

MISE EN PLACE D'UN PLAN D'AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ D'UNE MÉTHODE QUANTITATIVE D'ÉVALUATION DE LA RÉPONSE AU TRAITEMENT DANS LES LAL DE L'ADULTE


MARTINEZ Gérald

DIPLÔME UNIVERSITAIRE « ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE »

CONTEXTE

- Les cellules leucémiques résistantes au traitement d'induction dans une LAL, mais indétectables au microscope, constituent la maladie résiduelle minimale ou **MRD**.
- L'évaluation de cette réponse précoce au traitement, par quantification de la MRD est le **facteur prédictif** de la rechute le plus puissant.
- Elle Permet d'adapter le traitement à ce risque :
 - MRD ≥ 1 cellule leucémique sur 10 000 cellules normales :
risque élevé ➡ **Intensification du traitement / allogreffe**
 - MRD < 1 cellule leucémique sur 10 000 cellules normales :
risque faible ➡ **traitement standard**

PROBLÉMATIQUE

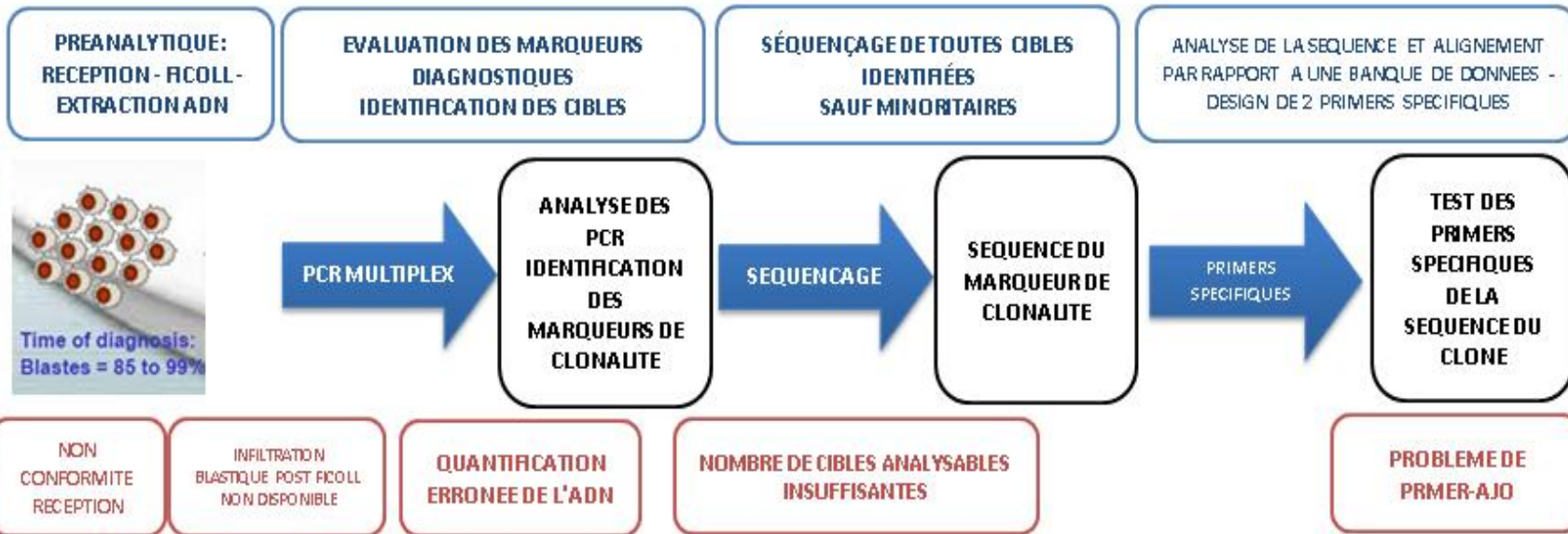
- Répondre aux exigences des protocoles:
 - **Délai** de rendu en fonction des schémas (ex: après induction soit 1 mois après le début)
 - **Nombre de cibles** leucémiques quantifiables avec une grande sensibilité
 - **Optimisation et standardisation** de la méthode de quantification de la MRD: AS-RQ-PCR clone spécifique
-  Maitrise de la qualité du processus analytique

PROCESSUS QUALITÉ

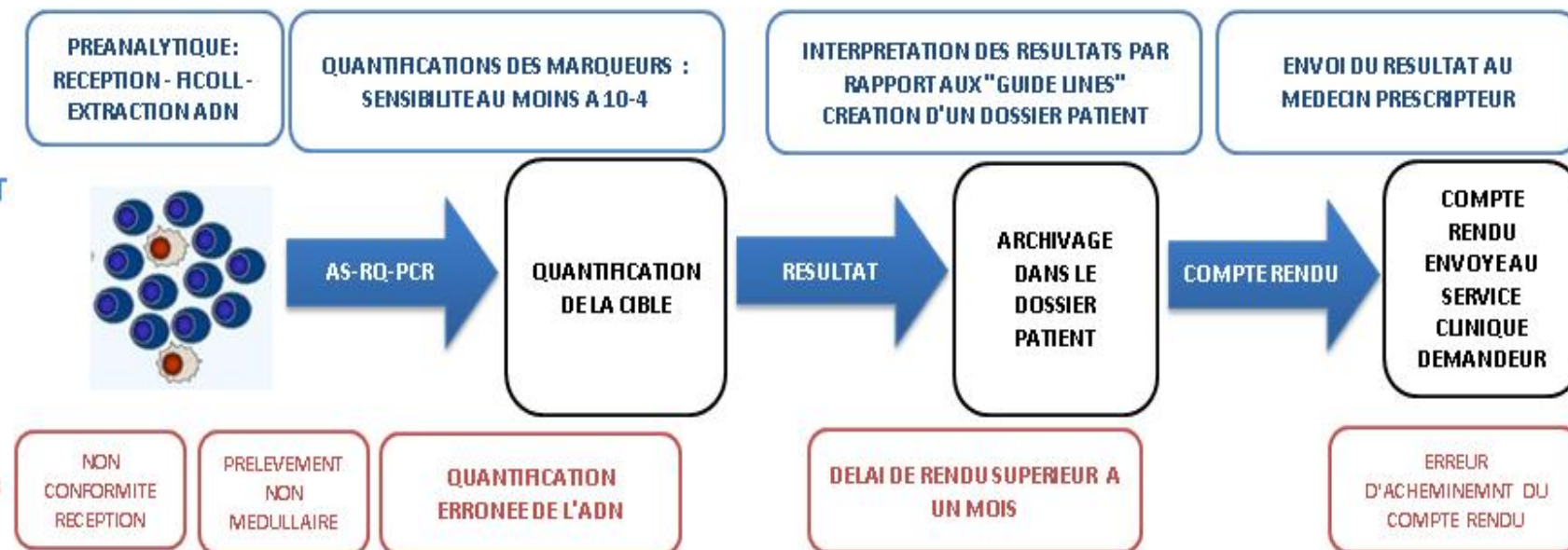
- Description du processus de quantification de la MRD
 - Phase préanalytique
 - Phase analytique 1 : Identification des cibles - Design des systèmes de AS RQPCR - Validation des systèmes (sensibilité, spécificité)
 - Phase analytique 2 : Quantification de la MRD - Interprétation et formulation des résultats
 - Phase postanalytique
- Audit du processus par rapport à un référentiel
- Identification des points critiques ayant un impacts sur la qualité de l'analyse
 - 9 points critiques identifiés
- Analyse quantitative des dysfonctionnements concernant ces points critiques
 - Détermination des fréquences d'occurrence
 - Sélection des 3 dysfonctionnements les plus fréquents (diagramme de Pareto)
 - Choix des indicateurs qualités adaptés
 - Analyse des indicateurs qualités

PROCESSUS

PROCESSUS PRELEVEMENT DIAGNOSTIC



PROCESSUS PRELEVEMENT DE SUIVI



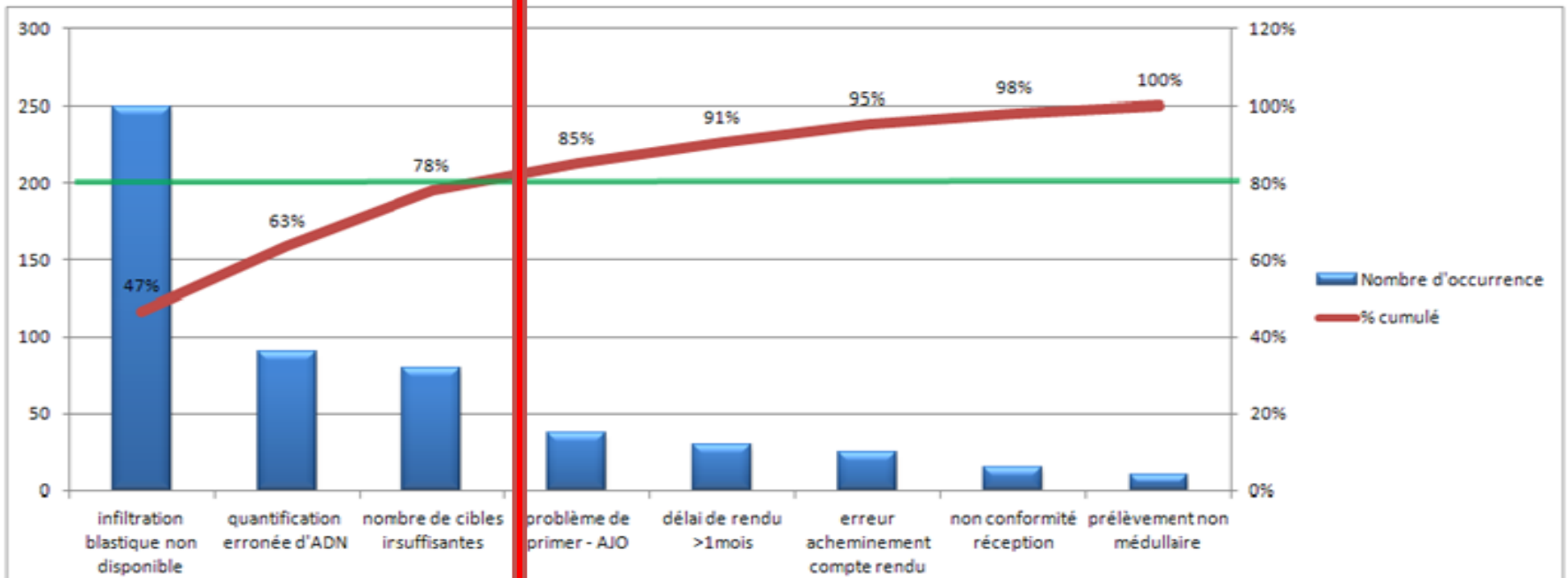
POINTS CRITIQUES OBSERVES PAR AUDIT

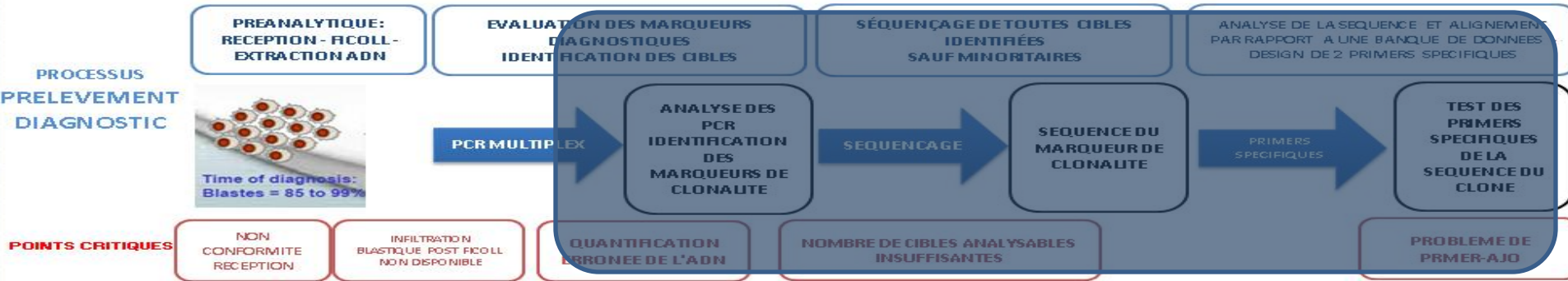
ETAPES PRINCIPALES D'ETUDES DE LA MRD PAR AS-RQ-PCR

	BON	A REVOIR	A FAIRE
Etape 1: Préanalytique: objectif: ADN homogène de concentration précise :			
conformité réception			
Utiliser un prélèvement infiltré			
Séparation des cellules mononucléées par centrifugation en gradient de densité			
Evaluation du % de blastes par CMF			
Extraction de l'ADN à partir de 10×10^6 cellules			
Homogénéisation totale			
Dosage colorimétrique précis (type "nanodrop") de la solution mère			
Dilution homogène de l'ADN de travail			
Qualification de l'ADN de travail: dosage colorimétrique précis (nanodrop) + dosage génique par RQ-PCR			
Etape 2: Analytique :Identification des cibles Ig/TCR selon protocoles standardisés			
Analyse par PCR des différents loci Ig/TCR: IgH, IgKappa, TCR Delta, TCR gamma, TCR beta. La hiérarchie de choix des cibles est différentes selon le profil immunophénotypique et leur stabilité durant l'évolution clinique			
Analyse des PCR par migration (acrylamide et/ou séquenceur). Cohérence intensité signal avec le % de blastes. Reconnaissance de sous-clones éventuels			
Choix des cibles monoclonales à séquencer après étude globale du dossier patient			
Séquençage dans les 2 sens des réarrangements sélectionnés			
Interprétation des séquences par référence aux bases de données			
Sélection des cibles pour la PCR MRD			
Etape 3: test de sensibilité et de spécificité pour chaque cible sélectionnée			
Configuration des "amorces" allèles (CDR3) spécifiques dit AJO (Anti Junctional Oligonucleotide)			
Commande des AJO			
Analyse de dilutions de l'ADN diagnostic par RQ-PCR à l'aide de chacun des AJO			
Interprétation de la sensibilité/spécificité pour chaque primer/cible; sélection d'AJO répondant aux critères			
Validation des cibles			
Etape 4: Analyse de la MRD sur les prélèvements de suivi			
Quantification-qualification de l'ADN de suivi par dosage génique (dosage génique par RQPCR)			
Analyse par RQ-PCR allèle spécifique de ces prélèvements de suivi			
Interprétation des résultats de PCR MRD selon des règles standardisées			
Calcul du taux de MRD			
Délai de rendu			
Envoi compte rendu			

DIAGRAMME DE PARETO

Type de dysfonctionnement	Nombre d'occurrence	%	% cumulé
infiltration blastique non disponible ou erronée	250	47%	47%
quantification erronée des ADN	90	17%	63%
nombre de cibles insuffisantes	80	15%	78%
problème de primer - AJO	37	7%	85%
délai de rendu >1mois	30	6%	91%
erreur acheminement compte rendu	25	5%	95%
non conformité réception	15	3%	98%
prélèvement non médullaire	10	2%	100%
total	537	100%	





POINT CRITIQUE NUMERO 1 : INFILTRATION BLASTIQUE

CHOIX DE L'INDICATEUR QUALITÉ : LA MESURE DE L'INFILTRATION BLASTIQUE

• PLAN D'ACTION

– L'OUBLI:

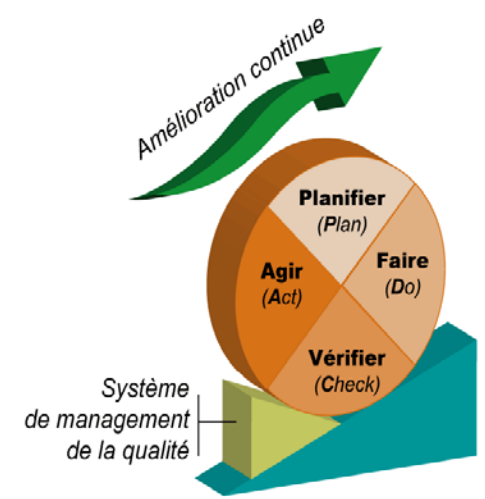
- Une relecture et une actualisation des procédures
- Une diffusion et une information sur l'ensemble de l'équipe de techniciens.
- Une traçabilité a été créée par un paramétrage dans GLIMS.

– MESURE ERRONEE DE L'INFILTRATION:

- Substitution du MGG cytopspin par une technique de quantification des blastes tumoraux par cytométrie en flux



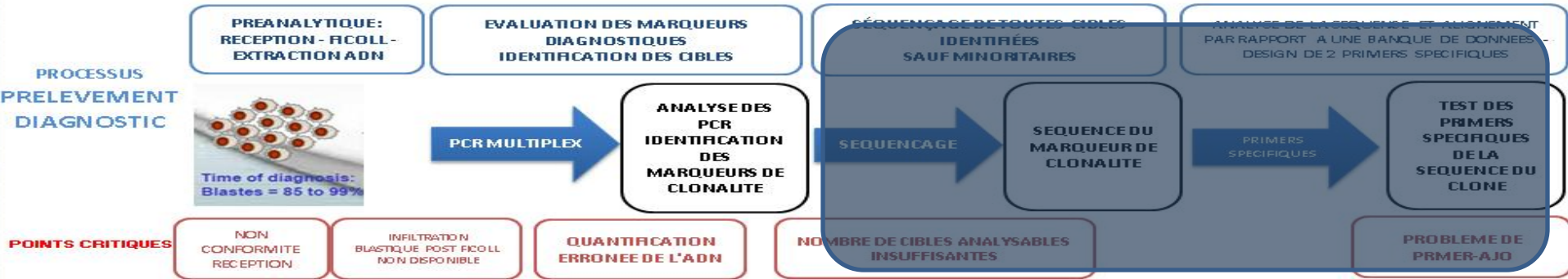
BILAN 3 MOIS



- L'analyse MGG est bien prescrite sur GLIMS :

AUCUN OUBLI

- L'analyse par combinaison d'anticorps en immunophénotypage: Un panel de 5 Ac a été élaboré pour cibler cellules leucémiques et normales. La mise en application est en cours
- Une étude comparative MGG/Cytométrie en flux est en cours.

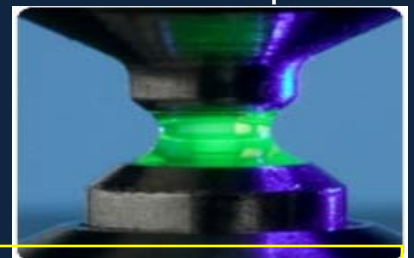


POINT CRITIQUE NUMERO 2 : QUALITE ADN / QUANTIFICATION ERRONÉE

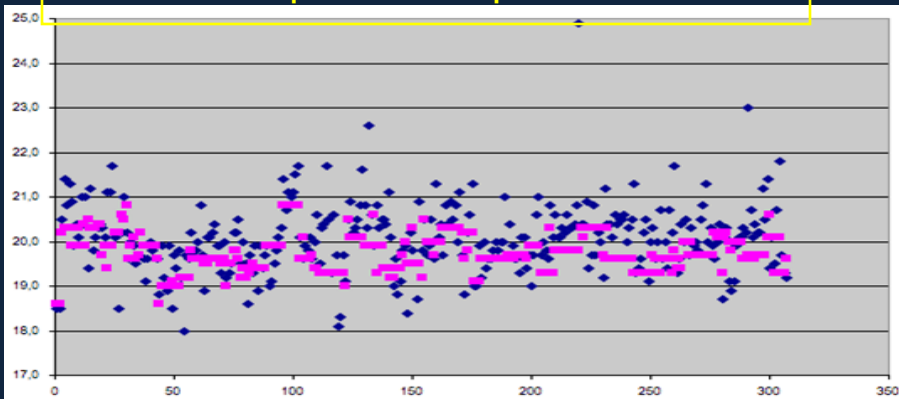
CHOIX DE L'INDICATEUR QUALITÉ :
CORRESPONDANCE ENTRE DOSAGE GÉNIQUE ET DOSAGE PHYSIQUE

• PLAN D'ACTION:

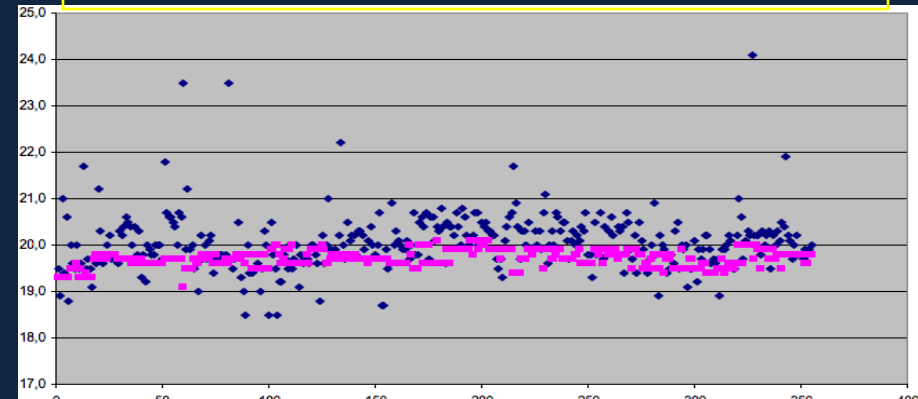
- Substitution de la technique d'extraction au Phénol Chloroforme par une technique sur colonne de silice.
- Dosage génique de l'ADN par RQ-PCR (albumine).
- Stabilité de la mesure par rapport à un ADN standard



Avant la mise en place du plan d'action extraction au phénol chlorophorme



Après mise en place extraction sur colonne de silice



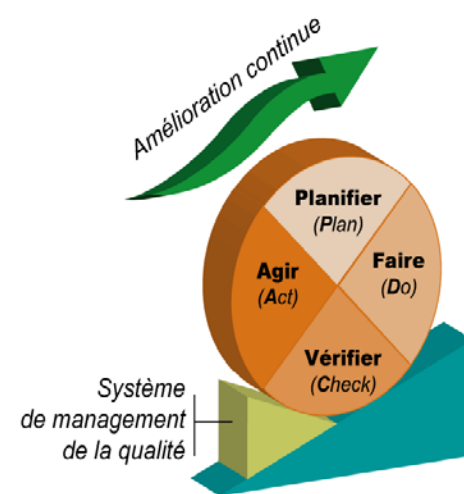
BILAN 3 MOIS

Equivalence entre dosage génique et dosage physique

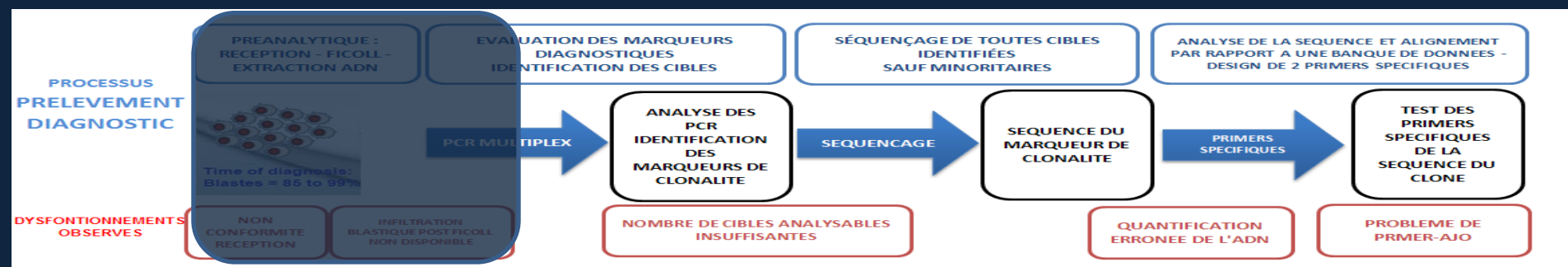


- discordant
- correspondant

On ne retrouve plus que 10.7% qui présente une discordance.



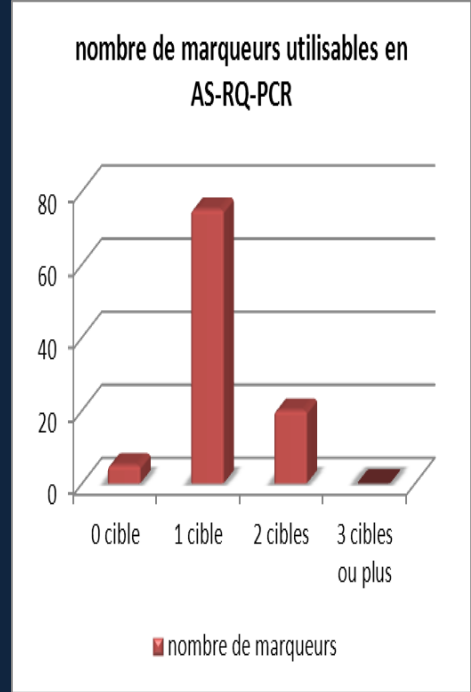
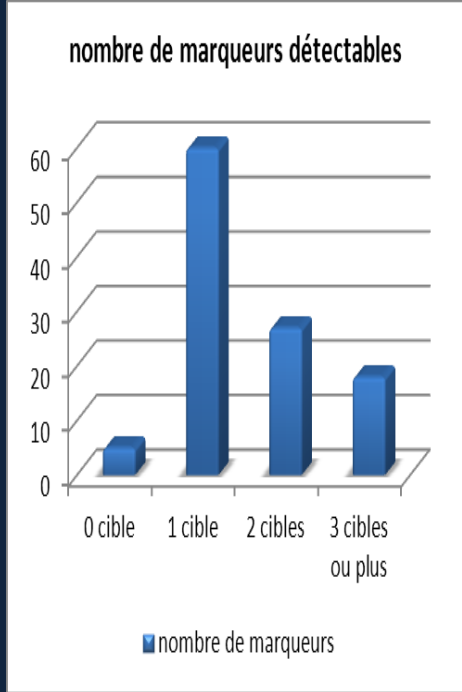
- LES RÉSULTATS PAR DOSAGE GÉNIQUE / CONCENTRATION COLORIMÉTRIQUE SONT TOUJOURS RÉPERTORIÉS DANS UN FICHER EXCEL QUI FAIT DÉSORMAIS PARTIE DES **DOCUMENTS D'ENREGISTREMENTS COURANTS**.
- LA VÉRIFICATION DE COHÉRENCE ENTRE LES DEUX DOSAGES EST FAITE SYSTÉMATIQUEMENT POUR CHAQUE SERIE.



POINT CRITIQUE NUMERO 3 : NOMBRE DE CIBLES INSUFFISANTES

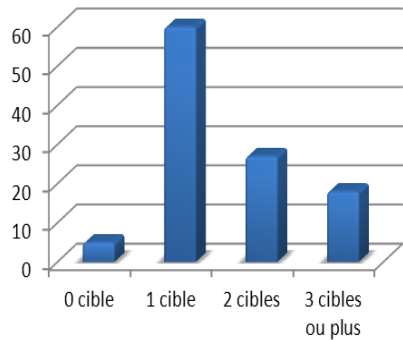
CHOIX DE L'INDICATEUR QUALITÉ :
NOMBRE DE PATIENT POUR LESQUELS ON A IDENTIFIE 2 MARQUEURS

- **PLAN D'ACTION:**
 - Actualisation et développement de nos méthodes d'identification des cibles : Substitution de méthodes historiques du laboratoire par les méthodes du « biomed-2 » .
 - Exploration de tous les loci au diagnostic



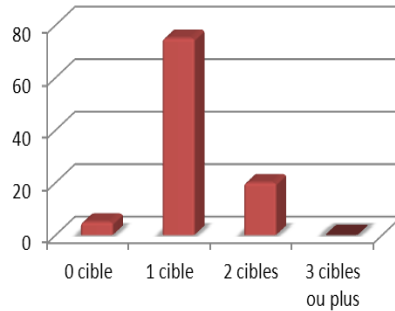
BILAN 3 MOIS

nombre de marqueurs détectables



■ nombre de marqueurs

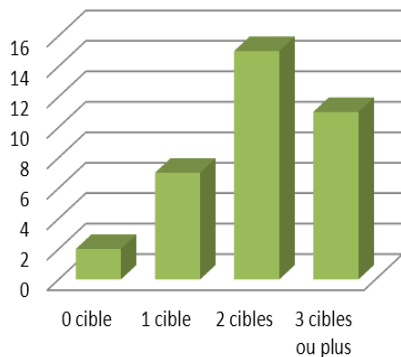
nombre de marqueurs utilisables en AS-RQ-PCR



■ nombre de marqueurs

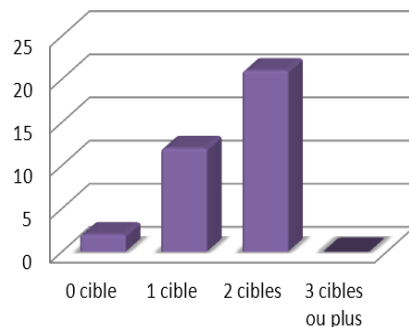
2010

nombre de marqueurs détectables



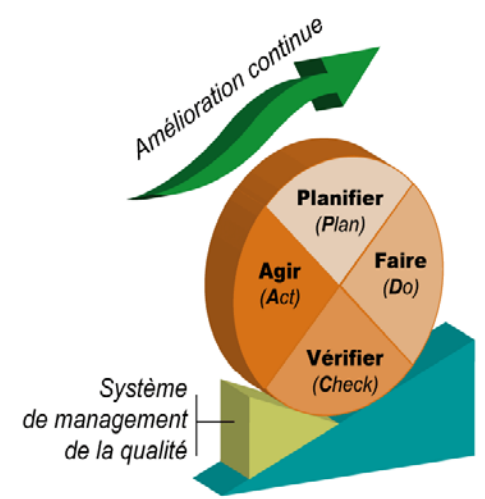
■ nombre de marqueurs

nombre de marqueurs utilisables en AS-RQ-PCR



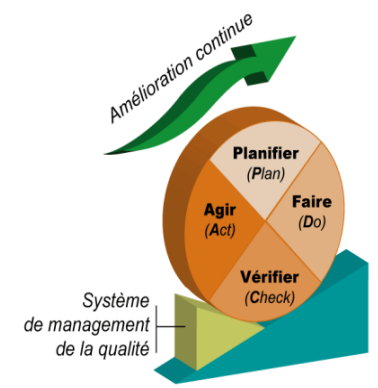
■ nombre de marqueurs

Bilan 3 mois



- Tous les loci Ig et TCR sont bien explorés.
- **Augmentation significative de l'efficacité de détection des réarrangements clonaux**

CONCLUSION



- **Amélioration du processus analytique:**
 - Disponibilité du degré d'infiltration blastique du prélèvement diagnostique
 - Changement de technique d'extraction
 - Développement et mise en place des protocoles européens « Biomed-2 »
- Réponse dans les délais protocolaires
- Fiabilité des résultats de MRD pour la stratification thérapeutique.
- Mise en place d'une traçabilité (enregistrements):
 - % de blastes post ficoll sur GLIMS
 - Concordance dosage génique et dosage physique.
 - Création d'un dossier patient et base de donnée pour l'évaluation clinique des résultats.
- **Déclenchement dynamique de la qualité au sein du laboratoire :** projet de transfert de la mise en place de la qualité vers d'autres secteurs. (cytométrie en flux)