et s'assurer qu'elle correspond aux normes d'imprégnation ; 7) procéder à l'entretien des appareils selon le programme d'entretien préventif établi, noter dans le registre approprié les opérations effectuées, puis dater et parapher.

4.1.4. Inclusion/enrobage

L'objectif de l'inclusion est de fournir un support externe au tissu pendant et après la coupe au microtome, tout en assurant une meilleure conservation du tissu pendant une période indéfinie. De plus, au moment de la coupe, la présence de paraffine autour du tissu facilite la formation de rubans.

Selon Fortier et Hould, le technicien doit respecter plusieurs consignes au moment de l'enrobage de pièces. Il doit d'abord respecter le plan de coupe établi au cours de la macroscopie. En effet, l'orientation adéquate de la pièce est primordiale, car l'étude simultanée des différentes structures du tissu en dépend. Il doit également centrer les spécimens pour éviter qu'ils ne touchent à la paroi du support d'inclusion. Il doit s'assurer que tous les spécimens sont orientés dans le même sens afin de faciliter la coupe et la lecture au microscope. Il doit vérifier quotidiennement la température des composantes du système d'enrobage (distributeur de paraffine, plaque chauffante, plaque réfrigérée, puits de chauffage des pinces), enregistrer les données, les dater et les parapher. Il doit établir un horaire pour la vidange et

le nettoyage du distributeur de paraffine. Enfin, il doit procéder à l'entretien préventif de l'appareil et noter dans le registre approprié les opérations effectuées, les dater et les parapher.

4.1.5. Microtomie

La microtomie consiste à utiliser un microtome pour l'obtention de coupes minces de tissus. La qualité des coupes dépend en grande partie de la fixation et de la circulation des spécimens. Il existe différents types de microtomes.

Fortier et Hould donnent plusieurs consignes au technicien en ce qui concerne la coupe au microtome. Celui-ci doit s'assurer d'orienter le couteau et les blocs avec précision, de raboter les blocs de paraffine jusqu'à l'exposition totale de la surface de l'échantillon tout en s'assurant de ne pas surexposer le tissu ni causer la perte de lésions importantes, de s'assurer de la qualité du biseau afin d'obtenir des coupes qui ne sont pas striées, de couper les pièces en respectant l'épaisseur recommandée par le laboratoire en fonction du type de tissu et des techniques subséquentes, de nettoyer quotidiennement le microtome, et de procéder à l'entretien des microtomes selon un programme d'entretien préventif établi et noter dans le registre approprié les opérations effectuées, les dater et les parapher.

4.1.6. Étalement

L'étalement des coupes consiste à aplanir le tissu avant de l'immobiliser sur la lame. Pour ce faire, deux méthodes peuvent être utilisées, soit l'étalement sur lame de verre légèrement chaude et l'étalement du tissu sur eau chaude.

En ce qui concerne les procédures d'étalement, Fortier et Hould recommandent que le technicien vérifie fréquemment le bain d'étalement afin de le maintenir à la température optimale, maintienne un niveau d'eau optimal afin d'assurer un étalement adéquat, ajoute un adhésif à l'eau du bain d'étalement lorsque requis, inscrive quotidiennement la température dans un registre et le paraphe, étiquète clairement chacune des lames d'après le bloc auquel elles correspondent, enlève les plis qui restent sur les coupes tout en évitant tout contact avec le fragment tissulaire, centre la coupe sur la lame et la laisser s'égoutter, appose ses initiales sur la lame, fasse sécher les lames dans un four ou une étuve à une température adéquate, garde le bain d'étalement exempt de débris tissulaires, et change le milieu d'étalement au minimum une fois par semaine afin d'éviter l'apparition de contaminants.

4.1.7. Coloration de routine

La coloration de routine permet de mettre en évidence les principaux éléments morphologiques des tissus, comme le noyau, le cytoplasme et les fibres de collagène. Deux techniques de coloration de routine sont généralement utilisées, soit la méthode à l'hématoxyline-éosine ainsi que celle à l'hématoxyline-phloxine-safran. La technique de coloration implique de déparaffiner (toluène ou xylène), d'hydrater, de colorer selon le type de coloration choisi puis de déshydrater les coupes. Il est important de vérifier régulièrement au microscope les résultats de la coloration des divers éléments à différentes étapes du processus.

Pour accomplir une coloration de routine de qualité, le technicien doit respecter certains critères, notamment :

- › la vérification quotidienne du niveau de liquide dans chaque bain ;
- › le filtrage des solutions colorantes quotidiennement ou plus d'une fois par jour si présence de débris tissulaires ;

- › l'établissement d'un horaire pour le renouvellement et le décalage des bains, considérant qu'il faut changer les bains d'éthanol et de toluène quotidiennement et les bains de colorant selon la quantité de lames colorées ;
- › l'inclusion d'une lame témoin dans chaque série de lames à colorer, préférablement des coupes témoins provenant d'un même bloc jusqu'à épuisement de celui-ci afin d'effectuer une vérification adéquate ;
- › la vérification de la qualité de la lame témoin au microscope et l'apport de corrections lorsque requis ;
- › la tenue à jour d'un registre indiquant les corrections apportées.

4.1.8. Montage des lames

Le montage des lames consiste à recouvrir une coupe de tissu étalée sur une lame d'une lamelle de verre, qui est retenue par une substance de conservation, ou milieu de montage. Le montage permet d'assurer une protection contre la décoloration et la détérioration de la couleur causée par l'oxydation, en plus de protéger le tissu contre les multiples manipulations.

La technique de montage implique d'étendre un filet de résine sur le bas de la lame, sous la coupe de tissu, de déposer la lamelle, préalablement trempée dans le solvant du milieu de montage, sur le filet de résine, selon un angle de 45 à 90° puis de la laisser descendre délicatement sur le tissu en évitant la formation de bulles d'air jusqu'à ce que toute la surface de la lamelle soit en contact avec la lame. Une coupe bien montée devrait être propre, sans bulle et sans excès de colle.

Pour le montage des lames, Fortier et Hould recommandent que le technicien évite de laisser sécher la coupe entre la fin de la coloration et le début du montage, utilise des lamelles propres, de bonne qualité et de longueur adéquate, s'assure que le milieu de montage soit étendu uniformément et évite la formation de bulles d'air, s'assure que le nombre de lames montées corresponde au nombre de blocs préparés en macroscopie, étiquète la lame de façon claire et précise ou effectue le marquage permanent de la lame, et vérifie qu'il y ait concordance entre les lames et les requêtes.

4.1.9. Conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie

Les échantillons tout comme les rapports d'anatomopathologie doivent être conservés de façon à maintenir leur intégrité advenant l'ajout d'analyses ultérieures ou pour consultation future. Des procédures opératoires normalisées doivent être établies, spécifiant, entre autres, la durée et la température de conservation requise.

Pour la conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie, Fortier et Hould recommandent que les laboratoires possèdent une liste des délais de conservation basée sur le document de l'ACP dont les grandes lignes sont présentées à l'annexe I [9].

4.2. College of American Pathologists

Le CAP fournit à ses membres inscrits au programme d'accréditation des laboratoires diverses listes des éléments sujets à l'inspection. La liste pour l'anatomopathologie a été révisée en juin 2010 [5]. Plusieurs questions destinées au laboratoire évalué y sont incluses, classées selon divers thèmes. Les questions se rapportant spécifiquement à l'assurance qualité lors de la phase pré-analytique de l'histologie sont les suivantes :

Examen des spécimens chirurgicaux

- › Des espaces réfrigérés sont-ils disponibles pour les gros spécimens non fixés ?
- › Les contenants des spécimens sont-ils étiquetés avec au minimum deux identifiants ?
- › Existe-t-il des procédures documentées pour la manipulation de spécimens sous-optimaux (p. ex. : spécimens non identifiés, laissés non fixés ou non réfrigérés sur une longue période) ?
- › L'identité de chaque spécimen est-elle maintenue en tout temps lors des étapes de traitement des échantillons et d'examen ?
- › Lorsque des individus autres que le pathologiste ou le résident traitent les spécimens, l'étendue de leurs activités est-elle définie dans un protocole documenté ?
- › Lorsque des individus autres que le pathologiste ou le résident traitent les spécimens, la nature de la supervision effectuée par le pathologiste (directe ou indirecte) est-elle documentée pour chaque type de spécimen ?
- › Existe-t-il des procédures écrites pour le traitement des spécimens ?
- › Des lignes directrices ou instructions pour la dissection, la description et l'échantillonnage histologiques de divers types de spécimens sont-elles disponibles ?
- › Existe-t-il une preuve documentée de la revue quotidienne par le pathologiste de la qualité technique des préparations histologiques ?
- › Les lames sont-elles de qualité suffisante (fixation des tissus, épaisseur des coupes, absence de plis et de déchirures interférents, qualité de la technique de coloration) pour le diagnostic ?

Contrôle général de la qualité

- › Est-ce que l'identité de chaque spécimen est maintenue à chaque étape de traitement et de préparation des lames ?
- › Les blocs sont-ils identifiés adéquatement ?
- › Les lames sont-elles identifiées de façon permanente, lisible et adéquate ?
- › Le laboratoire de pathologie documente-t-il le nombre de blocs, de lames et de colorations préparées ?
- › Les réactifs et les solutions sont-ils adéquatement étiquetés avec les éléments suivants : contenu et quantité, concentration ou titre ; conditions d'entreposage requises ; date de préparation ou de reconstitution par le laboratoire ; date de péremption ?
- › Les réactifs sont-ils tous utilisés à l'intérieur de leur date de péremption ?
- › Les réactifs sont-ils tous entreposés tel que recommandé par le manufacturier ?

Instruments et équipement

- › Les solutions du circulateur sont-elles changées tel que requis (intervalles en fonction du volume d'activité) ?
- › La température des bains de paraffine dans le circulateur est-elle vérifiée régulièrement et documentée ?

- › L'appareil d'inclusion est-il propre et bien entretenu ?
- › La température de l'appareil d'inclusion est-elle vérifiée régulièrement et documentée ?
- › La température est-elle ajustée adéquatement en fonction du type de paraffine utilisé ?
- › Les bains d'étalement sont-ils propres et bien entretenus, et existe-t-il une procédure pour prévenir une contamination croisée des sections de paraffine dans le bain ?
- › Les microtomes sont-ils propres, bien entretenus, lubrifiés adéquatement, selon le cas, et sans jeu excessif dans le mécanisme d'avance ?
- › Les lames du microtome sont-elles affûtées et non striées ?

Rangement et matériels

- › Les lames et les blocs de paraffine sont-ils entreposés de manière organisée (accessibles dans le cas d'une réévaluation ou d'une reprise, correctement identifiés) ?

Le CAP a publié en 1998 (révisé en 2010) une série de recommandations visant la conservation des échantillons et des rapports d'anatomopathologie [6]. Afin de se conformer à ces recommandations, les laboratoires cliniques doivent conserver adéquatement les rapports d'anatomopathologie et les échantillons pour une période de temps nécessaire à l'éducation, aux besoins des patients, à l'évaluation de la qualité ou à tout autre besoin. L'annexe I présente un résumé des délais prescrits selon le spécimen entreposé.

4.3. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques

En février 2010, l'AFAQAP a publié la deuxième version de ses recommandations de bonnes pratiques en anatomie et cytologie pathologiques [7]. L'objectif de ces recommandations est d'encadrer la pratique dans les laboratoires de pathologie. Certaines des recommandations sont propres à la phase pré-analytique de l'histologie :

- › Identification du prélèvement : nom, prénom, sexe, date de naissance, numéro d'identification du patient, adresse du patient ou service de consultation ou d'hospitalisation, nom du médecin ayant fait le prélèvement et ses coordonnées.
- › Formulaire de demande d'examen : ce document est indispensable, car il permet de colliger, au-delà des identifiants du patient, plusieurs éléments/informations (caractère urgent ou non de la demande, nature du prélèvement, renseignements cliniques, siège des échantillons pour les petites biopsies et les prélèvements cytologiques, recherches particulières à réaliser, date et heure du prélèvement, nom des correspondants et leurs coordonnées).
- › Conditionnement et transmission du prélèvement : L'identification correcte d'un prélèvement et sa préservation jusqu'à la réception par le laboratoire sont essentielles. Le conditionnement des échantillons doit être conforme à la réglementation. L'identification du patient doit figurer sur le contenant. Tout prélèvement à l'état frais est considéré comme potentiellement infectieux. Tout prélèvement nécessitant d'être traité par le laboratoire à l'état frais est acheminé selon des modalités prédéfinies. Si un fixateur est utilisé, il correspond à celui spécifié par le laboratoire. Le personnel des salles de prélèvement est informé des modalités de son utilisation et de la prévention des risques chimiques afférents. Une procédure spécifique est mise en place pour l'acheminement

des prélèvements nécessitant une technique ou un diagnostic en urgence. Une procédure spécifique est mise en place pour la transmission des prélèvements en dehors des heures d'ouverture du laboratoire.

- › Réception et enregistrement du prélèvement : Le personnel chargé de la réception dispose d'une procédure décrivant les actions à accomplir en fonction des caractéristiques du prélèvement. La procédure d'enregistrement précise les règles de numérotation applicables à la demande d'examen et aux prélèvements associés. Pour chaque examen doivent être consignés : les identifiants dossier patient, la date de prélèvement, la date et l'heure d'enregistrement, et les caractéristiques du prélèvement (type, organe/région anatomique, etc.) La procédure d'enregistrement permet de déceler toute anomalie d'identification, d'acheminement ou de transmission. La gestion des prélèvements non-conformes fait l'objet d'une procédure spécifique. Les causes de ces non-conformités sont périodiquement analysées et des solutions sont recherchées avec les médecins demandeurs.

Certaines recommandations sont également spécifiques à la phase pré-analytique de l'immunohistochimie :

- › Délai entre excision/ponction et fixation : les délais à la fixation des prélèvements sont suffisamment courts pour éviter la dégradation antigénique et la diffusion extra-cytoplasmique des protéines intracellulaires. Le laboratoire définit dans ses procédures les délais adaptés aux préparations pour l'immunohistochimie.
- › Fixation : la fixation est homogène et complète, la durée de fixation est conforme aux recommandations et le volume de fixateur est adapté à celui de l'échantillon.
- › Coupes tissulaires : les coupes tissulaires ont 3 à 5 µm d'épaisseur. Elles sont déposées sur des lames prétraitées pour une adhésion maximale du tissu au support.

Certaines recommandations concernent la conservation des blocs et des lames :

- › Les lames et les blocs sont maintenus dans des conditions techniques permettant leur conservation et leur exploitation et conformes à la réglementation.
- › Il est recommandé de conserver les résidus macroscopiques après l'envoi des rapports d'anatomopathologie selon une durée définie.

4.4. Association canadienne des pathologistes

L'ACP a publié en juillet 2009 des recommandations pour la standardisation des tests d'immunohistochimie [8]. Elle émet certaines recommandations quant à la phase pré-analytique des tests d'immunohistochimie de classe II. Le processus de traitement du tissu (type de fixateur et temps de fixation préalablement au dépôt du spécimen dans le circulateur) doit être documenté et inclus dans le rapport d'anatomopathologie. La fixation des tissus devrait être effectuée dans du formol tamponné 10 % à pH neutre (pH 7,2-7,6 aqueux). Un temps de fixation de 8 à 72 heures est généralement recommandé.

Le temps entre l'excision chirurgicale du spécimen et son dépôt dans le fixateur devrait être optimisé. Les spécimens devraient être coupés immédiatement en tranches de 5-10 mm d'épaisseur à la suite de

l'inspection grossière et de la détermination des marges, et ensuite placés dans un volume suffisant (20 : 1) de formol tamponné 10 %.

Une fixation plus longue pouvant aller jusqu'à dix jours est acceptable et ne constitue pas un critère d'exclusion pour la plupart des tests d'immunohistochimie, à condition que le spécimen ait été préalablement sectionné. En effet, la sous-fixation est davantage délétère que la sur-fixation.

4.5. American Society of Clinical Oncology

L'ASCO a publié en juillet 2010, en collaboration avec le CAP, un guide de pratique pour l'analyse immunohistochimique des récepteurs de l'œstrogène et de la progestérone dans le cancer du sein [10]. L'ASCO recommande que le temps entre le prélèvement du spécimen et sa fixation soit le plus court possible. Les échantillons devraient être fixés dans du formol tamponné 10 % pour une durée de 6 à 72 heures. Les spécimens devraient être coupés à intervalles de 5 mm à la suite de l'inspection grossière et de la détermination des marges et placés dans un volume suffisant de formol tamponné pour permettre la pénétration adéquate du tissu. Si la tumeur provient d'un hôpital ou d'un laboratoire extérieur, celle-ci devrait être hémi-sectionnée lors du prélèvement et être acheminée au laboratoire principal immergée dans un volume suffisant de formol tamponné. L'heure à laquelle le spécimen est retiré du patient, l'heure à laquelle il est placé dans le fixateur (le délai entre les deux correspond à l'ischémie froide), la durée de la fixation et le type de fixateur doivent être documentés et notés dans le rapport d'anatomopathologie.

L'ASCO a également publié en janvier 2007, en collaboration avec le CAP, un guide de pratique pour la détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein [11]. L'ASCO recommande que le temps entre le prélèvement du spécimen et sa fixation soit le plus court possible. Les échantillons devraient être fixés dans du formol tamponné 10 % pour une période de 6 à 48 heures. Les spécimens devraient être coupés en tranches de 5 à 10 mm d'épaisseur à la suite de l'inspection grossière et de la détermination des marges et placés dans un volume suffisant de formol tamponné pour permettre la pénétration adéquate du tissu. L'utilisation de lames préparées et entreposées depuis plus de six semaines pour les analyses de détermination du statut HER-2 par immunohistochimie n'est pas recommandée. L'heure et la durée de la fixation, ainsi que le type de fixateur utilisé, devraient être documentés pour chaque échantillon si disponible.

4.6. Autres publications

Albanell et al. ont publié en juin 2009 les lignes directrices de la *Spanish Society of Pathology* (SEAP) et de la *Spanish Society of Medical Oncology* (SEOM) pour la détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein [14]. Dans ce guide, certaines recommandations sont émises quant aux processus de fixation, d'inclusion et de microtomie. Il est recommandé que pour tous les spécimens soient documentés le délai avant la fixation, le temps de fixation et le type de fixateur utilisé. L'intervalle entre l'acquisition du spécimen et la fixation devrait être le plus court possible. Les biopsies incisionnelles et excisionnelles devraient être fixées dans du formol tamponné 10 % pour une durée variant entre 24 et 48 heures. L'utilisation d'un volume de fixateur équivalent à au moins quatre fois le volume du spécimen est recommandée. Les protocoles de circulation rapide basés sur l'utilisation de micro-ondes ne sont pas recommandés.

Les pièces tissulaires devraient avoir une longueur de 1 à 1,5 cm et une épaisseur de 0,2 cm pour une circulation adéquate. Les coupes histologiques devraient avoir une épaisseur de 3 à 5 µm. Il est recommandé de laisser sécher les lames à 60°C pour une heure ou à 37°C toute la nuit. Les coupes

entreposées depuis plus de six semaines ne devraient pas être utilisées pour l'étude immunohistochimique d'HER-2.

Iyengar a publié en janvier 2009 un article de revue sur les contrôles de qualité dans le laboratoire d'histopathologie [12]. Quelques étapes pour implanter un contrôle adéquat des processus pré-analytiques y sont décrites :

- › Des procédures standard pour le prélèvement, l'identification, l'acceptation/rejet, l'examen macroscopique et l'échantillonnage des spécimens, de même que pour toutes les étapes subséquentes, devraient être documentées. Ces procédures devraient utiliser un langage clair, être disponibles dans l'aire de travail et être connues de tout le personnel technique.
- › Le renouvellement des solutions utilisées pour la circulation devrait être planifié en fonction d'un nombre de pièces tissulaires traitées. Le laboratoire devrait documenter le nombre d'échantillons traités par jour et systématiquement changer les solutions lorsque la limite d'échantillons traités prédéterminée est atteinte. Ceci s'applique également aux processus de déparaffinage, de coloration, de déshydratation et d'éclaircissement des coupes.
- › L'utilisation régulière de contrôles pour les colorations de routine est recommandée. Pour la coloration à l'hématoxyline-éosine, le laboratoire peut identifier un bloc de tissu à forte réactivité à l'hématoxyline et à l'éosine (p. ex. : fibroadénome, col de l'utérus). La lame contrôle devrait être colorée avant le lot de lames à tester et comparée à la coloration obtenue la journée précédente.
- › L'enregistrement de la température des bains de paraffine, du bain d'étalement et de la plaque de séchage des lames devrait être effectué quotidiennement. Les équipements utilisés devraient être de qualité standard et être calibrés à intervalles périodiques.
- › Le microtome devrait être de bonne qualité et régulièrement entretenu. La calibration périodique du micromètre est requise pour assurer la constance de l'épaisseur des coupes. L'utilisation de lames jetables est recommandée.
- › Un soin doit être apporté afin de ne pas créer d'artéfacts dans les tissus au moment de la circulation, du sectionnement, de la coloration et du montage.
- › L'étiquette apposée sur les lames colorées devrait être de taille adéquate afin de ne pas couvrir les coupes de tissus. L'identification doit être lisible et idéalement contenir le nom du laboratoire. L'utilisation de codes à barres permet d'intégrer les données démographiques telles que le nom du patient, le nom du laboratoire, le numéro d'identification du laboratoire et la date.

Yaziji et al. ont publié en décembre 2008 un consensus d'experts pour la détermination du statut des récepteurs hormonaux par immunohistochimie dans le cancer du sein [16]. Neuf recommandations portent spécifiquement sur la phase pré-analytique de la technique histologique :

- › Les spécimens chirurgicaux doivent être sectionnés et placés dans le fixateur le plus rapidement possible et l'heure doit être enregistrée. Les sections de tissu doivent être immergées dans un volume adéquat de fixateur (ratio 1 : 20) dans un délai maximal d'une heure suivant la résection.
- › Les biopsies doivent être fixées et manipulées de la même façon que les spécimens chirurgicaux. Le temps minimal de fixation s'appliquant aux spécimens chirurgicaux doit également être respecté pour les biopsies.

- › Le formol tamponné 10 % à pH 7,0-7,4 devrait être le seul fixateur utilisé pour les spécimens mammaires.
- › La durée de fixation devrait être standardisée pour tous les spécimens mammaires. Des durées de fixation minimale de 8 heures et maximale de 72 heures doivent être respectées, la durée optimale de fixation se situant entre 24 et 48 heures. La durée totale de fixation inclut également le temps où le spécimen est immergé dans le formol tamponné 10 % dans le circulateur.
- › Les spécimens mammaires devraient être traités dans un circulateur conventionnel. L'utilisation de circulateurs rapides et alternatifs n'est pas recommandée pour les tissus soumis à l'analyse de bio-marqueurs.
- › Le premier contenant de formol tamponné dans le circulateur doit être renouvelé à chaque utilisation.
- › Il est fortement recommandé que la température de toutes les solutions du circulateur, excluant les paraffines, n'excède pas 37°C si les tissus mammaires sont destinés à des analyses de bio-marqueurs.
- › La température de la paraffine dans le circulateur ou l'appareil d'inclusion ne devrait pas excéder 60°C et le tissu ne devrait pas être conservé dans la paraffine pour une période prolongée.
- › Le délai entre l'excision du spécimen et son dépôt dans le fixateur et la durée de la fixation devraient être documentés et inclus dans le rapport d'anatomopathologie.

Hanna *et al.* ont publié en août 2007 la mise à jour des recommandations du consensus national canadien pour la détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein [15]. Quelques recommandations portent sur la phase pré-analytique de l'analyse. Le temps entre le prélèvement du spécimen et sa fixation doit être le plus court possible. Les spécimens devraient être coupés immédiatement en tranches de 5 à 10 mm d'épaisseur à la suite de l'inspection grossière et de la détermination des marges et placés dans un volume suffisant de formol tamponné 10 %. La durée de fixation optimale est de 24 à 48 heures, mais une période de fixation d'au moins 6 heures est suffisante pour les biopsies. Une durée de fixation supérieure à 48 heures pour les mastectomies n'est pas un critère d'exclusion pour les analyses HER-2, en autant que le spécimen ait été adéquatement sectionné pour permettre la fixation adéquate. La sous-fixation est plus dommageable que la sur-fixation, et un spécimen avec une période de fixation inférieure à 6 heures ne devrait pas être soumis aux analyses HER-2.

Oyama *et al.* ont publié en avril 2007 un article de revue sur l'effet des conditions de fixation et de traitement des tissus pour la détection de ER α par immunohistochimie [13]. Ils concluent que la sur-fixation ne constitue généralement pas un problème pour l'immunohistochimie de routine, à l'exception des blocs soumis à une période de fixation de plus de trois semaines, souvent obtenus de centres hospitaliers externes. De même, il n'est pas requis de considérer la courte durée de la fixation, dans la mesure où une fixation de routine (toute la nuit : 6 à 8 heures) est utilisée. Les conditions qui peuvent diminuer l'intensité de l'immunomarquage de ER α incluent l'immersion des sections dans l'eau distillée, l'utilisation de matériel séché à l'air pour une période de 18 à 24 heures précédemment à la fixation, ou l'utilisation de spécimens chirurgicaux de trop grande taille.

5. Discussion et recommandations

Le contrôle de la qualité peut se définir comme la mise en application de méthodes de vérification de la qualité d'un produit, pendant et après sa fabrication [4]. Dans le cas d'analyses en laboratoire, le produit recherché est le résultat d'une technique bien précise. L'évaluation de l'ensemble ou d'une partie des moyens mis en œuvre pour atteindre cet objectif permettra d'être en mesure d'obtenir des résultats de qualité.

Dans les laboratoires d'anatomopathologie, il est courant que plusieurs personnes interviennent dans le traitement d'un échantillon, depuis sa réception jusqu'à l'obtention du résultat final, processus en général relativement long. Il est alors plus difficile d'assurer la qualité d'un travail dans une telle situation en comparaison avec un travail effectué sur une période plus courte par une seule personne. Il devient donc primordial d'établir des règles claires et précises afin de minimiser les variations et les erreurs.

Le Plan global d'assurance qualité en anatomopathologie proposé par le Comité consultatif en anatomopathologie vise la mise sur pied de lignes directrices concernant les contrôles internes de qualité [2]. Ces contrôles de qualité devraient être effectués systématiquement dans tout laboratoire d'anatomopathologie relativement aux composantes pré-analytique et analytique de l'histologie, ce qui inclut le prélèvement et le transport des spécimens, leur fixation, la préparation des lames et, subséquentement à l'analyse, l'entreposage du matériel biologique (blocs de paraffine et lames) et des rapports d'anatomopathologie.

Les diverses recommandations que le Comité juge pertinentes à la suite de la revue de la littérature sont regroupées et énumérées ci-après.

5.1. Prélèvement et transport des tissus

5.1.1. Identification du (des) prélèvement(s)

Tout prélèvement et envoi en pathologie présuppose une identification adéquate du (des) spécimen(s) prélevé(s). En résumé, tel que recommandé par les diverses instances, l'identification du spécimen et de la requête doit contenir les éléments suivants : le nom et le prénom du patient, le sexe, la date de naissance, un deuxième identifiant unique du patient (numéro de dossier, identifiant RAMQ), l'adresse du patient ou le service hospitalier, le nom du médecin requérant, le site et la nature du prélèvement [1, 4, 7, 12].

La requête doit également contenir la date et l'heure du prélèvement, l'adresse du médecin prescripteur pour le retour des résultats, le nom des médecins requérant une copie du rapport final, les renseignements cliniques pertinents, et un diagnostic macroscopique *in vivo* ou postopératoire. Le caractère «urgent» de l'analyse, s'il y a lieu, doit être spécifié de façon évidente sur la requête d'analyse [4, 7].

Lors de prélèvements multiples, chaque spécimen doit être identifié tel que recommandé et accompagné d'une information clinique pertinente pour chacun des spécimens, sur une ou plusieurs requêtes. Tous les sites biopsiques doivent être identifiés de façon spécifique et soumis dans des contenants différents adéquatement identifiés [4].

Recommandations du Comité

1. L'identification du spécimen et de la requête doit contenir les éléments suivants :
 - a. nom et prénom du patient ;
 - b. date et heure du prélèvement ;
 - c. sexe (en absence du numéro de la RAMQ) ;
 - d. date de naissance ;
 - e. deuxième identifiant unique du patient (numéro de dossier, numéro RAMQ) ;
 - f. adresse du patient ou service hospitalier ;
 - g. nom du médecin prescripteur ;
 - h. site et nature du prélèvement ;
 - i. initiales de la personne ayant effectué le prélèvement.
2. La requête doit également contenir :
 - a. l'adresse du médecin prescripteur pour le retour des résultats ;
 - b. le nom des médecins requérant une copie du rapport final ;
 - c. les renseignements cliniques pertinents ;
 - d. un diagnostic macroscopique *in vivo* ou postopératoire.
3. Le caractère « **urgent** » de l'analyse doit être spécifié de façon évidente sur la requête d'analyse.
4. Lors de prélèvements multiples, une information clinique pertinente est requise pour chacun des spécimens, sur une ou plusieurs requêtes.
5. Tous les sites biopsiques doivent être identifiés de façon spécifique et être soumis dans des contenants différents adéquatement identifiés.

5.1.2. Transport des spécimens

Un spécimen nécessitant un envoi rapide/urgent peut être envoyé à l'état frais ou être déposé sur une gaze stérile humidifiée avec de la saline avec les informations pertinentes et une identification adéquate [4]. Toutefois, toute pièce à l'état frais doit être considérée comme potentiellement infectieuse, et des modalités prédéterminées doivent être consignées et être rapidement disponibles [7]. Les grosses pièces ou organes (poumon, foie, intestin, etc.) doivent être envoyés promptement au laboratoire pour préparation immédiate à la fixation [4]. Tout autre spécimen peut être envoyé dans un fixateur dont le type sera établi par le laboratoire [4, 7]. Une procédure spécifique pour les prélèvements nécessitant une congélation et une autre pour les cas en-dehors des heures normales d'ouverture avec ou sans congélation doivent être définies [7].

Pour les spécimens de mastectomie (partielle, totale ou radicale) et de biopsies mammaires, les divers organismes recommandent actuellement le formol tamponné 10 % de pH neutre (7,0-7,4), compte tenu que les valeurs pour les analyses des marqueurs de classe II (ER, PR, HER-2) sont actuellement normalisées pour ce fixateur. L'avenir déterminera s'il est le seul recommandé [5, 8, 10, 11, 13-15].

Des espaces réfrigérés doivent être disponibles pour les gros spécimens non fixés, à proximité du point de réception habituel des spécimens en pathologie ou au bloc opératoire, selon le cas [5]. Une procédure documentée pour les spécimens non conformes doit être mise en place pour les éventuels cas qui le nécessitent : spécimens non-identifiés ou mal identifiés, non-fixés ou non réfrigérés quand ceux-ci devraient l'être [5, 7]. L'annexe II propose des actions à poser en présence d'échantillons non-conformes [17]. Un registre répertoriant ce type de cas doit permettre une rétroaction sur les erreurs ayant mené à cette situation et une amélioration globale de l'identification des spécimens avec le temps.

Tous s'entendent pour un délai le plus court possible entre le moment du prélèvement et le début de la fixation (ischémie froide) [4, 7, 8, 10, 14-16]. Dans le cancer du sein, l'ASCO/CAP demande de colliger la durée d'ischémie froide, l'heure du début de la fixation et la durée totale de fixation pour chaque spécimen dans le cadre des analyses de classe II [10]. Dorénavant, en pathologie mammaire, l'heure de l'excision complète devra être inscrite sur la requête chirurgicale, alors que l'heure du début de la fixation et la durée totale de fixation devront être intégrés au rapport final d'anatomopathologie [14].

Recommandations du Comité

6. Le délai doit être le plus court possible entre le moment du prélèvement et le début de la fixation (ischémie froide ; une heure maximum).
7. Une procédure spécifique pour les prélèvements nécessitant une congélation doit être définie.
8. Une procédure spécifique pour les cas urgents en dehors des heures normales d'ouverture doit être définie (avec ou sans congélation).
9. Un spécimen nécessitant un envoi rapide/urgent doit être envoyé à l'état frais ou être déposé sur une gaze stérile humidifiée avec de la saline avec les informations pertinentes et une identification adéquate.
10. Tout spécimen soumis à l'état frais doit être considéré comme potentiellement infectieux et des modalités prédéterminées doivent être consignées et rapidement disponibles pour consultation au besoin.
11. Les gros spécimens ou organes (poumon, foie, intestin, etc.) doivent être envoyés promptement au laboratoire pour préparation immédiate à la fixation.
12. Tout autre spécimen doit être envoyé dans du formol tamponné 10 % à moins d'indications contraires où un autre fixateur, pré-établi et validé par le laboratoire, a été identifié. Le répertoire du laboratoire doit être consulté au moment du prélèvement pour valider le fixateur requis en fonction du type d'échantillon.
13. Pour les spécimens de mastectomie (partielle, totale ou radicale) et de biopsie mammaire, la fixation dans du formol tamponné (10 %, pH neutre 7,0-7,4) est obligatoire.
14. En pathologie mammaire, l'heure de l'excision complète doit être documentée sur la requête chirurgicale; la durée d'ischémie froide (ou le délai de fixation) et la durée totale de fixation doivent être inscrites sur le rapport final d'anatomopathologie.
15. Des espaces réfrigérés doivent être disponibles pour les gros spécimens non fixés, à proximité du point de réception habituel des spécimens en pathologie et au bloc opératoire, selon le cas.
16. Une procédure documentée pour les spécimens non conformes doit être mise en place pour les éventuels cas qui le nécessitent : spécimen non-identifié ou mal-identifié, non-fixé ou non-réfrigéré s'il devait l'être.

5.1.3. Réception des spécimens

Sur réception d'un spécimen, sous la responsabilité d'une personne qualifiée, le membre du personnel suit les procédures opératoires normalisées (PON) et vérifie les points suivants : la requête d'analyse est dûment complétée, la conformité de l'échantillon, le respect des conditions de conservation et de transport et la concordance des informations entre la requête et le contenant du spécimen. Il enregistre le(s) spécimen(s) pour l'obtention d'un numéro de laboratoire, qui est le même pour chaque spécimen associé au spécimen principal ; il évite d'inscrire l'un après l'autre des noms identiques et/ou des spécimens semblables. Les données qui doivent être consignées sont la date de prélèvement, la date et l'heure de l'inscription, le numéro de laboratoire s'il n'est pas donné automatiquement, les nom et prénom du patient, le nom du médecin requérant, et le type d'échantillon [4, 7].

Le personnel qualifié suit les PON pour les actions à accomplir en fonction des spécimens. Une procédure précise les règles de numérotation applicables à l'examen et aux prélèvements. Un protocole définissant

l'étendue des activités autorisés aux différents membres du personnel doit être documenté [4]. De plus, le type de supervision effectuée par les pathologistes/résidents doit pouvoir être colligé pour chacun des spécimens où leur expertise est requise [5]. Une procédure écrite doit être disponible pour chaque type de spécimen en regard de la dissection, de la description et de l'échantillonnage [5]. En plus du nombre de blocs et de lames disponibles pour chaque spécimen, le nombre de spécimens par cassette permettant un enrobage optimal devrait également être colligé. Une procédure écrite décrivant les actions à prendre lors de la réception de spécimens non conformes doit être disponible [4, 5, 7, 12]. Des mesures à prendre en fonction de la nature de la non-conformité sont proposées à l'annexe II [17].

Recommandations du Comité

17. Sur réception d'un spécimen, les points suivants doivent être vérifiés sous la responsabilité d'une personne qualifiée :
 - a) requête d'analyse dûment complétée ;
 - b) conformité de l'échantillon ;
 - c) respect des conditions de conservation et de transport ;
 - d) concordance des informations entre la requête et le contenant du spécimen.
18. Il faut éviter d'inscrire l'un après l'autre des noms identiques et/ou des spécimens semblables.
19. Les données qui doivent être consignées sur la requête sont :
 - a) la date de prélèvement ;
 - b) la date et l'heure de l'inscription au laboratoire ;
 - c) le numéro de laboratoire s'il n'est pas donné automatiquement ;
 - d) les nom et prénom du patient ;
 - e) le nom du médecin requérant ;
 - f) le type d'échantillon.
20. Une procédure doit préciser les règles de numérotation applicables à l'examen et aux prélèvements.
21. En plus du nombre de blocs et de lames disponibles pour chaque spécimen, le nombre de spécimens par cassette permettant un enrobage optimal doit également être colligé.
22. Le personnel qualifié doit suivre les procédures opératoires normalisées (PON) pour les actions à accomplir en fonction des spécimens.
23. L'étendue des activités que les différents technologues médicaux sont autorisés à effectuer doit être définie dans un protocole.
24. Le type de supervision effectuée par les pathologistes/résidents doit être consigné pour chacun des spécimens où leur expertise est requise.
25. Une procédure opératoire normalisée écrite doit être disponible pour chaque type de spécimen en regard de la dissection, de la description et de l'échantillonnage.

5.2. Fixation

La fixation représente la seule étape définitive et irréversible. Les facteurs suivants, déterminés selon Fortier et Hould, peuvent influencer la qualité de la fixation [4] :

- › Vitesse de pénétration : il y a une concordance entre la vitesse de pénétration, le temps de fixation et la dimension de la pièce.
- › Vitesse de réaction de la fixation : réaction chimique qui est plus difficile à déterminer.

- › Volume du fixateur : idéalement 15 à 20 fois le volume de la pièce à fixer.
- › Épaisseur de la pièce à fixer : 3-5 mm.
- › Consistance de la pièce à fixer : plus un tissu est dense, plus il sera difficile à pénétrer et plus il sera susceptible de durcir lors d'une fixation prolongée. Un tissu dense, adipeux ou nécrotique demande une fixation plus longue.
- › Durée de la fixation : étape capitale qui dépend du fixateur utilisé, du volume, de la concentration, du pH, de l'épaisseur de la pièce et de sa consistance.
- › Concentration du fixateur utilisé (voir la fiche technique présente sur le contenant).
- › Température ambiante : une température modérée améliore la fixation (température ambiante d'environ 20°C, idéalement entre 20 et 24 °C). Une température froide ralentit le processus de fixation.
- › pH : on favorise un fixateur dont le pH se situe entre 6 et 8 (idéalement entre 6,8 et 7,2).

Dans le cas de la fixation de spécimens de grande taille, des coupes macroscopiques de 5 à 10 mm doivent être faites pour optimiser la fixation.

Toute constatation d'autolyse doit être notée, car elle affectera tout le processus menant au diagnostic, incluant les analyses complémentaires, d'où la possibilité d'un faux diagnostic. Dans la majorité des cas, un diagnostic est impossible [4]. Un marqueur d'autolyse important à prendre en considération est le temps d'ischémie froide.

La fixation doit être adéquate et homogène et sa durée, conforme aux recommandations préconisées par le laboratoire. Le volume de fixateur doit être adapté au volume de l'échantillon [7].

Recommandations du Comité

26. Le volume de fixateur utilisé doit être minimalement de 5 à 10 fois, et idéalement de 15 à 20 fois, le volume de la pièce à fixer.
27. La durée de la fixation, étape capitale, est dépendante du fixateur (volume utilisé, concentration et pH) et de la nature de la pièce (épaisseur et consistance). Un minimum de 24 à 48 heures de fixation doit être effectué pour les spécimens chirurgicaux. Dans le cas de biopsies, le temps de fixation minimum doit être de 6 à 8 heures (idéalement de 12 à 24 heures). Une fixation adéquate est complète et homogène.
28. L'épaisseur de la pièce à fixer doit être entre 3 et 5 mm lorsque mise en cassette.
29. Toute constatation d'autolyse doit être notée.

5.2.1. Protocole de fixation pour les tumeurs du sein

Les informations précédentes servent à déterminer les protocoles de fixation applicables à chaque laboratoire de pathologie. Dans le contexte de la pathologie mammaire, les protocoles sont un peu plus précis, surtout pour permettre une analyse des marqueurs de classe II. Les éléments suivants doivent être consignés dans le rapport d'anatomopathologie afin de se conformer aux normes (CAP, ASCO, ACP) : durée de l'ischémie froide (temps entre l'excision du spécimen et le début de la fixation), heure du début de la fixation, durée totale de fixation, type de fixateur [5, 12, 15]. Actuellement, le formol 10 % tamponné à pH neutre est le seul recommandé pour les marqueurs de classe II [10]. Le délai maximum

recommandé avant le début de la fixation est d'une heure, le volume du fixateur dépendant du type de spécimen. Pour les biopsies, un volume de plus de 4-6 : 1 serait acceptable selon plusieurs auteurs, mais pour les spécimens de mastectomie, un volume de 20 : 1 est habituellement recommandé [5, 12, 15]. La durée de fixation minimale est de 6 heures pour les biopsies, alors que pour les spécimens plus volumineux, une durée de 24 à 48 heures est recommandée. Plusieurs des sources répertoriées jugent une durée de fixation de 72 heures acceptable et la plupart d'entre elles mentionnent qu'une fixation insuffisante est plus délétère qu'une sur-fixation (plus de 72 heures) [10, 13, 15, 16]. L'ASCO et le CAP recommandent cependant une fixation maximale de 48 heures, particulièrement lorsque des analyses de détermination du statut HER-2 sont prévues. Pour optimiser la fixation, on recommande de couper les spécimens de grande taille en tranches de 5 à 10 mm.

N.B. : Bien que ces normes soient définies pour les tumeurs du sein, l'utilisation de plus en plus fréquente de marqueurs de classe II dans des spécimens autres que mammaires autorise le sous-comité à recommander la même approche pour les autres organes ou spécimens biopsiques, ce qui créerait des automatismes pour tous les spécimens prélevés au bloc opératoire ou en clinique. En effet, le caractère définitif et irréversible de la fixation en fait une étape cruciale dans le processus de préparation histologique de telle sorte qu'une approche prudente à l'aube d'une explosion de demandes de toutes sortes en pathologie pourrait justifier une telle approche.

Recommandations du Comité

30. Le formol 10 % tamponné à pH neutre (7,0-7,4) est le seul fixateur recommandé pour les marqueurs de classe II, à moins de validation interne préalable. Le délai maximum avant le début de la fixation est d'une heure, et le volume de fixateur dépend du type de spécimen.
31. Pour les biopsies, un volume de fixateur de plus de 4-6 : 1 devrait être utilisé, mais pour les spécimens de mastectomie, un volume de 20 : 1 est toujours recommandé.
32. La durée de fixation minimale pour les biopsies est de 6 heures, alors que pour les spécimens plus volumineux, la durée recommandée est de 24 à 48 heures (CAP, ASCO).
33. Pour optimiser la fixation des spécimens de grande taille, des coupes macroscopiques de 5 à 10 mm doivent être faites.
34. L'utilisation de plus en plus fréquente de marqueurs de classe II pour des spécimens autres que mammaires (p.ex. : côlon, estomac, poumon) nous autorise à recommander la même approche pour ces spécimens.

5.3. Circulation

La circulation est une étape très importante, car elle a pour but de permettre l'inclusion du tissu dans la paraffine sans pour autant nuire à l'intégrité du tissu. Le circulateur devrait être programmé en fonction du type de tissu circulé et de la grosseur des pièces [4]. Le temps de contact avec chaque solution doit permettre un échange optimal sans causer une exposition trop prolongée, car les solutions déshydratantes et éclaircissantes sont des solutions intolérantes qui durcissent le tissu. Certaines attentions relatives à la qualité des bains doivent être prises en considération :

- › Au moins un bain doit contenir du formol tamponné pour éviter l'altération du tissu avant le début de la circulation proprement dite [16].
- › Lors de la déshydratation, le premier bain doit contenir une solution d'alcool à 70 % [4].
- › Les derniers bains d'alcool doivent contenir une solution pure (100 %) pour éviter que de l'eau ne soit encore présente dans le tissu à la fin de la déshydratation [4].

- › Les bains de solution éclaircissante (toluène ou xylène) doivent être purs [4].
- › Au moins 2 bains de paraffine doivent contenir une paraffine pure, exempte de toluène, pour permettre une bonne imprégnation du tissu [4].
- › La température de la paraffine ne doit pas excéder 60 °C [16].
- › Les bains de paraffine devraient toujours être remplis avec de la paraffine fondue pour éviter les blocages.

Certains détails doivent être pris en considération au cours de la manipulation des tissus de manière à préserver leur intégrité. Ainsi, les tissus ne devraient jamais être laissés dans une cuve vide ni être conservés dans la paraffine pour une période prolongée [16]. De plus, l'épaisseur des tissus doit permettre une circulation adéquate [14, 16]. Les protocoles de circulation rapide basés sur l'utilisation de micro-ondes ne sont pas recommandés pour les analyses de bio-marqueurs [14].

Le circulateur doit faire l'objet d'un entretien régulier [4]. La tenue d'un registre quotidien répertoriant certaines informations comme le nombre de pièces circulées favorisera la prévention de bris d'équipement. Certains points requièrent une vérification quotidienne. Ainsi, les solutions doivent être changées ou décalées régulièrement selon un programme établi tenant compte du nombre de pièces circulées [5, 12]. Il est important de vérifier chaque jour le niveau des solutions et de les ajuster au besoin, et de vérifier et noter la température de la paraffine [4, 5, 12]. Finalement, il faut nettoyer régulièrement le filtre de la cuve.

Recommandations du Comité

35. Le circulateur doit être programmé en fonction du type de tissu circulé et de la grosseur des pièces.
36. La qualité des bains doit être assurée en portant attention aux détails suivants :
 - a) Au moins un bain doit contenir du formol tamponné.
 - b) Lors de la déshydratation, le premier bain doit contenir une solution d'alcool à 70 %.
 - c) Les derniers bains d'alcool doivent contenir une solution pure (100 %).
 - d) Les bains de solution éclaircissante (toluène ou xylène) doivent être purs.
 - e) Au moins deux bains de paraffine doivent contenir une paraffine pure, exempte de toluène ou xylène.
 - f) La température de la paraffine ne doit pas excéder 60 °C.
37. Les tissus ne doivent jamais être laissés dans une cuve vide.
38. Les protocoles de circulation rapide basés sur l'utilisation de micro-ondes ne doivent pas être utilisés pour les analyses de bio-marqueurs à moins de validation interne préalable.
39. Le circulateur doit faire l'objet d'un entretien régulier.
40. Les solutions doivent être changées ou décalées selon un programme établi de façon régulière et statuaire.
41. La température de la paraffine doit être vérifiée.
42. Un registre d'entretien doit être établi. On doit y retrouver pour chaque jour :
 - a) les changements ou décalages des solutions ;
 - b) la température des bains de paraffine ;
 - c) les autres entretiens ou nettoyages ;
 - d) les initiales de la personne qui effectue ces opérations ;
 - e) le nombre de pièces circulées.

5.4. Inclusion/enrobage

L'inclusion permet de fournir un support externe pendant et après la coupe au microtome. Pour obtenir une coupe de qualité, certains éléments doivent être pris en compte :

- › Orienter correctement en fonction du type d'échantillon. Si nécessaire, faire fondre la paraffine et réorienter.[4].
- › Centrer idéalement le tissu [4].
- › Dans le cas où il y a plusieurs pièces de tissu, les placer dans le même sens [4].
- › Éviter les artéfacts de couche.
- › Vérifier et noter quotidiennement la température du réservoir de paraffine [4].
- › Porter attention à l'identification des blocs [5].
- › Vérifier la corrélation entre le nombre de fragments de départ et le nombre de fragments dans la cassette.
- › En présence d'échantillons de peau, les positionner de manière perpendiculaire à la lame.

Un nettoyage doit être effectué au niveau de l'appareil d'inclusion [4, 5]. Il est essentiel de nettoyer régulièrement toutes les surfaces de l'appareil d'inclusion pour éviter la contamination par des résidus tissulaires. Il est aussi important de nettoyer régulièrement les outils utilisés (pinces, bistouri, etc.) et les orifices chauffants pour les pinces. Finalement, le réservoir de paraffine doit être vidangé et nettoyé périodiquement pour éviter l'accumulation de saletés et d'artéfacts. La tenue d'un registre d'entretien permettra l'inclusion optimale des pièces.

Recommandations du Comité

43. Une attention particulière doit être portée à l'orientation de la pièce.
44. La température du réservoir de paraffine doit être vérifiée et notée quotidiennement.
45. Une attention particulière doit être portée à l'identification des blocs.
46. Le nombre de fragments au départ et le nombre de fragments inclus doit être vérifié et la discordance notée, s'il y a lieu.
47. Il est essentiel de nettoyer régulièrement :
 - a) toutes les surfaces de l'appareil d'inclusion ;
 - b) les outils utilisés (pinces, bistouri, etc.) ;
 - c) les orifices chauffants pour les pinces ;
 - d) le réservoir de distribution de la paraffine ;
 - e) la cuve d'attente des cassettes à être enrobées.
48. Un registre d'entretien doit être établi. On doit y inscrire pour chaque jour :
 - a) la température du réservoir de distribution de la paraffine, de la plaque chauffante, des puits de chauffage des pinces, de la chambre thermostatique et idéalement celle de la plaque réfrigérante ;
 - b) les entretiens et nettoyages effectués ;
 - c) les initiales de la personne ayant effectué ces opérations.

5.5. Microtomie

Au moment de la coupe, il faut s'assurer de l'orientation rigoureuse du rasoir et des blocs [4]. Ainsi, la surface du bloc doit être parallèle à celle de la lame. Cette précaution devrait éviter un rabotage trop prononcé d'une portion de la pièce de tissu. La présence sur le marché de rasoirs dédiés à divers types de coupe (la coupe de tissus mous, denses, avec micro-calcifications, etc.) peut aider à maintenir la qualité du biseau de la lame durant la coupe. L'épaisseur des coupes devrait être choisie en fonction des tissus et des colorations requises (en règle générale, de 3 à 4 µm) [7, 14]. Certaines techniques recommandent l'utilisation de coupes d'une épaisseur précise. Il est donc important de vérifier cette donnée afin de choisir l'épaisseur de coupe la plus appropriée.

Le microtome doit être nettoyé tous les jours des débris de paraffine qui s'y accumulent [4, 5, 12]. L'utilisation d'un aspirateur pour la collecte des débris peut être un moyen préalable à l'utilisation d'un émoullient afin d'éviter la formation de dépôts de paraffine. En effet, l'utilisation d'émoullient en présence de paraffine crée un mélange qui s'infiltré dans les composantes du microtome et se solidifie à l'intérieur à la suite de l'évaporation du solvant. Ce dernier doit donc être utilisé en petite quantité. Mensuellement, les composantes du microtome qui le nécessitent doivent être lubrifiées [5]. En ce sens, il est possible de se référer au manuel de l'utilisateur de l'appareil utilisé pour connaître l'entretien recommandé. Annuellement, un entretien préventif du microtome peut être fait. Cet entretien devrait être effectué par un membre du personnel qualifié à cet effet. Toutes les activités d'entretien doivent être consignées dans un registre.

Recommandations du Comité

49. L'orientation du rasoir avec la surface du bloc doit être parallèle.
50. Les pièces doivent être coupées selon une épaisseur de 3 à 4 µm pour les colorations de routine.
51. L'épaisseur de la coupe doit être ajustée pour certaines colorations particulières.
52. Le microtome doit être nettoyé quotidiennement.
53. Un programme d'entretien mensuel et d'entretien préventif annuel du microtome doit être établi.
54. Les entretiens faits doivent être consignés dans un registre.

5.6. Étalement

La température du bain d'étalement doit être vérifiée fréquemment au cours de son utilisation afin de maintenir une température optimale [4]. Cette température se situe généralement de 5 à 10 °C sous le point de fusion du médium d'imprégnation utilisé. L'étalement dans un bain dont la température est au-delà de 60 °C altère certaines composantes du tissu et pourrait fausser les analyses subséquentes. Le bain d'étalement doit être gardé exempt de débris tissulaires. La température doit être consignée quotidiennement dans un registre [4].

L'eau du bain d'étalement devrait être changée quotidiennement afin d'éviter l'apparition de contaminants. Lors de l'utilisation d'un adhésif, la quantité recommandée devrait être respectée [4]. L'utilisation d'adhésif ne devrait pas être associée à l'utilisation de lames chargées. De plus, pour certaines techniques, il est contre-indiqué d'utiliser de l'adhésif. Les fiches techniques des réactifs et les protocoles doivent donc être consultés afin de choisir le mode d'étalement le plus approprié.

Il est important d'identifier clairement la lame correspondant au bloc coupé immédiatement avant l'étalement [12]. Les paraphes du technologiste médical ayant fait la coupe, par exemple, peuvent être

inscrits sur la lame avant que l'étiquette n'y soit apposée. L'utilisation d'un code de couleur peut également permettre d'identifier le technologiste médical et le microtome ayant effectué la coupe, ce qui permettra la traçabilité des résultats si nécessaire.

La coupe choisie devrait être exempte de plis, de stries et de bulles [4]. La coupe doit être positionnée perpendiculairement ou parallèlement à la lame, c'est-à-dire en évitant la disposition en biais. Selon les analyses subséquentes demandées, le laboratoire pourrait établir une conduite à suivre concernant la hauteur de la coupe sur la lame. En effet, la disposition des coupes au bas de la lame peut permettre d'économiser sur le volume de réactif utilisé avec certains automates.

Le séchage des lames se fait dans un four ou une étuve dont la température doit être consignée quotidiennement dans un registre [4]. La durée et la température de séchage doivent être choisis en considérant les recommandations des analyses subséquentes [14]. Les fiches techniques des réactifs et les protocoles doivent être consultés afin de choisir le mode de séchage le plus approprié.

Recommandations du Comité

55. La température du bain d'étalement doit être maintenue entre 5 et 10 °C sous le point de fusion du médium d'imprégnation utilisé.
56. Un adhésif doit être ajouté au bain d'étalement si nécessaire, selon le type de lames employées.
57. Le bain d'étalement doit être maintenu exempt de coupes ou de débris résiduels.
58. Le contenu du bain d'étalement doit être changé quotidiennement.
59. Un système permettant de retracer l'équipement et le membre du personnel ayant effectué une coupe doit être mis en place.
60. La coupe choisie doit être d'épaisseur uniforme et exempte de stries, de plis ou de bulles.
61. Les lames doivent être séchées adéquatement avant la coloration (p. ex. : 30 minutes à 50 °C ; à déterminer pour chaque laboratoire).
62. Les températures des bains-marie, des étuves et des fours utilisés doivent être consignées adéquatement.

5.7. Coloration et préparation des lames

L'histotechnologie cherche à mettre en évidence les constituants cellulaires ou tissulaires par la captation des colorants de façon sélective. Pour obtenir une coloration de qualité, il est important de respecter certains critères.

Un contrôle de la qualité des solutions utilisées dans le laboratoire permet d'obtenir des résultats optimaux à tout moment. Une attention particulière doit être apportée à la vérification et à l'entretien des bains utilisés lors de la coloration, de manière à améliorer la qualité des lames obtenues [4]. Une vérification quotidienne des bains (température, niveau de liquide, décalage des bains, remplacement des solutions, pH de l'eau) doit être faite et compilée de manière adéquate [4, 12]. De plus, la préparation des solutions utilisées pour la coloration proprement dite devrait être effectuée selon le protocole en vigueur dans le laboratoire (identification, renouvellement, filtration, rangement) [4].

La présence d'un contrôle interne lors de la coloration de routine permet de vérifier la qualité de l'exécution de la technique à différentes étapes du processus et d'apporter les correctifs nécessaires. De façon optimale, la présence d'une lame témoin dans chaque série de lames à colorer remplit ce rôle mais minimalement, une lame témoin doit être incorporée à la dernière série de coloration de la journée et à la première série de coloration du lendemain afin de s'assurer que les corrections effectuées sont

adéquates. Une lame témoin doit aussi être incorporée lors d'un changement de solution ou de tout autre paramètre de coloration. La nature du tissu utilisé comme contrôle doit être choisie en fonction de la coloration effectuée [4, 12]. L'observation des lames au microscope à différentes étapes du processus permet de valider les solutions utilisées et les manipulations effectuées. La comparaison de la coloration obtenue entre une lame test et une lame contrôle assure la constance des résultats [12]. La présence d'un registre détaillant l'utilisation et l'entretien du matériel et des solutions sera discutée à la section 5.9.

Il n'existe pas de méthode unique de montage des préparations histologiques. Chaque laboratoire, voire chaque personne, possède sa propre méthode. Par contre, des renseignements généraux permettront d'obtenir des résultats de qualité. Une lame de qualité dépend du matériel utilisé (lame et lamelle adéquates et propres) et d'une bonne rigueur de travail (éviter de laisser sécher la coupe entre la fin de la coloration et le début du montage, éviter les bulles d'air, sécher adéquatement les lames) [4, 14]. Finalement, l'identification permanente de la lame assure que les lames et les blocs sont associés aux bonnes requêtes.

Recommandations du Comité

63. Le contrôle de la qualité des solutions utilisées inclut les étapes suivantes :

- a) l'identification adéquate des solutions ;
- b) la préparation des solutions conformément à leur protocole de préparation (p. ex. : pH, filtration) ;
- c) le renouvellement des solutions selon le volume de lames colorées ;
- d) la conservation de chaque solution dans des conditions appropriées.

64. La vérification et l'entretien des bains utilisés lors de la coloration doivent être effectués par :

- a) une vérification quotidienne des bains (température, niveau de liquide, décalage des bains, remplacement des solutions en fonction de la charge de travail, pH de l'eau) ;
- b) la tenue d'un registre d'utilisation dans lequel sont consignés les éléments suivants : numéros de lot des colorants, température, décalage et remplacement des bains, date et initiales de la personne responsable.

65. À défaut d'une lame témoin pour chaque série de coloration, une lame témoin doit minimalement être incorporée à la dernière série de coloration de la journée et à la première série de coloration du lendemain afin de s'assurer que les corrections effectuées sont adéquates. De plus, une lame témoin doit être incorporée lors d'un changement de solution ou de tout autre paramètre de coloration.

66. Le matériel utilisé doit obligatoirement être de qualité, incluant des lames et lamelles adéquates et propres.

67. Une technique de montage adéquate implique :

- a) d'éviter de laisser sécher la coupe entre la fin de la coloration et le début du montage ;
- b) d'éviter la présence de bulles d'air ;
- c) d'effectuer le séchage adéquat des lames.

68. L'identification des lames colorées doit être permanente.

5.8. Conservation des blocs, des lames et des rapports d'anatomopathologie

L'objectif poursuivi par le laboratoire de pathologie est d'obtenir un diagnostic pour la (les) lésion (s) soumise (s). Les résultats doivent être conservés dans le dossier du patient. De plus, la conservation de l'information ayant permis l'obtention de ces résultats est nécessaire pour valider l'expérimentation effectuée sur le spécimen.

Les laboratoires de pathologie doivent conserver adéquatement les rapports d'anatomopathologie et les échantillons pour une période de temps nécessaire à l'éducation, au besoin des patients, à l'évaluation de la qualité ou à tout autre besoin comme la possibilité d'effectuer des examens supplémentaires [6, 9, 18]. Dans ce but, chaque laboratoire devrait se référer à un calendrier de conservation du matériel histopathologique (échantillons biologiques et rapports), proposé à l'annexe I [4].

Recommandations du Comité

69. Le Comité consultatif en anatomopathologie recommande le calendrier de conservation suivant :

Matériel	Période de conservation
Laboratoire en général	
Entretien de l'équipement :	2 ans
Résultats contrôle de qualité :	2 ans
Pathologie chirurgicale	
Tissus en réserve :	4 semaines après l'émission du rapport final
Blocs, lames et rapport	
Adultes :	20 ans ¹
Enfants :	50 ans ¹
Autopsie	
Tissus en réserve :	3 mois après l'émission du rapport final
Blocs, lames et rapports	
Adultes :	10 ans ¹
Enfants :	10 ans ¹

¹ Les rapports sont conservés indéfiniment.

5.9. Entretien de l'équipement

Une technique de qualité implique l'entretien de l'équipement et des ressources utilisés. Fortier et Hould, le CAP et Iyengar accordent une attention particulière à l'entretien journalier et préventif du matériel utilisé [4, 5, 12]. Les appareils pour la circulation, l'inclusion et l'enrobage des échantillons, ainsi que le microtome, requièrent un entretien dans le but d'éviter les bris et d'obtenir un fonctionnement optimal [4, 12]. De plus, la tenue d'un manuel d'utilisation dans lequel est consigné un relevé de la température et de toutes modifications effectuées au niveau d'un appareil, de même que la date et les initiales de la personne ayant effectué la mesure, la modification ou l'entretien, facilite la traçabilité des manipulations [4]. Le renouvellement des solutions des différents bains devrait aussi être consigné dans un registre daté et initialisé.

Recommandations du Comité

70. Tout équipement doit être entretenu selon un programme d'entretien préétabli dans le laboratoire en fonction de l'utilisation de l'appareil et du programme d'entretien préventif recommandé par le fabricant, spécifique à chaque appareil.
71. Un registre d'entretien de l'équipement pour chaque appareil utilisé doit être tenu. Celui-ci doit consigner :
- a) tout entretien effectué sur l'appareil ;
 - b) la date et les initiales de la personne ayant effectuée l'entretien.
72. Un registre quotidien d'utilisation pour chaque appareil doit être tenu. Celui-ci doit consigner :
- a) les conditions d'utilisation spécifiques à chaque appareil (p. ex. : température, pH) ;
 - b) la modification des conditions d'utilisation de l'appareil ;
 - c) la date et les initiales de la personne ayant effectué la mesure et/ou la modification.

6. Conclusion

Le Plan global d'assurance qualité en anatomopathologie, proposé par le Comité consultatif en anatomopathologie, vise entre autres l'élaboration de lignes directrices concernant les contrôles internes de qualité des techniques histologiques de base. Ces contrôles de qualité devraient être appliqués systématiquement dans tout laboratoire d'anatomopathologie et ciblent les composantes pré-analytiques (prélèvement et transport des tissus, leur fixation et préparation des lames) et, subséquemment à l'analyse, les composantes post-analytiques en histologie (entreposage du matériel biologique [blocs de paraffine et lames] et des rapports d'anatomopathologie).

Le livre de Jacques C. Fortier et de René Hould, intitulé « Histotechnologie : théorie et procédés », constitue un ouvrage de référence pour tout laboratoire d'histopathologie. Ce livre décrit l'ensemble des procédés de routine ou spécialisés utilisés dans les laboratoires d'histopathologie, de cytologie et de cytogénétique. De plus, la revue de la littérature disponible a permis de mettre en relief certains points qui permettront de valider la qualité des manipulations effectuées.

Enfin, la mise sur pied d'outils de référence, tels des protocoles de manipulations et d'interventions, et de registres d'utilisation, d'entretien et de conservation permettront la traçabilité des manipulations et assureront l'obtention de résultats de qualité.

7. Références

1. Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS). Performance diagnostique des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein. ETMIS 2008;4(3):1-110.
2. Direction de la lutte contre le cancer. Comité consultatif en anatomopathologie. Plan global d'assurance qualité en anatomopathologie. Gouvernement du Québec. Mars 2010, 50 p.
3. Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec. Plan d'action ministériel - Programme québécois d'assurance qualité en anatomopathologie. Gouvernement du Québec. Mars 2010, 6 p.
4. Fortier, J.C. et Hould, R. Histotechnologie : théorie et procédés. Centre collégial de développement de matériel didactique. 2003, 717 p.
5. College of American Pathologists. Anatomic Pathology Checklist. Commission on laboratory accreditation, Laboratory accreditation program. 2009, 79 p.
6. College of American Pathologists. Retention of laboratory records and materials. 2010. <http://www.cap.org>, consulté en ligne le 1^{er} décembre 2010.
7. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques. L'archivage en anatomie et cytologie pathologiques. Recommendations for good practices in anatomic and cytologic pathology v2. Ann Pathol, 2010. 30(1):58-67.
8. Canadian association of Pathologists *et al.* Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. Canadian Journal of Pathology, 2009. July:14-25.
9. Canadian association of Pathologists. The Retention and Use of Human Biologic Material. 2005. http://cap-acp.org/guide_retention-human-biologic-material.cfm, consulté en ligne le 1^{er} décembre 2010.
10. Hammond, M.E., *et al.*, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). Arch Pathol Lab Med, 2010. 134(7):e48-72.
11. Wolff, A.C., *et al.*, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol, 2007. 25(1):118-45.
12. Iyengar, J.N., Quality control in the histopathology laboratory: an overview with stress on the need for a structured national external quality assessment scheme. Indian J Pathol Microbiol, 2009. 52(1):1-5.
13. Oyama, T., *et al.*, The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. Breast Cancer, 2007. 14(2):182-8.
14. Albanell, J., *et al.*, Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). Clin Transl Oncol, 2009. 11(6):363-75.
15. Hanna, W., *et al.*, Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. Curr Oncol, 2007. 14(4):149-53.
16. Yaziji, H., *et al.*, Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008. 16(6):513-20.
17. Laboratoire d'anatomie pathologique, Hôpital Érasme. Nature et traitement des prélèvements non-conformes. 2010, 5 p. http://www.erasme.ulb.ac.be/.../AN_QUAL_19_Nature_et_traitement_des_prelevements_non_conformes.doc, consulté en ligne le 20 janvier 2011.
18. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques. L'archivage en anatomie et cytologie pathologiques. 2007, 85 p. http://www.afaqap.org/page.php3?id_rubrique=140&lang=fr, consulté en ligne le 1 décembre 2010.
19. National pathology accreditation advisory council. Requirement for the retention of laboratory records and diagnostic material (fifth edition). 2009, 20 p. <http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-npaac-docs-RetLabRecDI.htm>, consulté en ligne le 1 décembre 2009.

8. Annexe I.

Tableau 1. Calendrier de délais minimaux de conservation des rapports d'anatomopathologie et des échantillons selon les recommandations de différentes associations

Organismes	Association canadienne des pathologistes [9]	College of american pathologists [6]	National pathology accreditation advisory council [19]
Matériel	Période de conservation		
Laboratoire en général			
Entretien de l'équipement	n.d.	2 ans	Durée de vie de l'équipement + 3 ans
Résultats contrôle de qualité	n.d.	2 ans	3 ans
Pathologie chirurgicale			
Tissus en réserve :	4 semaines après l'émission du rapport final	2 semaines après l'émission du rapport final	3 mois après l'émission du rapport final
Blocs, lames et rapport			
Adultes :	20 ans ¹	10 ans*	10 ans*
Enfants :	50 ans ¹		
Autopsie			
Tissus en réserve :	3 mois après l'émission du rapport final	3 mois après l'émission du rapport final	1 mois après l'émission du rapport final
Blocs, lames et rapports			
Adultes :	10 ans ¹	10 ans*	10 ans*
Enfants :	10 ans ¹		

n.d. : non disponible.

*Aucune distinction n'est faite entre un enfant et un adulte.

¹Les rapports sont conservés indéfiniment.

9. Annexe II

Tableau 2. Nature et traitement des prélèvements non-conformes [17].

Nature de la non-conformité	Conséquence	Traitement
1. Prélèvement(s) sans demande d'analyse ou demande d'analyse inadéquate.	Poursuite du traitement	Rechercher l'origine du prélèvement (consultation, hospitalisation). Envoi de la requête au chef de service.
2. Demande d'analyse sans prélèvement(s).	Arrêt de traitement	Retour au médecin prescripteur.
3. Identification du patient différente entre la demande d'analyse et le(s) prélèvement(s).	Arrêt de traitement	Retour au médecin prescripteur.
4. Absence ou différence de numérotation des prélèvements par rapport à la demande.	Poursuite du traitement	Information transmise au médecin prescripteur via le protocole.
5. Nombre de prélèvements supérieurs à ceux indiqués sur la demande.	Poursuite du traitement	Information transmise au médecin prescripteur via le protocole.
6. Nombre de prélèvements inférieurs à ceux indiqués sur la demande.	Poursuite du traitement	Information transmise au médecin prescripteur via le protocole. Vérification auprès du service prescripteur par téléphone. Si prélèvements endoscopiques ou du quartier opératoire, vérification par l'encodeur dans ses cahiers du nombre de prélèvements effectués.
7. Absence de la date de prélèvement sur la demande d'analyse.	Poursuite du traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole. Contact téléphonique entre le médecin prescripteur et le médecin responsable du secteur.
8. Absence de l'heure de prélèvement sur la demande d'analyse.	Poursuite du traitement	Pour les consultations, encoder l'heure du rendez-vous indiquée sur l'étiquette. Information au médecin prescripteur intégrée au protocole.
9. Absence d'identification du patient (nom et prénom) sur la demande analyse et/ou sur le(s) prélèvement(s).	Arrêt de traitement	Contact téléphonique entre le médecin prescripteur et le médecin responsable du secteur. Retour au médecin prescripteur.
10. Renseignements administratifs (adresse, mutuelle, etc.) incomplets ou absents.	Poursuite du traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole.
11. Absence de la nature des prélèvements.	Poursuite du traitement	Contact téléphonique entre le médecin prescripteur et le médecin responsable du secteur.
12. Absence d'identification du médecin prescripteur (cachet et/ou signature).	Poursuite du traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole. Si aucune identification, médecin prescripteur = chef de service.
13. Utilisation d'un mauvais fixateur.	Poursuite du traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole. Informer le médecin responsable du secteur.
14. Délai de transport/fixation.	Poursuite du traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole. Informer le médecin responsable du secteur.
15. Écoulement du prélèvement ou du fixateur durant le transport.	Poursuite du traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole. Informer le médecin responsable du secteur et effectuer une procédure de décontamination s'il s'agit d'échantillons non fixés.
16. Pot vide.	Arrêt de traitement	Information au médecin prescripteur intégrée au protocole. Informer le médecin responsable du secteur.
17. Matériel en quantité insuffisante pour réaliser une technique complémentaire.	Arrêt de traitement	Information au médecin prescripteur intégré au protocole et envisager un nouveau prélèvement.

- 1 **10. Annexe III**
- 2 **Conflits d'intérêts**
- 3 Aucun conflit d'intérêts n'a été déclaré.