

ACCREDITATION SELON LA NORME NF EN ISO 15189 DE L'EXAMEN DE GENOTYPAGE RHD FOETAL NON INVASIF AU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN HEMOBIOLOGIE PERINATAL (CNRHP)

DA SILVA N.R., HUGUET-JACQUOT S., TOLY-NDOUR C., OGER M., OUDIN O., SAULET P., VAUBOURDOLLE M., MAILLOUX A.

CNRHP, Pôle de Biologie Médicale et Pathologie, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, AP-HP, PARIS, FRANCE

Introduction

Tous les laboratoires de biologie médicale en France doivent être accrédités sur la totalité de leur activité avant le 1er Novembre 2020. Il a été suggéré que cette accréditation n'était pas réalisable pour les examens très spécialisés en raison de leur complexité et du faible nombre de laboratoires de référence qui les réalisent. Pour progresser vers l'objectif fixé par la législation et pour évaluer les difficultés potentielles liées à ce contexte, le pôle de Biologie Médicale et Pathologie, déjà accrédité depuis 2011 pour des activités plus courantes, a souhaité faire évoluer le projet qualité vers des activités de référence.

But

Obtention de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 de l'examen de génotypage RHD fœtal non invasif (famille génétique constitutionnelle, portée flexible B) en adaptant le kit Free DNA Fetal kit RHD® CEIVD (Biorad)

Méthode

Au CNRHP, l'examen est réalisé sur sang total collecté sur EDTA à partir de 12 semaines d'aménorrhées (SA) avec une tolérance pour 11 SA. Les tubes doivent arriver dans les 72 h après le prélèvement avec une tolérance jusqu'à 5 jours. Le résultat est rendu sous 2 semaines. La demande d'examen doit être accompagnée d'un consentement signé de la patiente et du prescripteur.

Le CNRHP a travaillé sur 4 axes principaux, plus difficiles à aborder dans le cas d'un examen de référence en portée B :

- la maîtrise des phases pré et postanalytiques avec plusieurs dizaines de correspondants distants
- les procédures de formation-habilitation des personnels
- le dossier de validation de la méthode adaptée par le LBM et établi pour un examen qualitatif
- la gestion des CQI, des CIL et des EEQ (programme national mis en place par le laboratoire).

Résultats

Maîtrise des phases pré et postanalytiques avec plusieurs dizaines de correspondants distants

Moyen de diffusion du manuel de prélèvement des feuilles de demandes d'examen : Site Internet



Dossier de validation de la méthode adaptée par le CNRHP et établi pour un examen qualitatif

Pourquoi une portée B ?

Adaptation de la méthode CEIVD afin de réaliser des PCRs en duplicate pour diminuer le nombre de reprise du test avec automatisation de l'extraction

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES	
Résultats de l'étude des courbes ROC partir d'une étude	84,4% sensibilité 90,9 % spécificité

ROBUSTESSE	
Données bibliographiques :	Oui (études inter-laboratoires)
Résultats :	Acceptable (CV<5%)
Conclusions et dispositions :	Pas d'influence en fonction du mode de pipetage

Importance d'enrichir le dossier de validation avec des données actualisées

COMPARAISON DE METHODES		CONTAMINATION	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Extraction automatisée et amplification sur LightCycler1.0	Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	oui
Nombre de mesures :	79	Inter réactif si nécessaire :	Une contamination éventuelle se traduirait par une discordance entre les résultats et le génotypage ou phénotypage du fœtus, vérifiée tout au long de la validation et confirmée par la concordance des résultats. Absence de contamination inter-réactifs
Descriptif de l'échantillon étudié :	Plasmas congelés de patientes dont le génotypage ou phénotypage du fœtus est connu	Vérification bibliographique :	oui
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Concordance entre le résultat et le génotypage ou phénotypage du fœtus Concordance des résultats entre les 2 techniques	Vérification sur site :	Vérification en alternant des échantillons de plasma de femme enceinte de fœtus RHD positif et de femme enceinte de fœtus RHD négatif
Résultats et interprétations des discordances :	100% concordant sauf pour les résultats indéterminés		
Conclusions et dispositions :	Valeurs prédictives négative et positive du test sont de 100%		

Procédures de formation-habilitation des personnels

Habilitation initiale

- 1- Formation pratique et théorique des techniciens avec validation de la formation par passage d'échantillons connus
 - 2- Grille d'Habilitation sur le processus de l'examen
- #### Maintien des compétences
- 1- Grille d'habilitation sur le processus de l'examen
 - 2- Taux d'occupation des postes
 - 3- Passage des contrôles de qualité

Gestion des CQI, des CIL et des EEQ

Difficulté : absence de CQE ou EEQ

- Mise en place d'un programme d'évaluation externe de la qualité au CNRHP en 2010
Nature du contrôle : Mime l'amplification d'ADN fœtal RH1 positif minoritaire dans un environnement maternel RH1 négatif
- 1-Mélange de plasmas de donneurs RH:-1 et RH:1 à des concentrations différentes
 - 2-Distribution sous forme de plasmas congelés
 - 3- Questionnaire pour une interprétation clinico-biologique
- Programme renouvelé en 2011 en 2012 et en 2013 (7 laboratoires participants)

Lors la visite des évaluateurs COFRAC en avril 2012, 5 écarts non critiques ont été relevés (dossier de validation, les précautions à prendre pour éviter les risques de contamination, les comptes rendus de résultat et la métrologie des automates). Depuis juin 2012, le CNRHP est accrédité pour la famille GENMOLBM et poursuit sa démarche qualité par le rendu sous accréditation du génotypage KEL1 fœtal non invasif dans le cadre de l'application de la portée flexible

Discussion

Les difficultés et spécificités liées à la maîtrise d'un examen de biologie médicale de génétique moléculaire de référence sont ici cumulées et notamment : nombre important de correspondants distants avec des difficultés pour maîtriser les phases pré et postanalytiques, évaluation et maintien des compétences pour un examen critique, urgent et complexe de réalisation et d'interprétation, faible nombre de laboratoires de comparaison pour assurer la qualité du processus analytique. Malgré ces écueils, nous montrons ici qu'il est possible de respecter les exigences de la norme, y compris dans cette configuration.